Primjena ugljikovih nanovlakana i grafena u razvoju novog senzora za analizu nepafenaka

Jurić, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:819659

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Ivana Jurić

Primjena ugljikovih nanovlakana i grafena u razvoju novog senzora za analizu nepafenaka

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Analitika lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen je na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Biljane Nigović.

Zahvaljujem se mentorici, prof. dr. sc. Biljani Nigović, na ukazanom povjerenju i strpljenju koje je bilo potrebno za izradu ovog rada kao i za svu stručnu pomoć i savjete. Također, hvala i svim djelatnicima Zavoda za analitiku i kontrolu lijekova gdje su mi boravak i rad bili ugodni.

Želim se zahvaliti svojim roditeljima i cijeloj obitelji na podršci i omogućavanju cijelog školovanja kao i kolegama, cimerici i prijateljima s kojima je cijelo to razdoblje bilo ljepše.

Na kraju, najveće hvala mojem suprugu Ivanu koji je bio uz mene u svim dobrim i manje dobrim trenutcima studija; bio je i jest moja moralna i tehnička podrška te ovaj rad uistinu ne bi izgledao ovako bez njega.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. NEPAFENAK 2
1.2. ELEKTROANALITIČKE METODE 5
1.2.1. VOLTAMETRIJA 5
1.2.1.1. CIKLIČKA VOLTAMETRIJA 7
1.2.1.2. PRAVOKUTNOVALNA VOLTAMETRIJA 9
1.2.1.3. STRIPPING VOLTAMETRIJA 10
1.2.2. KRUTE ELEKTRODE 10
1.2.2.1. ELEKTRODA OD STAKLASTOG UGLJIKA 11
1.2.2.2. UGLJIKOVI NANOMATERIJALI 12
2. OBRAZLOŽENJE TEME 13
3. MATERIALI I METODE 15
3.1. KEMIKALIJE 16
3.2. RADNI INSTRUMENTI 16
3.3. UVJETI MJERENJA 17
3.4. MODIFIKACIJA POVRŠINE ELEKTRODE I PRIPREMA ZA MJERENJE 17
3.5. PRIPREMA OTOPINA 18
3.5.1. OTOPINE NEPAFENAKA 18
3.5.1.1. MATIČNA OTOPINA 18
3.5.1.2. RADNE OTOPINE 18
3.5.2. SUSPENZIJA GRAFEN PLOČICA U SUSPENZIJI KITOZANA U 1 %-TNOJ OCTENOJ KISELINI 19
3.5.3. SUSPENZIJA GRAFEN PLOČICA U 0,3 %-TNOJ ETANOLNOJ OTOPINI NAFIONA 19
3.5.4. SUSPENZIJA GRAFEN PLOČICA I UGLJIKOVIH NANOVLAKANA U 0,3 %-TNOJ ETANOLNOJ OTOPINI NAFIONA 20
3.5.5. OTOPINA BR PUFERA 20
4. REZULTATI I RASPRAVA 22
4.1. DEFINIRANJE POVRŠINE MODIFICIRANE GCE I OTAPALA ZA SUSPENZIJU NANOMATERIJALA 23
4.2. ODABIR pH OTOPINE ZA ANALIZU 24
4.3. OPTIMIRANJE PARAMETARA PRAVOKUTNOVALNE VOLTAMETRIJE 26

4.4. UTJECAJ BRZINE PROMJENE POTENCIJALA NA STRUJNI VRH NEPAFENAKA 29
4.5. STRIPPING VOLTAMETRIJA 30
4.6. LINEARNOST 32
5. ZAKLJUČCI 37
6. LITERATURA 39
7. SAŽETAK/SUMMARY 42
7.1. SAŽETAK 43
7.2. SUMMARY 44
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD 45

1. UVOD

1.1. NEPAFENAK

Nepafenak je aktivna farmaceutska supstancija koja spada u skupinu nesteroidnih protuupalnih lijekova. Nesteroidni protuupalni lijekovi ili NSAID (prema engl. *nonsteroidal anti-inflammatory drugs*) su jedna od široko i često primjenjivanih skupina lijekova zbog svojih protuupalnih, antipiretskih i analgetskih učinaka kao i zbog činjenice da je dio lijekova iz te skupine u bezreceptnom režimu izdavanja u ljekarnama. Ipak, nepafenak se nalazi u receptnom režimu izdavanja i ima vrlo specifične indikacije, a to su prevencija i liječenje postoperativne boli i upale povezane s operacijom katarakte i smanjenje rizika (prevencija) od postoperativnog makularnog edema povezanog s operacijom katarakte kod bolesnika s dijabetesom (www.ema.europa.eu).

Katarakta ili siva mrena je prirođeno ili degenerativno zamućenje leće koje uzrokuje postupno, bezbolno zamućenje vida. Razvoju tog oboljenja mogu pridonijeti starenje, trauma, izloženost različitim vrstama zračenja (kao što su X, infracrveno, UV), sistemske bolesti poput dijabetesa i sistemska primjena nekih lijekova, npr. kortikosteroida (www.msd-prirucnici.placebo.hr).

Katarakta se liječi kirurškim odstranjivanjem leće, a najčešći je način fakoemulzifikacija što podrazumjeva upotrebu ultrazvuka za njezino razbijanje prije odstranjivanja. Nakon toga se ugrađuje umjetna leća. Iako su takvi operativni zahvati kratkotrajni, koristi se opsežna medikacija u prevenciji mogućih komplikacija. Za samu operaciju su potrebni midrijatik i lokalni anestetik, a nakon nje antibiotici, analgetici i protuupalni lijekovi.

Makularni edem je edem mrežnice lokaliziran na žutoj pjegi koji nastaje primarno zbog promjene permeabilnosti krvo-retinalne barijere na koju, između ostaloga, utječu operacijska trauma i upala. Upala sama po sebi aktivira mnoge signalne putove i dovod do povećane propusnosti kapilara.

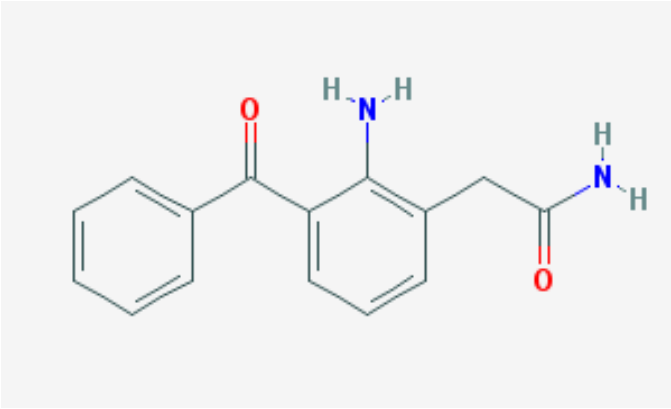
Upravo zbog svojeg protuupalnog djelovanja su NSAID našli svoje mjesto u medikacijskom tretmanu prije i nakon operacije katarakte. Učinkoviti su kod smanjenja upale prednje očne komore i navodi se da su diklofenak, nepafenak, ketorolak i bromfenak učinkovitiji od ostalih iz skupine (Duan P i sur., 2017).

Meta analiza navodi da je nepafenak bolji od ketorolaka u smanjenju incidencije postoperativne konjuktivalne hiperemije i okularnog diskomforta te, ako se primjeni preoperativno, rezultira većim podnošenjem operacije od strane pacijenata. S druge strane ih

izjednačava u kontroli postoperativne upale i učinkovitosti u smanjenju incidencije makularnog edema te kontroli midrijaze tijekom operacije (Zhao X i sur., 2017).

Ipak, postoje polemike oko njihove učinkovitosti u monoterapiji u odnosu na steroide te koji je od lijekova iz skupine superiorniji u odnosu na ostale kada se radi o prevenciji makularnog edema kao posljedice operacije katarakte. Navodi se da postoji šansa da topikalni NSAID mogu smanjiti rizik incidencije makularnog edema nakon operacije katarakte, ali da se ne može točno utvrditi koliko značajno (Lim BX i sur., 2016). Stoga je u sažetku opisa svojstava lijeka nepafenaka navedena indikacija prevencija makularnog edema nakon operacije katarakte, ali kod bolesnika s dijabetesom (kako je već opisano u prvom odlomku).

Molekulske formule $C_{15}H_{14}N_2O_2$ i kemijske strukture 2-(2-amino-3-benzoilfenil)acetamid (Slika 1), nepafenak kao čista ljekovita tvar (*bulk form*) dolazi u obliku žutog praška gotovo netopljivog u vodi. U gotovom ljekovitom obliku se isti lijek na europskom tržištu nalazi u obliku kapi za oči kao 0,1 % i 0,3 % (vodena) suspenzija pod trgovačkim imenom NEVANAC. Kao takav, lijek je dobio odobrenje za stavljanje u promet na samom kraju 2007. godine (www.ema.europa.eu).



Slika 1. Strukturna formula nepafenaka (preuzeto s: www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)

Prema mehanizmu djelovanja, nepafenak je prolijek koji nakon primjene hidrolizira u aktivni oblik amfenak i inhibira enzime ciklooksigenazu 1 i 2 (COX-1 i COX-2, neselektivno) čime sprječava nastajanje proupalnih prostaglandina (www.drugs.com).

Način upotrebe je kapanje po jednu kap suspenzije u oko jednom (0,3 %-tna suspenzija) ili tri puta (suspenzija manje koncentracije) dnevno u razdoblju od jednog dana prije operacije katarakte pa sve do 2-3 tjedna nakon operacije kada je indikacija sprječavanje boli i upale. Ako se koristi radi smanjenja rizika od makularnog edema, tad se primjenjuje ista dnevna doza i do tri mjeseca po operaciji (www.ema.europa.eu).

Otežavajuća okolnost kod nepafenaka je što još nema monografiju u Europskoj farmakopeji kao ni u USP pa nema zakonske podloge i protokola kojima se vodi prilikom kontrole kakvoće (identifikacija, određivanje sadržaja i čistoće) već svaki laboratorij mora razviti i validirati svoju metodu.

1.2. ELEKTROANALITIČKE METODE

Elektroanalitičke metode su skupina analitičkih metoda koje podatak o koncentraciji, aktivitetu ili nekom drugom termodinamičkom svojstvu analita dobivaju u ovisnosti o električnom naponu, naboju ili struji (Wang, 2000).

Dakle, koriste se različiti (ovisno o tehnici) signali pobude koji onda uzrokuju odvijanje elektrokemijske reakcije na radnoj elektrodi što omogućava mjerenje promjene neke posljedične varijable i dovođenje u korelaciju s odgovarajućim analitičkim podatkom. Upravo prema signalima pobude i mjerenoj varijabli se elektroanalitičke metode mogu podijeliti na potenciometriju, voltametriju, kronoamperometriju, elektrogravimetriju, kronopotenciometriju, kulometriju i konduktometriju. Nužno je da analit podliježe elektrokemijskoj tj. redoks reakciji kako bi moglao biti detektiran.

Široko se primjenjuju u farmaciji (Brooks i Tsai, 1996), od rane faze istraživanja i sinteze farmakološki aktivnih molekula, mjerenja učinka lijeka korelacijom redoks potencijala i aktivnosti, do praćenja interakcija s proteinima, metalnim ionima ili DNA. Također se koriste u identifikaciji i određivanju lijekovitih tvari u obliku sirovina, gotovim ljekovitim oblicima i u biološkim tekućinama (Nigović i Behetić, 2007). Neke se elektroanalitičke metode primjenjuju u Europskoj farmakopeji: npr. potenciometrijske titracije, amperometrijske titracije, potenciometrijska određivanja i konduktometrija (European Pharmacopoeia 8th ed., 2014).

Prednosti elektroanalitičkih metoda su njihova visoka osjetljivst, točnost i preciznost. Relativno su brze analize, a u prilog tome ide i činjenica da uglavnom ne zahtjevaju prethodno odjeljivanje niti složene predanalitičke pripreme uzorka i reagenasa. Osim toga, omogućuju selektivnu detekciju ljekovitih tvari, ovisno o dostupnom rasponu potencijala elektroaktivnih tvari.

1.2.1. VOLTAMETRIJA

Voltametrijske metode su skupina elektroanalitičkih tehnika u kojima se potencijal elektrokemijskog članka mijenja prema negativnim ili pozitivnim vrijednostima te se mjeri struja. Rezultat takvog eksperimenta je ovisnost struje o primijenjenom potencijalu čiji se grafički prikaz zove voltamogram (Rusling i Kumosinski, 1996). Dakle, signal pobude je

promjena potencijala, a signal odaziva je struja čija međuovisnost u konačnici daje odgovarajući analitički podatak.

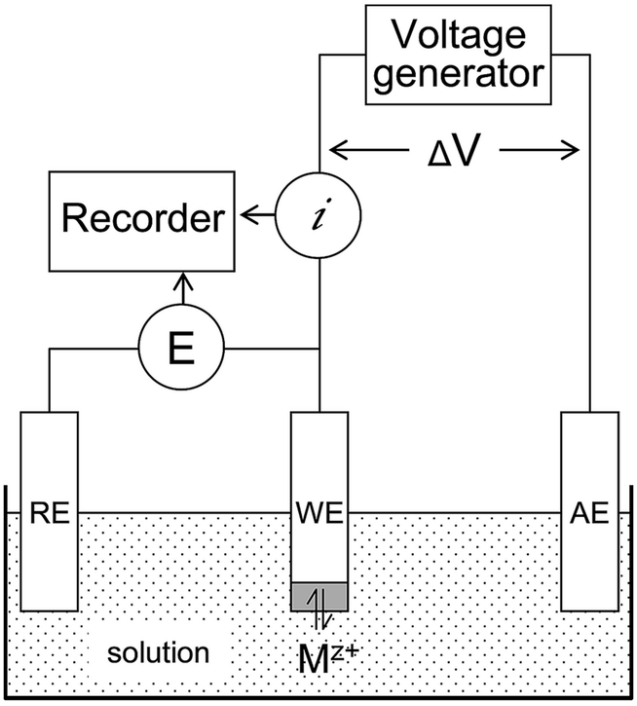
Postoji više vrsta voltametrijskih metoda: ciklička, pravokutnovalna, diferencijalna pulsna i *stripping* voltametrija, a koriste se i različite vrste polarografije (iz polarografije se voltametrija i počela razvijati).

Voltametrijski se instrument sastoji od računala, potenciostata i elektrokemijskog članka. Računalo ima *software* sa sučeljem kojim se lakše upravlja instrumentom i na kojemu se vide te mogu spremiti i obrađivati rezultati. Potenciostat je taj koji nametne potencijal i koji mjeri jakost struje kao odgovor, a elektrokemijski članak služi kao nosač otopine analita u koju su uronjene elektode.

U voltametriji se koriste tri elektrode: radna, pomoćna ili protuelektroda te referentna (Slika 2). Na radnoj se elektrodi odvija elektrokemijska reakcija, a struja teče između nje i protuelektrode te su tu i mjeri (signal odaziva). Referentna elektroda ima stalan potencijal kako bi se između nje i radne elektrode mogla mjeriti razlika potencijala koja odgovara signalu pobude (Nigović i Behetić, 2007). U Tablici 1. su prikazani primjeri elektroda.

Tablica 1. Primjeri elektroda u voltametriji (Kounaves, 1997)

Radna elektroda	Protuelektroda/pomoćna	Referentna elektroda
kapljice Hg, zlatna elektroda, Pt, *glassy carbon*	tanka žica Pt, rjeđe Au i grafitna elektroda	Kalomel elektroda (Hg_2Cl_2), Ag/AgCl



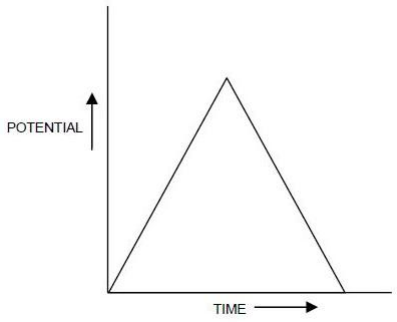
Slika 2. Shematski prikaz elektrokemijskog članka. RE: referentna elektroda, WE: radna elektroda, AE: protuelektroda (preuzeto s: pubs.rsc.org)

Prednosti voltametrije u analitici su odlična osjetljivost s velikim linearnim rasponom koncentracija i za organske i anorganske analite (10^{-1} do čak 10^{-12} M), mogućnost izbora različitih otapala i elektrolita, širok raspon temperatura, brzo vrijeme analize (u sekundama), simultano određivanje više analita, mogućnost određivanja parametara kinetike i mehanizma reakcija, dobro razvijena teorijska podloga te mogućnost generiranja različitih oblika valova potencijala kako bi se generirale male struje (Kounaves, 1997).

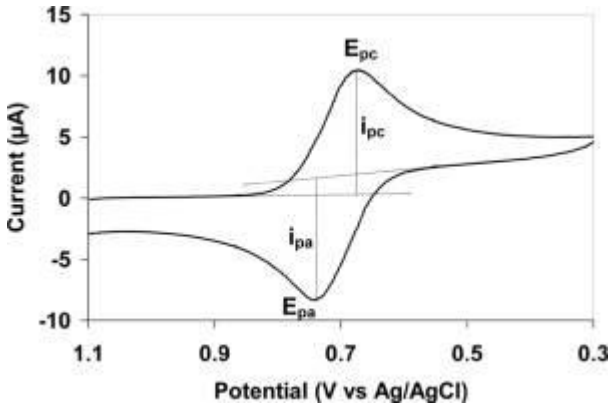
1.2.1.1. CIKLIČKA VOLTAMETRIJA

Ciklička voltametrija (engl. *cyclic voltammetry*, CV) se temelji na linearnoj promjeni potencijala u oba smijera (od neke početne vrijednosti krene u jednom smjeru i nakon postizanja određene vrijednosti se vraća prema početnoj, Slika 3.) prilikom čega se mjeri struja, a ovisno o analizi se izvodi puni ciklus promjene potencijala, dio ciklusa ili nekoliko ciklusa za redom (Kounaves, 1997). Jakost struje raste kako se potencijal približava redoks potencijalu analita, strujni vrh nastane prelaskom preko njega, a nakon toga jakost struje se smanjuje jer opada koncentracija analita u blizini elektrode (Slika 4.). Oblik cikličkog voltamograma ovisi o brzinama prijenosa elektrona, prijenosa tvari i kemijskim reakcijama koje prate redoks reakcije (Nigović i Behetić, 2007).

Upotreba CV: proučavanje redoks procesa, za razumijevanje reakcijskih intermedijera i proučavanje stabilnosti reakcijskih produkata. Rijetko se koristi u kvantitativne svrhe (optimalna granica detekcije je od 10^{-5} do 10^{-6} M) (Kounaves, 1997).



Slika 3. Prikaz promjene potencijala kod CV tijekom vremena. (Preuzeto s www.azom.com)



Slika 4. Prikaz cikličkog voltamograma. (Preuzeto s en.wikipedia.org)

U interpretaciji voltamograma su važni podatci potencijali vrhova redukcije (E_{pc}) i oksidacije (E_{pa}) te njihove vršne jakosti struje (i_{pc}, i_{pa}). Svaki spoj ima karakterističnu vrijednost potencijala vrha koja korelira s njegovom sposobnošću da prima ili daje elektrone. Redoks reakcija je reverzibilna ako je proces prijenosa elektrona brz te se to odražava na izgledu samog voltamograma koji je onda simetričan.

Broj izmijenjenih elektrona se može odrediti iz razlike potencijala vrhova:

$$\Delta E_p = \left|E_{pa} - E_{pc}\right| = 2{,}303\ RT/nF$$

Kako su R i F konstante, pri temperaturi od 25 ℃, za reverzibilnu reakciju s n elektrona, ΔE_p iznosi 0,0592/n V, tj. razlika potencijala vrhova iznosi 60 mV za jedan elektron.

Osim praćenja broja izmijenjenih elektrona, za reverzibilne reakcije vrijedi i Randles-Ševčikova jednadžba koja povezuje koncentraciju i vršnu jakost struje:

$$i_p = 2{,}686 \times 10^5 \times \sqrt{n^3} \times A \times c_0 \times \sqrt{D} \times \sqrt{v}$$

gdje su i_p vršna jakost struje (A), A površina elektrode (cm^2), c_0 koncentracija otopine (mol/cm^3), D difuzijski koeficijent (cm^2/s) i v brzina promjene potencijala (V/s) (Kounaves, 1997; Nigović i Behetić, 2007).

Ako se radi o ireverzibilnoj reakciji, gore spomenuta jednadžba se mora korigirati:

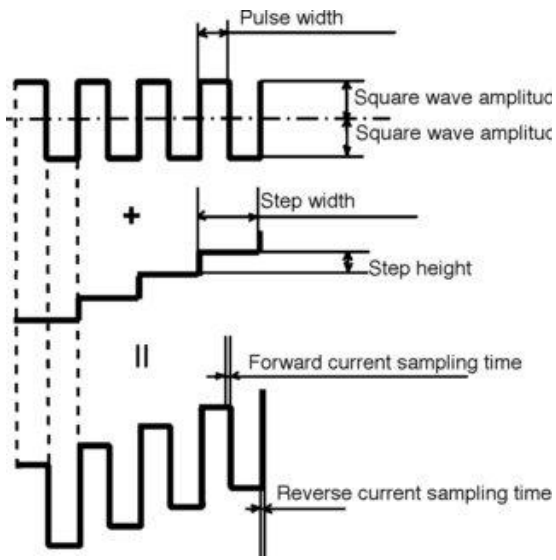
$$i_p = 2{,}99 \times 10^5 \times n \times \sqrt{\alpha n_a} \times A \times c \times \sqrt{D} \times \sqrt{v}$$

pri čemu su n_a broj elektrona u koraku prijenosa naboja i α koeficijent prijenosa (Wang, 2000).

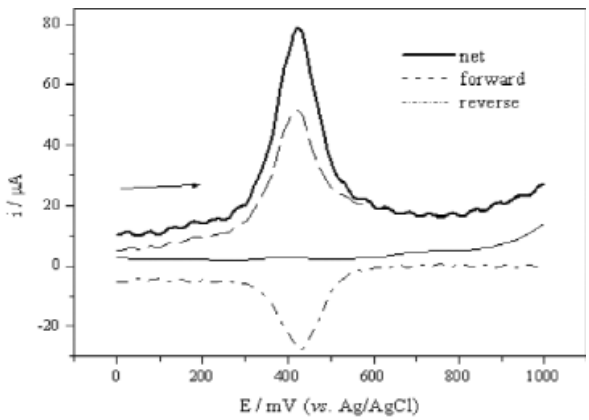
1.2.1.2. PRAVOKUTNOVALNA VOLTAMETRIJA

Kod pravokutnovalne voltametrije (engl. *square-wave voltammetry*, SWV) se signal pobude dobiva tako da se simetrični pravokutnovalni puls određene amplitude doda na stepeničasti oblik vala neke visine stube (porast potencijala) pri čemu se polazni puls pravokutnog vala poklapa sa stubom stepeničastog vala (Kounaves, 1997), prikazano na Slici 5. Struja se mjeri dva puta tijekom svakog ciklusa, jednom na početku polaznog pulsa i drugi puta na kraju pulsa suprotnog smijera (Nigović i Behetić, 2007). Neto struja odgovora se dobije kao razlika polazne i povratne struje (Slika 6.), a visina strujnog pika (upravo ta razlika) je razmjerna koncentraciji analita u otopini (Kounaves, 1997). Potencijal maksimuma se može upotrijebiti za potvrdu identiteta.

Prednosti SWV su odlična osjetljivost (granica detekcije i do 10^{-8} M) i odbacivanje pozadinske struje te velika brzina mjerenja (Kounaves, 1997).



Slika 5. Prikaz nastanka signala pobude kod SWV (Xu i sur, 1998).



Slika 6. Prikaz pravokutnovalnog voltamograma hidrokinona, za ilustraciju nastanka i prikaza neto struje odgovora (Cervini i Cavalheiro, 2006).

1.2.1.3. STRIPPING VOLTAMETRIJA

Da bi se postigla veća osjetljivost, uobičajenim elektroanalitičkim tehnikama se dodaje dio ukoncentriravanja analita prije izvođenja samog mjerenja. *Stripping* voltametrija uključuje elektrolitičko ili adsorpcijsko pretkoncentriranje analita na površinu elektrode prije voltametrijskog mjerenja (Wang, 2000). Ispitivana otopina se miješa određeno vrijeme dok se analit istaloži na elektrodi (vrijeme akumulacije), a tijekom tog razdoblja može biti podešen neki potencijal (tzv. potencijal akumulacije) kako bi se proces pospješio. Analit se s elektrode otapa primjenom promjene potencijala, tj. oksidira se ili reducira. Rezultat je porast struje, veći nego da se mjeri bez ukoncentriravanja. Razlog je ovisnost struje o koncentraciji analita na elektrodi koja je veća nego u otopini. Uglavnom se izvode SWV i diferencijalno pulsna voltametrija (Nigović i Behetić, 2007).

1.2.2. KRUTE ELEKTRODE

Dio voltametrijskog uređaja čine elektrode. Izbor radne elektrode je bitan i ovisi o redoks potencijalu ispitivanog analita, pozadinskoj struji unutar rapona korišenog potencijala (treba

biti omogućen velik omjer signala i šuma), otapalu, dodanom elektrolitu, primijenjenom potencijalu, temperaturi i tlaku pri mjerenju. Također bi se trebala uzeti u obzir moguća toksičnost elektrode kada je to bitno (*in vivo* upotreba), njena stabilnost, cijena i dostupnost. Isto tako, elektroda treba biti elektrokemijski inertna u širokom rasponu potencijala te bi trebala imati visok prednapon za razvoj vodika i kisika (korisno kod vodenih otopina) kao i sposobnost jednostavne regeneracije površine. A sve su te karakteristike potrebne da bi reproducibilnost, točnost, osjetjivost i niska granica detekcije i određivanja bile omogućene.

Danas se najviše razvijaju i koriste krute elektrode koje se razlikuju međusobno po materijalu od kojeg su izrađene: ugljikova, rutenijska, platinska, zlatna elektroda i druge; a mogu biti izvedene u više oblika i dimenzija: tubularne, prstenaste, planarne; kao što im se mogu razlikovati i promjeri površina (Uslu i Ozkan, 2007).

Prednost krutih elektroda je mogućnost korištenja u velikom rasponu temperatura i tlakova, mala veličina i netoksičnost koje ih čine pogodnima za *in vivo* ispitivanja. Velika prednost pred živinim elektrodama je mogućnost proučavanja oksidacije mnogih molekula što je kod živinih elektroda otežano zbog ograničenog anodnog potencijala. Osim toga, krute elektrode su robustnije i mehanički stabilnije.

Nedostatak im je heterogenost površine koja može ugroziti reproducibilnost mjernja, ali tome se doskočilo stalnim održavanjem površine elektrode obradom prije upotrebe i nakon određenog broja mjerenja. Čišćenje površine elektrode se može provesti mehanički (poliranje), kemijski ili elektrokemijski (Wang, 2000).

1.2.2.1. ELEKTRODA OD STAKLASTOG UGLJIKA

Najčešće korištene ugljikove elektrode su upravo elektrode od staklastog ugljika (engl. *glassy carbon electrode*, GCE) zbog izvrsnih mehaničkih i električnih osobina, širokog raspona potencijala, kemijske inertnosti i nepropusnosti za plinove. Mogu se koristiti sa svim poznatim otapalima i otporne su na koroziju kiselinama, jednostavno se ugrađuju u uređaj i poliraju pa daju reproducibilne rezultate.

Staklasti se ugljik priprema polagano, kontroliranim zagrijavanjem polimernog smolastog tijela koje je prethodno modificirano (proces karbonizacije). Poliranje se najčešće vrši s malim česticama aluminija (oko 0,05 µm) na tkanini za poliranje. Poliranjem se aktivira

površina GCE i omogućuje povećanje brzine prijenosa elektrona. Nakon poliranja slijedi čišćenje na ultrazvučnoj kupelji i ispiranje deioniziranom vodom (Wang, 2000).

1.2.2.2. UGLJIKOVI NANOMATERIJALI

Pod zajedničkim imenom ugljikovi nanomaterijali (eng. *carbon nanomaterials*, CNs) podrazumjevaju se različite alotropske modifikacije ugljika kao što su fuleren, ugljikove nanocjevčice, ugljikova nanovlakna, nanodijamant te grafen i njegovi derivati.

Zbog svojih električnih, elektrokatalitičkih i mehaničkih svojstava su u zadnjih 20-ak godina (od prvih otkrića) postali zanimljivi materijali u području elektrokemijskih (bio)senzora (Wang i Lin, 2008). Također, niske su cijene, kemijski stabilni te imaju povećanu elektrokatalitičku aktivnost za različite redoks procese (Szunerits i Boukherroub, 2014). Koriste se za modifikaciju elektroda (najčešće GCE) tako da se pripremi suspenzija odabranog nanomaterijala (s ili bez prethodnog tretiranja oksidansima) te se na čistu površinu elektrode nanese njen mali volumen i ostavi da otapalo otpari, a na površini zaostane sloj nanomaterijala. Koriste se u svrhu povećavanja osjetljivosti metode (Huang i sur., 2010).

Do sada su najistraživanije ugljikove nanocjevčice (eng. *carbon nanotubes*, CNTs), a njima su prema svojstvima vodljivosti i stabilnosti vrlo slična ugljikova nanovlakna (eng. *carbon nanofibers*, CNFs). CNFs imaju cilindričnu strukturu s različito složenim listovima grafena koji izgledaju kao složene ploče, vrpca ili riblja kost. Duljina im je reda veličine mikrometra, a promjer im je od nekoliko desetaka do nekoliko stotina nanometara. Posebnost im je u tome što zbog svoje strukture i više izraženih rubova grafenskih ploča mogu povećati transfer elektrona. Dodatna prednost je što kod CNFs može biti aktivirana cijela njihova površina dodatkom funkcionalnih skupina bez da se naruši integritet nanovlakna (Huang i sur., 2010).

Grafen je monosloj ugljikovih atoma heksagonalne strukture povozanih sp^2 vezama. Kada se mnoštvo takvih slojeva složi jedan na drugi i umreži, dobiva se grafit; a ako bi se grafen zarolao nastaju strukture CNTs ili CNFs. Njegova mnoga svojstva ovise o načinu sinteze. Prednosti grafena pri korištenju u elektroanalitici su širok raspon potencijala, brza heterogena kinetika prijenosa elektrona te povećanje kapaciteta početnog materijala kao i njegova mehanička stabilnost (Szunerits i Boukherroub, 2014).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Već je spomenuto da za nepafenak ne postoje monografije niti u Europskoj farmakopeji niti u Američkoj farmakopeji. Također, ista ne postoji niti u Hrvatskoj farmakopeji. Ta činjenica je važna budući da se kao zakonska podloga u kontroli kakvoće lijekova priznaje nacionalna, europska ili eventualno neka druga međunarodno priznata farmakopeja ili norma. Stoga je važno raditi na razvoju novih metoda za određivanje nepafenaka te odabrati i standardizirati najprikladniju. U međuvremenu, dok se ne uvede standardna farmakopejska metoda za određivanje kakvoće nepafenaka, svaki laboratorij koji koristi tu supstanciju mora imati svoju razvijenu analitičku metodu što predstavlja drugi razlog za razvoj novih metoda za identifikaciju i kvantitativno određivanje nepafenaka.

Cilj ovog rada bio je istražiti može li se voltametrija kao tehnika koristiti za određivanje nepafenaka te definirati uvjete i parametre novorazvijene metode s ciljem poboljšanja odziva iste.

Doprinos ovog rada je u tome što su svi izvedeni pokusi dio postupka razvoja nove voltametrijske metode za određivanje nepafenaka.

3. MATERIALI I METODE

3.1. KEMIKALIJE

U izradi eksperimentalnog dijela ovog rada, korištene su sljedeće kemikalije:

- nepafenak (Pliva, Mr = 254,28)
- etanol 96 %-tni (GRAM-MOL, p.a., 96 %, Mr = 46,07)
- kitozan (Sigma-Aldrich)
- glacijalna octena kiselina (Panreac Quimica, Reag. Ph. Eur., 99,7 %, Mr = 60,05)
- H_3PO_4 (Lach-Ner, p.a., 85 %, Mr = 98,00)
- H_3BO_3 (Sigma-Aldrich, p.a., Mr = 61,83)
- ultračista voda
- NaOH (Sigma-Aldrich, p.a., reag. Ph. Eur., Mr = 40,00)
- grafen nanopločice (US Research Nanomaterials, Inc., Houston, SAD)
- ugljikova nanovlakna (US Research Nanomaterials, Inc., Houston, SAD)
- nafion (Sigma-Aldrich, 5 % u smjesi niskomolekularnih alifatskih alkohola i vode)

3.2. RADNI INSTRUMENTI

Za vaganje svih krutih kemijskih supstancija bila je korištena analitička vaga Mettler Toledo AG245.

Puferi su bili pripremljeni i pH vrijednosti izmjerene na digitalnom pH-metru Mettler Toledo s kombiniranom staklenom elektrodom. Kalibracija pH-metra prije upotrebe je izvršena sa standardnim otopinama pufera poznatih pH vrijednosti, $pH_1 = 4,00 \pm 0,01$ i $pH_2 = 7,00 \pm 0,01$.

Ultrazvučna kupelj Elma S 30 H Elmasonic je korištena za suspendiranje nanomaterijala korištenih za modifikaciju površine elektrode, poboljšavanje topljivosti otopina te čišćenje radne elektrode.

Voltametrijska mjerenja su provedena na voltametrijskom instrumentu koji se sastoji od potenciostata µAutolab (Eco Chemie), računala koje sadrži program GPES 4.9 kojim kontrolira spojeni potenciostat te elektrokemijskog članka s trima uronjenim elektrodama. Kao radna elektroda, korištena je elektroda od staklastog ugljika (engl. *glassy carbon electrode*; GCE, promjera 3 mm, Metrohm) kojoj je površina bila modificirana grafen pločicama i/ili ugljikovim nanovlaknima suspendiranima u nafionu ili kitozanu. Kao

referentna elektroda, korištena je Ag/AgCl elektroda (KCl 3 M, Metrohm), a pomoćna ili protuelektroda je bila platinska.

3.3. UVJETI MJERENJA

Sva su mjerenja izvedena na sobnoj temperaturi (23 ± 2 ˚C) u elektrokemijskom članku od 20 mL.

Cikločki voltamogrami su snimljeni u području potencijala od 0 do 1,2 V na GCE s različitim modifikacijama površine: grafen pločicama u 1 % otopini kitozana u octenoj kiselini, grafen pločice u 0,3 % etanolnoj otopini nafiona, grafen pločice i ugljikova nanovlakna u 0,3 % etanolnoj otopini nafiona. pH je bio mijenjan od 2 do 8 uz pomoć Britton-Robinson pufera i 0,2 M NaOH. Također su bile mijenjane i brzine promjene potencijala u rasponu od 25 do 300 mV/s, sve u svrhu optimizacije parametara metode.

Pravokutnovalni voltamogrami su snimani na GCE površine modificirane s grafen pločicama i ugljikovim nanovlaknima suspendiranima u 0,3 % etanolnoj otopini nafiona. Mjerenja su izvedena u području potencijala od 0,4 do 1,1 V te u otopini Britton-Robinson pufera pH 6. Kako uz razvoj metode ide i optimiranje parametara mjerenja, mnogi od njih su bili mijenjani kako bi se odabrali najprikladniji: frekvencija 20 - 80 Hz, amplituda pulsa 10 - 40 mV, porast potencijala 2 - 6 mV. Kada je bila korištena tehnika pretkoncentriravanja, variralo se vrijeme akumulacije od 0 do 300 s te potencijal akumulacije u rasponu od -0,2 do 0,5 V.

3.4. MODIFIKACIJA POVRŠINE ELEKTRODE I PRIPREMA ZA MJERENJE

Prije nanošenja bilo kakvog sloja materijala za modifikaciju površine elektrode, elektroda se svaki puta čistila poliranjem malim česticama Al_2O_3 na tkanini za poliranje, ispiranjem destiliranom vodom te uranjanjem u ultrazvučnu kupelj da se uklone zaostale čestice.

Nakon sušenja, na površinu elektrode se nanosilo 5 µL suspenzije nanomaterijala pripremljene u otapalu uz pomoć ultrazvučne kupelji.

U ovom radu su za modifikaciju površine radne elektrode bile korištene suspenzije:

- grafen pločica u 1 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini
- grafen pločice u 0,3 %-tnoj etanolnoj otopini nafiona
- grafen pločica i ugljikovih nanovlakana u 0,3 %-tnoj etanolnoj otopini nafiona

Po nanošenju suspenzije nanomaterijala, površina elektrode je bila ostavljena da se potpuno osuši prije no što se elektroda stavljala u uređaj i uranjala u otopinu Britton-Robinson pufera određene pH vrijednosti u kojoj su snimana dva voltamograma kako bi se ustabilila očitanja jakosti struje.

Kada se u puferu stabiliziralo očitanje struje s novopripremljenom radnom elektrodom, bila je spremna za uranjanje u otopinu analita i mjerenje voltamograma. Između svakog mjerenja analita, površina elektrode se čistila od adsorbiranih čestica uranjanjem u BR pufer i provođenjem barem po dva mjerenja u njemu. Time se minimizirao utjecaj analita zaostalog iz prethodnog mjerenja na rezultat sljedećeg mjerenja.

Nakon određenog broja mjerenja je bilo potrebno zamijeniti sloj nanomaterijala s površine radne elektrode novim. To se provodilo gore opisanim postupkom čišćenja i stavljanja novog sloja.

3.5. PRIPREMA OTOPINA

3.5.1. OTOPINE NEPAFENAKA

3.5.1.1. MATIČNA OTOPINA

Ishodišna ili matična otopina nepafenaka je bila koncentracije 1 x 10^{-3} M. Pripremljena je vaganjem 0,0025 g nepafenaka (Mr = 254,28) na analitičkoj vagi, njegovim kvantitativnim prenošenjem u odmjernu tikvicu volumena 10,0 mL te otapanjem u koncentriranom (96 %-tnom) etanolu koji je bio nadopunjen do oznake. Tako pripremljena, otopina je bila čuvana u hladnjaku s čepom na tikvici i parafilmom preko njega.

3.5.1.2. RADNE OTOPINE

Radne su otopine pripremljene razrjeđivanjem određenog volumena matične otopine s BR puferom određene pH vrijednosti u odmjernoj tikvici volumena 20,0 mL (prikazano u Tablici 2.).

Tablica 2. Priprema radnih otopina nepafenaka.

	Koncentracija	Volumen matične otopine	Ukupni volumen
Radna otopina 1	$1x10^{-4}$ M	2,0 mL	20,0 mL
Radna otopina 2	$1x10^{-5}$ M	200,0 µL	20,0 mL
Radna otopina 3	$5x10^{-6}$ M	100,0 µL	20,0 mL

3.5.2. SUSPENZIJA GRAFEN PLOČICA U SUSPENZIJI KITOZANA U 1 %-TNOJ OCTENOJ KISELINI

Najprije je bila pripremljena 1 %-tna otopina octene kiseline iz 1,0 mL čiste octene kiseline (99,7 %) uz nadopunjavanje ultračiste vode do oznake na odmjernoj tikvici volumena 100,0 mL. Potom je na analitičkoj vagi odvagan 1,0 g kitozana i suspendiran u 100,0 mL 1 %-tne octene kiseline na ultrazvučnoj kupelji. Takvom pripremom je dobivena suspenizija kitozana koncentracije 10 mg/mL koju je potrebno čuvati u hladnjaku s čepom na odmjernoj tikvici i parafilmom preko njega.

Zatim je odvagan 1 mg grafen pločica, kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu te suspendiran u 1 mL prethodno pripremljene suspenzije kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini kako bi se dobila koncentracija grafena 1 mg/mL.

3.5.3. SUSPENZIJA GRAFEN PLOČICA U 0,3 %-TNOJ ETANOLNOJ OTOPINI NAFIONA

Ishodišna otopina nafiona je bila 5 %-tna, a koncentracija 0,3 % je postignuta razrjeđivanjem 600 µL ishodišne otopine etanolom do 10,0 mL. Na analitičkoj vagi je izvagan 1 mg grafen pločica, kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu i uz pomoć ultrazvučne kupelji suspendiran u 1 mL 0,3 %-tne otopine nafiona u etanolu. Time je postignuta koncentracija suspenzije 1 mg/mL.

3.5.4. SUSPENZIJA GRAFEN PLOČICA I UGLJIKOVIH NANOVLAKANA U 0,3 %-TNOJ ETANOLNOJ OTOPINI NAFIONA

Nafion se pripremao kao 0,3 %-tna otopina tako što se 600 µL 5 %-tne otopine nafiona u etanolu razrjedilo s etanolom do 10,0 mL. Izvagano je po 1 mg grafen pločica i ugljikovih nanovlakana na analitičkoj vagi, kvantitativno preneseno u odmjerne tikvice i suspendirano u 1 mL 0,3 %-tne etanolne otopine nafiona na ultrazvučnoj kupelji. Koncentracije oba nanomaterijala su bile 1 mg/mL.

3.5.5. OTOPINA BR PUFERA

Britton-Robinson pufer se sastoji od tri kiseline: fosfatne (H_3PO_4), octene (CH_3COOH) i boratne (H_3BO_3), svaka 0,5 M. Stoga je najprije bilo potrebno pripremiti spomenute kiseline u danoj koncentraciji. U Tablici 3. je prikazan način dobivanja po 100,0 mL tih triju kiselina, svaka koncentracije 0,5 M.

Tablica 3. Prikaz postupka pripreme 100,0 mL fosforne, octene i boratne kiseline koncentracija 0,5 M

Sastavnice BR pufera	Ishodišna otopina/krutina	Količina ishodišne tvari	Otapalo	Ukupan volumen	Konačna koncentracija
Fosforna kiselina	85 %-tna fosforna kiselina	3,37 mL	Ultračista voda	100,0 mL	0,5 M
Octena kiselina	99,5 %-tna octena kiselina	2,874 mL	Ultračista voda	100,0 mL	0,5 M
Boratna kiselina	Krutina boratne kiseline	3,0915 g	Ultračista voda	100,0 mL	0,5 M

Pošto su spomenute kiseline bile pripremljene, uzimalo se svake od njih tri po 20,0 mL u odmjernu tikvicu volumena 250,0 mL i dopunilo ultračistom vodom do oznake. Time je pripremljena otopina osnovnog BR pufera kojoj je pH vrijednost 1,8 i iz koje se uz pomoć 0,2 M otopine NaOH pripremaju ostale otopine BR pufera lužnatijeg pH.

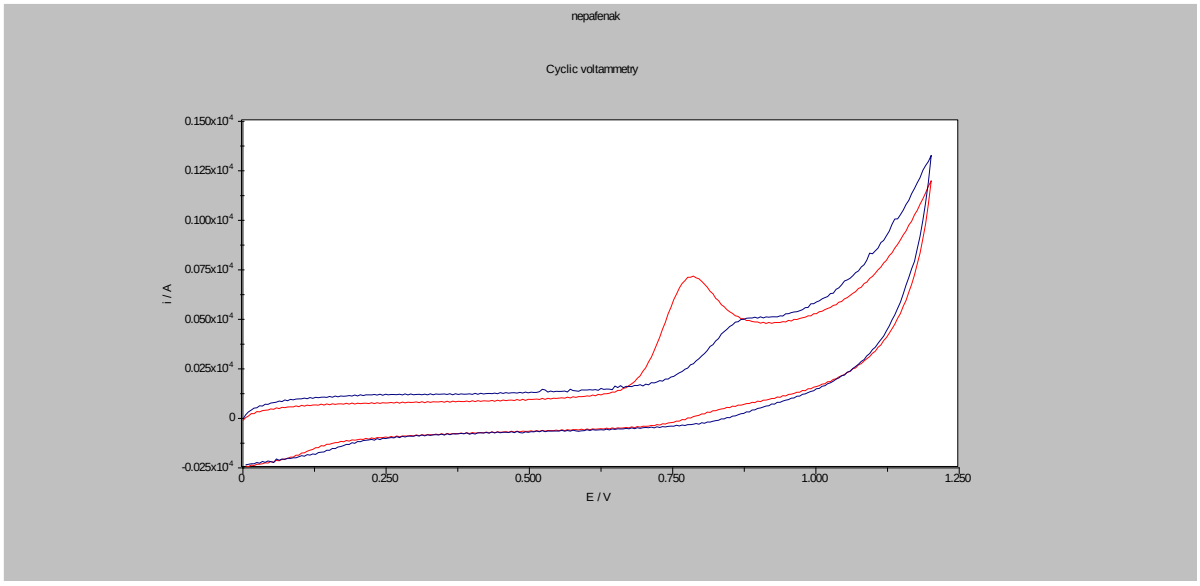
0,2 M natrijev hidroksid je pripremljen vaganjem 2,0 g NaOH i otapanjem ultračistom vodom u odmjernoj tikvici od 250,0 mL do oznake.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. DEFINIRANJE POVRŠINE MODIFICIRANE GCE I OTAPALA ZA SUSPENZIJU NANOMATERIJALA

Proveden je pokus kojim se htjelo utvrditi koje je otapalo prikladnije kao nosač grafen nanopločica za modifikaciju GCE: 1 %-tna suspenzija kitozana u octenoj kiselini ili 0,3 %-tna otopina nafiona u etanolu. Kako bi rezultati bili usporedivi, korištena je ista koncentracija grafena (1 mg/mL), isti volumen suspenzije (5 µL), ista koncentracija nepafenaka (radna otopina 1, tj 1 x 10^{-4} M), isti pH i brzina promjene potencijala.

Snimljeni su ciklički voltamogrami u rasponu potencijala 0-1,2 V i pokazalo se da je pik oksidacije nepafenaka znatno izraženiji kada je korišten grafen u 0,3 %-tnoj etanolnoj otopini nafiona nego kitozanu (Slika 7.).

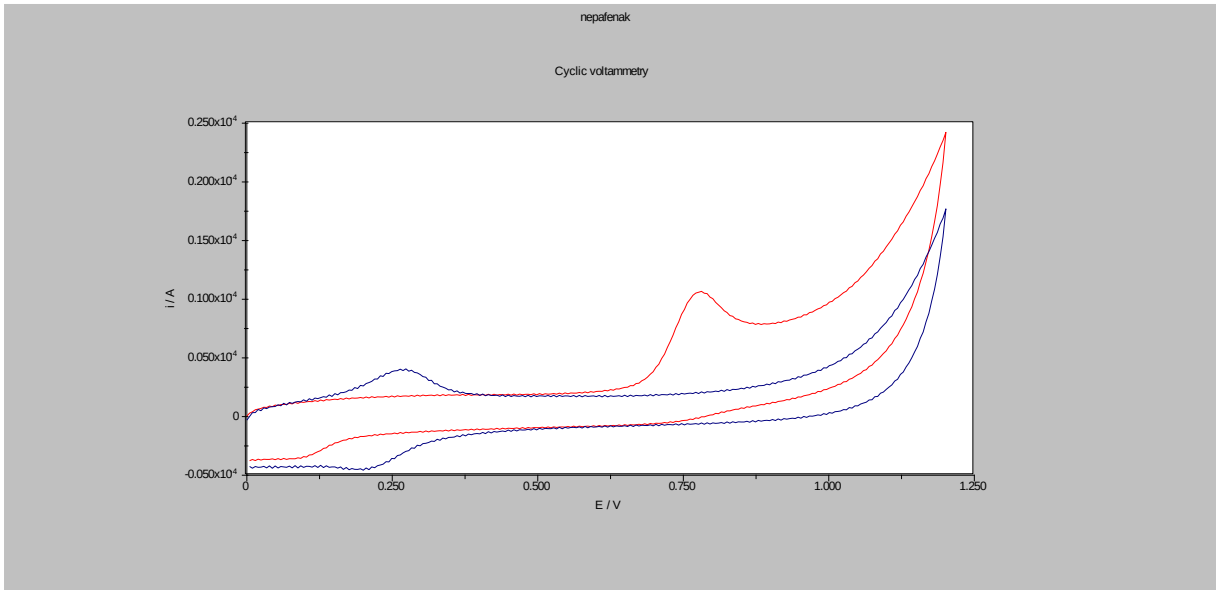


Slika 7. Ciklički voltamogrami nepafenaka koncentracije 1 x 10^{-4} M u BR puferu pH 6 snimljen pri brzini promjene potencijala 100 mV/s pri čemu je GCE modificirana s grafenom u 0,3 %-tnoj etanolnoj otopini nafiona (crveno) i grafenom u suspenziji kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini (plavo)

Ispitana je i mogućnost dobivanja još boljeg odaziva analita ako se koristi mješavina dvaju tvari nano dimenzija u odnosu na suspenziju samih grafen pločica. Kada je u 1 mL 0,3 %-tne etanolne otopine nafiona suspendirano po 1 mg grafen nanopločica i 1 mg ugljikovih nanovlakana, dobiven je oštriji pik veće visine koji se lakše mjeri. Stoga je za sva daljnja ispitivanja GCE bila površine modificirane suspenzijom grafen nanopločica i ugljikovih

nanovlakana u 0,3 %-tnoj otopini nafiona u etanolu te je površina elektrode bila čišćena u otopini pufera, a obnavljala se stavljanjem novog sloja nanomaterijala nakon određenog broja mjerenja.

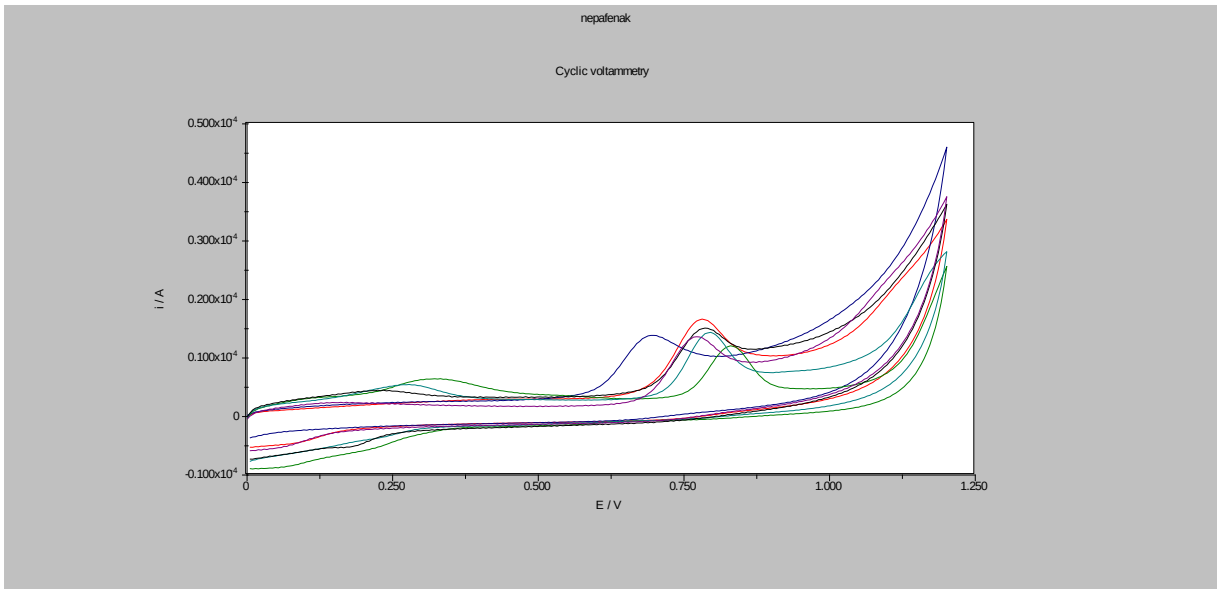
Na Slici 8. je prikazana usporedba mjerenja nepafenaka s GCE na kojoj je sloj dvaju nanomaterijala s mjerenjem slijepog uzorka istom tom elektodom. Slijepi uzorak (ili *background*) zapravo sadrži samo BR pufer pH 6.



Slika 8. Usporedba cikličkih voltamograma 1 x 10^{-4} M nepafenaka u BR puferu pH 6 (crveno) i samog BR pufera pH 6 (plavo), snimljenih GCE površine modificirane s grafen nanopločicama i ugljikovim nanovlaknima u 0,3 %-tnoj otopini nafiona u etanolu.

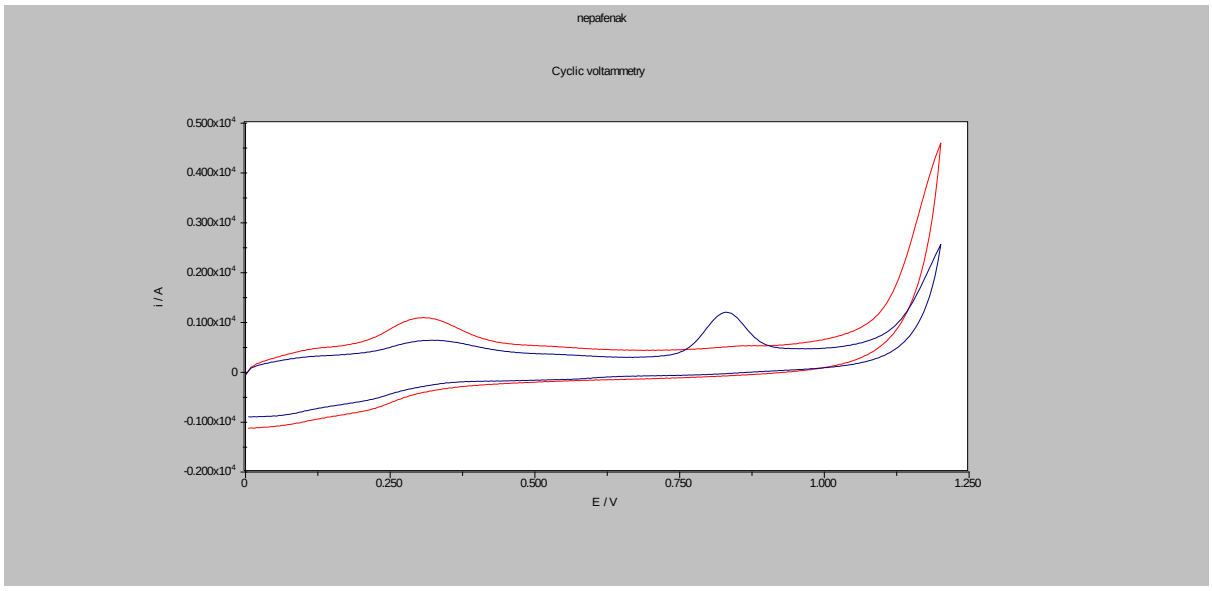
4.2. ODABIR pH OTOPINE ZA ANALIZU

Proveden je pokus u kojem se ispitivao odgovor analita iste koncentracije i u istim uvjetima osim pH vrijednosti BR pufera s kojim je bila pripremljena radna otopina. Korištene su pH vrijednosti od 2 do 8 te su rezultati prikazani na Slici 9. Pokazalo se da se potencijal oksidacije pomiče prema manjim vrijednostima s porastom pH, tj. da će do oksidacije lakše doći u lužnatom mediju. Pri niskim pH vrijednostim je uočen predpik na oko 0,3 V koji se gubi porastom pH, ali što je više rastao pH uočeno je rastezanje ili „*tailing*“ pika što narušava njegovu simetriju i otežava kvantifikaciju. Uzevši sve navedeno u obzir, odabran je BR pufer pH vrijednosti 6 kao najbolji medij za analizu nepafenaka.



Slika 9. Ciklički voltamogrami nepafenaka koncentracije 1 x 10^{-4} M snimljeni pri brzini promjene potencijala 100 mV/s na GCE površine modificirane s grafen nanopločicama i ugljikovim nanovlaknima (oboje 1 mg/mL) u 0,3 %-tnoj etanolnoj otopini nafiona pri različitim pH vrijednostima radnih otopina: pH 2 (zeleno), pH 4 (tirkizno), pH 5 (crno), pH 6 (crveno), pH 7 (ljubičasto) i pH 8 (plavo)

Prilikom ispitivanja ponašanja nepafenaka u različitim pH vrijednostima otopina, uočena je njegova razgradnja u kiselom. Snimljeni su ciklički voltamogrami nepafenaka u BR puferu pH 2 odmah po pripravi radne otopine te 3 sata nakon toga. Prikazano na Slici 10., vidljivo je da je vrh oksidacije nepafenaka u otopini koja je stajala nestao što može značiti da se oksidirao prije mjerenja (tijekom stajanja) ili je došlo do nekog drugog oblika razgradnje u tako kiselom mediju. Također, otopina koja je stajala, pokazala je porast predpika.



Slika 10. Razgradnja nepafenaka u kiselom pH. CV, nepafenak koncentracije 1 x 10^{-4} M u BR puferu pH 2 odmah po pripravi radne otopine (plavo) i nakon stajanja (crveno). Uvjeti mjerenja: brzina promjene potencijala 100 mV/s, GCE površine modificirane s ugljikovim nanovlaknima i grafen nanopločicama (oboje po 1 mg/mL) u 0,3 %-tnoj otopini nafiona u etanolu

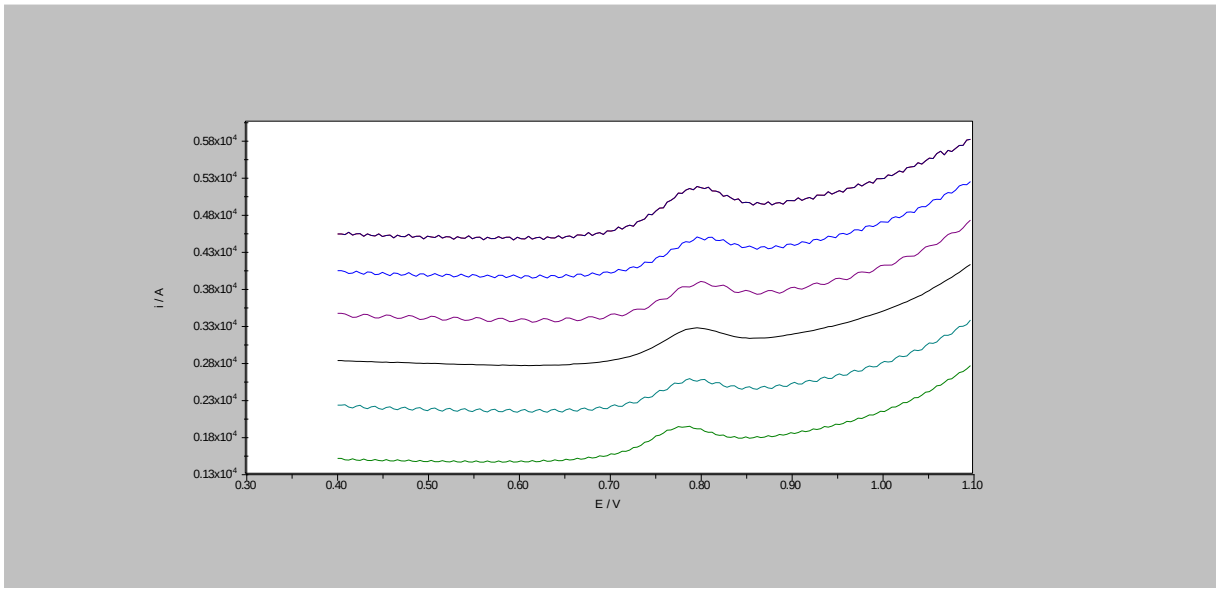
4.3. OPTIMIRANJE PARAMETARA PRAVOKUTNOVALNE VOLTAMETRIJE

Kako bi osjetljivost metode bila što bolja, rađeni su pokusi u kojima su jedan po jedan bili varirani parametri SWV: frekvencija, amplituda pulsa i porast potencijala. Pokusi su izvedeni s nepafenakom koncentracije 1 x 10^{-5} M u BR puferu pH 6, mjereno GCE modificirane površine s grafenom i ugljikovim nanovlaknima (oboje koncentracije 1 mg/mL) u 0,3 %-tnoj otopini nafiona u etanolu. Za razliku od svih prethodnih mjerenja kod CV, ova su mjerenja provedena u području potencijala 0,4 - 1,1 V jer se tim obuhvatio oksidacijski vrh analita, a skratilo vrijeme analize.

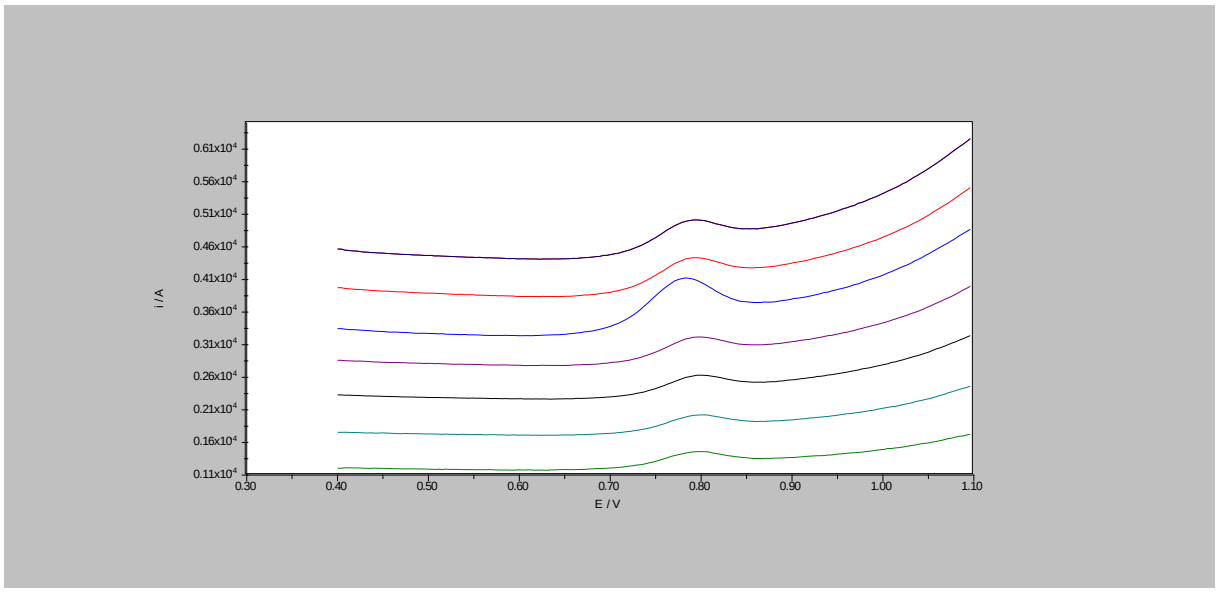
Vrijednosti frekvencije su mijenjane od 30 do 80 Hz. Kako je rasla frekvencija, krivulje odaziva su se nalazile na sve većim vrijednostima struja, tj. svako sljedeće mjerenje je zabilježeno translatirano po y osi u pozitivnom smijeru, gotovo paralelno prethodnim mjerenjima (Slika 11.). Najbolje definirana krivulja odaziva je dobivena s frekvencijom od 50 Hz.

Amplituda pulsa se povećavala za 5 mV, od 10 do 40 mV. Također su veće vrijednosti tog parametra snimljene na većim vrijednostima struja, a uvjerljivo najizraženiji strujni vrh analita je postignut s amplitudom pulsa od 30 mV (Slika 12.).

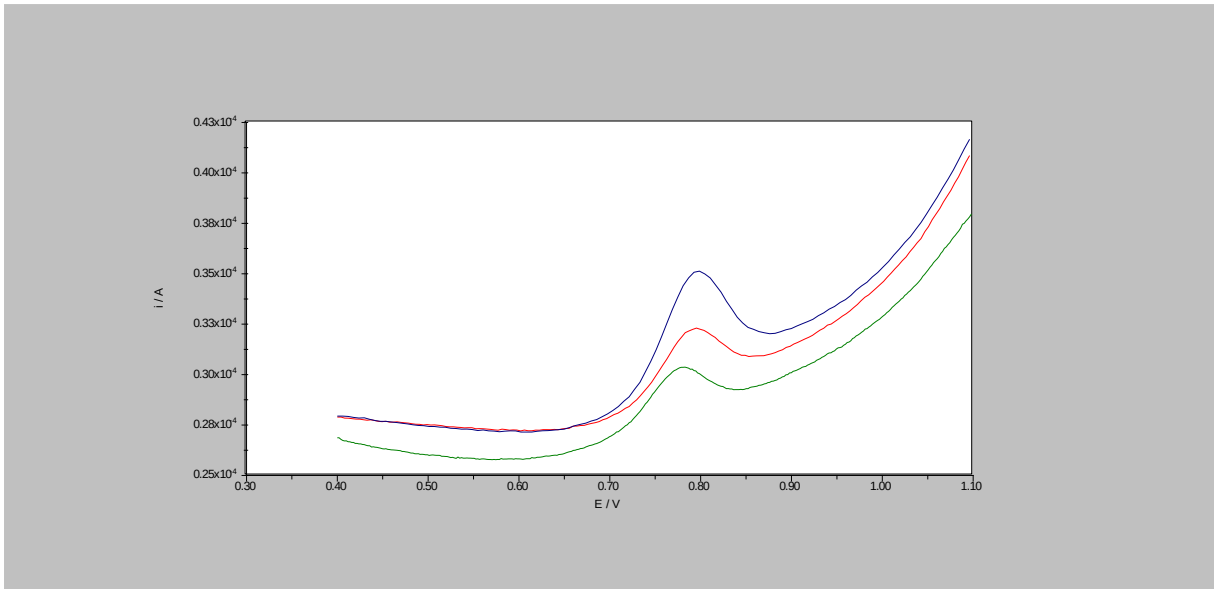
Treći mijenjani parametar je bio porast potencijala te su zabilježeni voltamogrami pri njegovim vrijednostima od 2, 4 i 6 mV (Slika 13.), pri čemu je najveći oksidacijski vrh nepafenaka ostvaren pri promjeni potencijala od 6 mV.



Slika 11. Pravokutnovalni voltamogrami nepafenaka koncentracije 1 x 10^{-5} M u BR puferu pH 6 snimljeni pri različitim frekvencijama: 30 Hz (zeleno), 40 Hz (tirkizno), 50 Hz (crno), 60 Hz (ljubičasto), 70 Hz (modro) i 80 Hz (tamno plavo). Ostali uvjeti mjerenja: GCE površine modificirane s grafen nanopločicama i ugljikvim nanovlaknima (oboje 1 mg/mL) u 0,3 %-tnoj etanolnoj otopini nafiona; amplituda pulsa 25 mV te porast potencijala od 4 mV

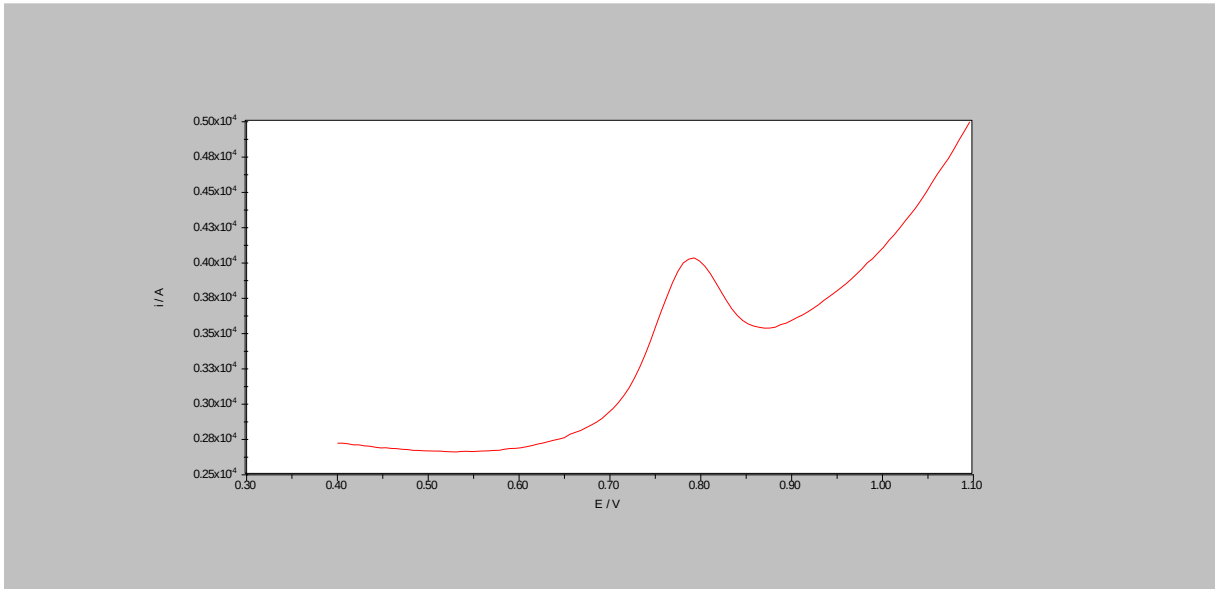


Slika 12. Pravokutnovalni voltamogrami nepafenaka koncentracije 1 x 10^{-5} M u BR puferu pH 6 snimljeni pri različitim amplitudama pulsa: 10 mV (zeleno), 15 mV (tirkizno), 20 mV (crno), 25 mV (ljubičasto), 30 mV (plavo), 35 mV (crveno) i 40 mV (tamno plavo). Ostali uvjeti mjerenja: GCE površine modificirane s grafen nanopločicama i ugljikvim nanovlaknima (oboje 1 mg/mL) u 0,3 %-tnoj etanolnoj otopini nafiona; uz frekvenciju 50 Hz te porast potencijala od 4 mV



Slika 13. Pravokutnovalni voltamogrami nepafenaka koncentracije 1 x 10^{-5} M u BR puferu pH 6 snimljeni pri različitim porastima potencijala: 2 mV (zeleno), 4 mV (crveno) i 6 mV (plavo). Ostali uvjeti mjerenja: GCE površine modificirane s grafen nanopločicama i ugljikvim nanovlaknima (oboje 1 mg/mL) u 0,3 %-tnoj etanolnoj otopini nafiona; uz frekvenciju 50 Hz te amplitudu pulsa 25 mV

Nakon provedenih pokusa, odabrane su one vrijednosti parametara pravokutnovalne voltametrije koje su pokazivale najbolji strujni vrh nepafenaka, a to su frekvencija 50 Hz, amplituda pulsa 30 mV i porast potencijala 6 mV te je snimljen voltamogam s takvim, optimalnim, parametrima metode za nepafenak (prikazano na Slici 14.).

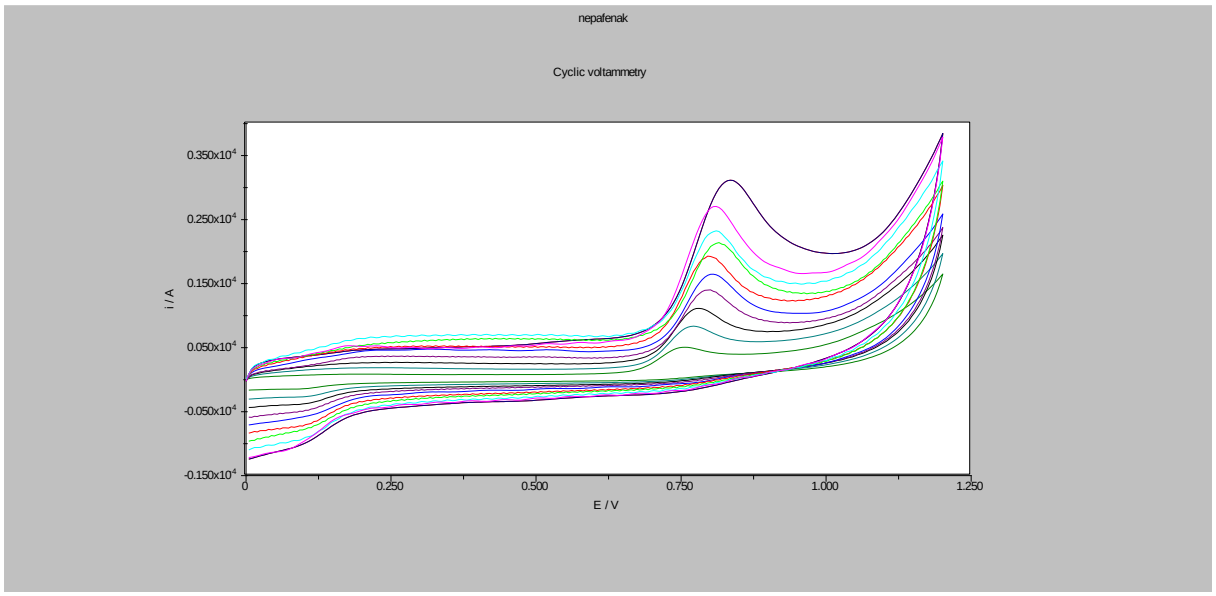


Slika 14. Optimalni uvjeti SWV za određivanje nepafenaka. Snimljen je nepafenak koncentracije 1 x 10^{-5} M u BR puferu pH 6 na GCE površine modificirane s grafen nanopločicama i ugljikovim nanovlaknima (oboje koncentracije 1 mg/mL) u 0,3 %-tnoj etanolnoj otopini nafiona uz parametre mjerenja: frekvencija 50 Hz, amplituda pulsa 30 mV i porast potencijala od 6 mV

4.4. UTJECAJ BRZINE PROMJENE POTENCIJALA NA STRUJNI VRH NEPAFENAKA

Izvedeni su pokusi kojima se ispitivao utjecaj brzina promjene potencijala u CV na odgovor analita. Ispitivana otopina je bila nepafenak koncentracije 1 x 10^{-4} M u BR puferu pH 6, a mjerenja su izvedena s GCE površine modificirane s ugljikovim nanovlaknima i grafen pločicama (oboje koncentracije 1 mg/mL) u 0,3 %-tnoj etanolnoj otopini nafiona. Brzina promjene potencijala se povećavala za 25 mV/s u rasponu od 25 mV/s do 250 mV/s.

S većim brzinama promjene potencijala i strujni vrhovi oksidacije nepafenaka su postali sve veći i izraženiji, uz napomenu da su pikovi nakon određenih vrijednosti brzine promjene potencijala sve razvučeniji. Linearni odnos brzine promjene potencijala i strujnog vrha nepafenaka ukazuje da je elektrooksidacija lijeka na površini modificirane GCE adsorpcijski kontrolirana elektrodna reakcija te da bi se to moglo koristiti u razvoju osjetljive *stripping* voltametrijske metode za analizu nepafenaka.



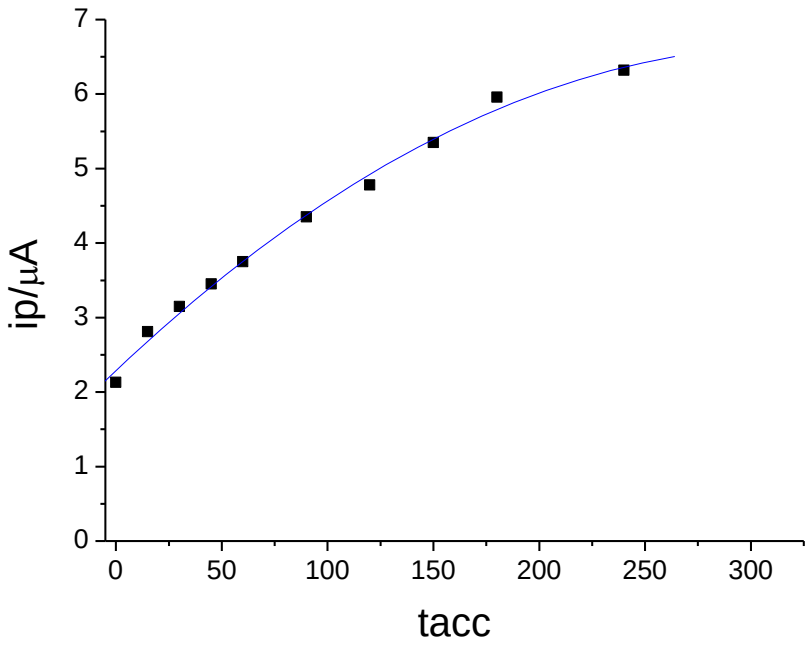
Slika 15. Ciklički voltamogrami nepafenaka koncentracije 1 x 10^{-4} M u BR puferu pH 6, snimljeni s GCE površine modificirane s grafen nanopločicama i ugljikovim nanovlaknima (oboje 1 mg/mL) u 0,3 %-tnoj etanolnoj otopini nafiona. Korištene su različite brzine promjene potencijala: 25 mV/s (maslinasto zeleno), 50 mV/s (tirkizno), 75 mV/s (crno), 100 mV/s (ljubičasto), 125 mV/s (plavo), 150 mV/s (crveno), 175 mV/s (zelena), 200 mV/s (neon zelena), 225 mV/s (purpurna) i 250 mV/s (tamno plava)

4.5. STRIPPING VOLTAMETRIJA

Izvedeni su pokusi s pravokutnovalnom voltametrijom gdje su mjerenja započeta tek nakon što su elektrode bile uronjene određeno vrijeme (tj. vrijeme akumulacije) u ispitivanu otopinu, a za to vrijeme odgode mjerenja je bio nametnut i određeni potencijal. Ispitivana su različita vremena akumulacije i različiti potencijali akumulacije te kakav utjecaj imaju na odgovor analita.

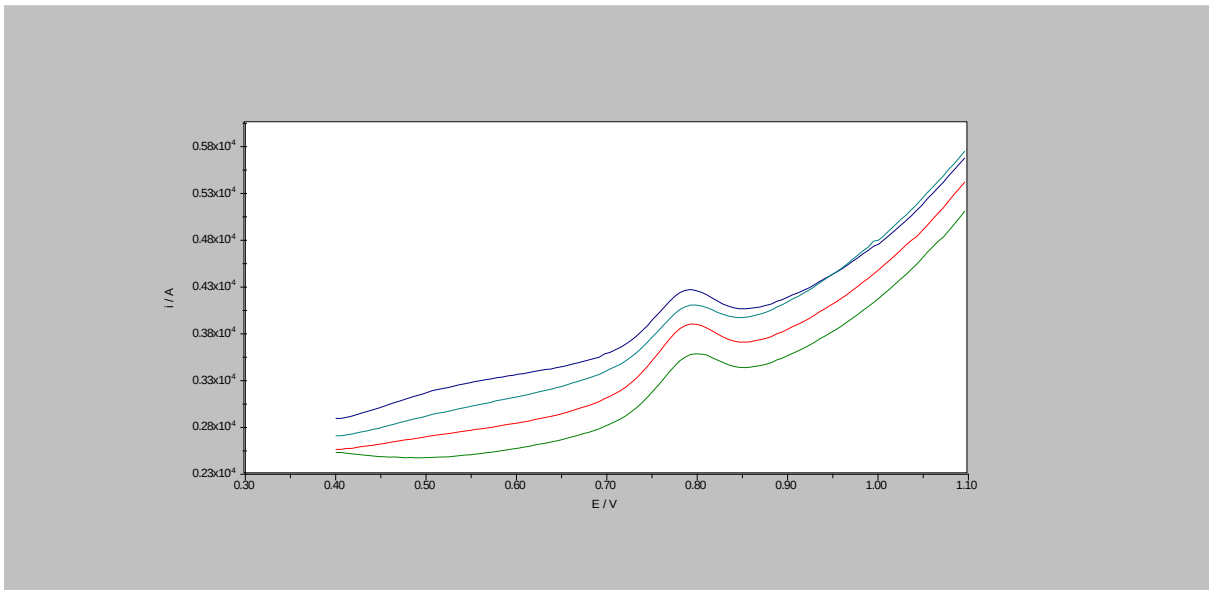
Za ispitivanje je korištena otopina nepafenaka koncentracije 5 x 10^{-6} M u BR puferu pH 6. Parametri SWV su postavljeni prema u ranijem pokusu utvrđenim optimalnim vrijednostima: frekvencija 50 Hz, amplituda pulsa 30 mV i porast potencijala od 6 mV. Mjereno je s GCE kojoj je površina bila modificirana s grafen nanopločicama i ugljikovim nanovlaknima (oboje po 1 mg/mL) u 0,3 %-tnoj etanolnoj otopini nafiona.

Vrijeme akumulacije se mijenjalo od 0 do 300 s u sljedećem nizu: 0 s, 15 s, 30 s, 45 s, 60 s, 90 s, 120 s, 180 s, 240 s i 300 s. Zabilježeni su voltamogrami i izmjerene vrijednosti strujnih vrhova. S porastom vremena akumulacije su i strujni vrhovi bili sve većih vrijednosti. Kako bi se utvrdio njihov odnos, napravljen je grafički prikaz ovisnosti izmjerenog strujnog vrha o vremenu akumulacije (Slika 16.) koji pokazuje linearnu ovisnost izmjerenih vrijednosti struja o vremenu akumulacije u prvih 60 sekundi. To znači da ima smisla analit ostaviti do 60 sekundi da se pretkoncentrira na elektrodi prije mjerenja jer se dobije veći odaziv, tj. lakše uočljiv i mjerljiv rezultat. Duže od 60 sekundi nije opravdano jer se neće dobiti razmjerno veći odgovor, a produljuje se vrijeme analize.



Slika 16. Grafički prikaz ovisnosti izmjerenog strujnog vrha nepafenaka koncentracije 5 x 10^{-6} M o vremenu akumulacije kod *stripping* SWV.

Nakon vremena akumulacije, mijenjao se i potencijal kojem je ispitivana otopina bila izložena tijekom vremena akumulacije. Sve promjene potencijala akumulacije su ispitane na vremenu akumulacije od 60 s zbog prethodno utvrđene linearne ovisnosti izmjerene vrijednosti strujnog vrha o vremenu akumulacije do 60 s. Ispitani su potencijali akumulacije: -0,2 V, 0 V, 0,2 V i 0,5 V te su rezultati prikazani na Slici 17. Najbolji rezultat je uočen kod potencijala akumulacije od 0,2 V.



Slika 17. Pravokutnovalni voltamogrami nepafenaka koncentracije 5 x 10^{-6} M u BR puferu pH 6 snimljeni stripping tehnikom s različitim potencijalima akumulacije na GCE kojoj je površina modificirana s grafen nanopločicama i ugljikovim nanovlaknima (oboje 1 mg/mL) u 0,3 %-tnoj etanolnoj otopini nafiona. Parametri SWV: frekvencija 50 Hz, amplituda pulsa 30 mV i porast potencijala 6 mV. Za vrijeme akumulacije od 60 s, potencijali akumulacije su bili: - 0,2 V (plavo), 0 V (tirkizno), 0,2 V (crveno) te 0,5 V (zeleno).

4.6. LINEARNOST

Kako bi se metoda mogla koristiti u kvantifikaciji, bilo je potrebno eksperimentalno odrediti postoji li područje linearnosti te kakav je odnos izmjerenih struja i koncentracije nepafenaka.

Za tu svrhu je pripremljen koncentracijski niz otopina nepafenaka koje su onda mjerene svaka po tri puta pravokutnovalnom voltametrijom s prethodnom akumulacijom analita na modificiranoj površini GCE. Zabilježeni su voltamogrami (Slika 18. i Slika 19.) te je

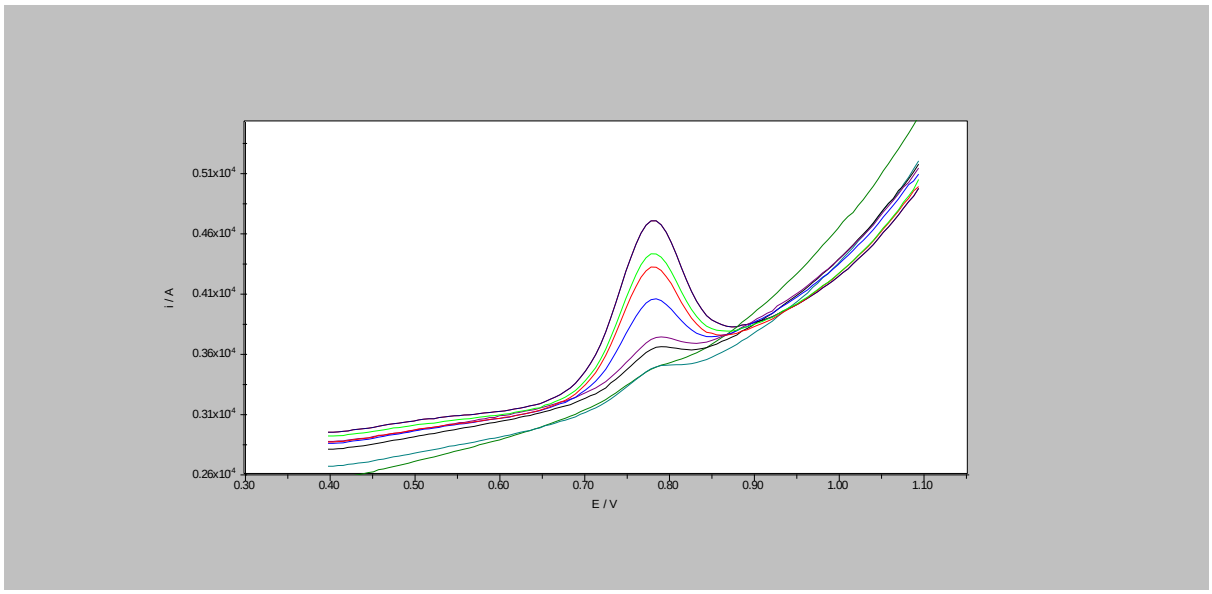
izmerena visina strujnog pika za svaku koncentraciju i napravljen je grafički prikaz njene ovisnosti o koncentraciji koji predstavlja eksperimentalno dobiveni kalibracijski pravac (Slika 20.).

Ispitivane otopine nepafenaka priređene su u BR puferu pH 6, a cijeli koncentracijski niz je dobiven razrjeđivanjem matične otopine. Korištene koncentracije nepafenaka, volumeni matične otopine i način razrjeđivanja su prikazani u Tablici 4. Ostali parametri i uvjeti ispitivanja su bili isti kako je prethodnim pokusima utvrđeno da su optimalni. To dakle za parametre SWV znači frekvencija 50 Hz, amplituda pulsa 30 mV i porast potencijala 6 mV. Korištena je i akumulacija u trajanju od 60 s i s prisutnim potencijalom akumulacije 0,2 V. Sva mjerenja su izvedena s GCE kojoj je površina bila modificirana grafen nanopločicama i ugljikovim nanovlaknima (oboje po 1 mg/mL) u 0,3 %-tnoj etanolnoj otopini nafiona.

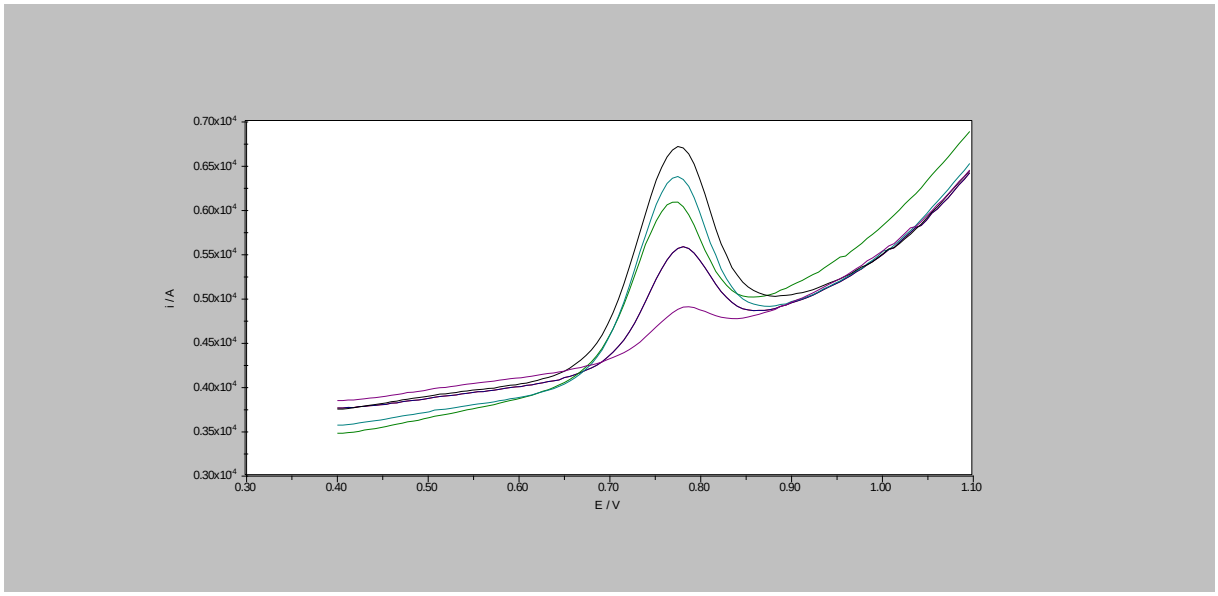
Tablica 4. Prikaz razrjeđivanja matične otopine nepafenaka (1 x 10^{-3} M) i dobivanje koncentracijskog niza za ispitivanje linearnosti

Redni broj	Koncentracija	Volumen matične otopine	Sredstvo za razrjeđivanje	Ukupni volumen
1	2,5 x 10^{-7} M	5 µL*	BR pH 6	20 mL
2	5 x 10^{-7} M	10 µL*	BR pH 6	20 mL
3	7,5 x 10^{-7} M	15 µL*	BR pH 6	20 mL
4	1 x 10^{-6} M	20 µL*	BR pH 6	20 mL
5	2 x 10^{-6} M	40 µL	BR pH 6	20 mL
6	2,5 x 10^{-6} M	50 µL	BR pH 6	20 mL
7	4 x 10^{-6} M	80 µL	BR pH 6	20 mL
8	5 x 10^{-6} M	100 µL	BR pH 6	20 mL
9	6 x 10^{-6} M	120 µL	BR pH 6	20 mL
10	7,5 x 10^{-6} M	150 µL	BR pH 6	20 mL
11	1 x 10^{-5} M	200 µL	BR pH 6	20 mL
12	1,5 x 10^{-5} M	300 µL	BR pH 6	20 mL
13	2 x 10^{-5} M	400 µL	BR pH 6	20 mL

* ove otopine priređene su razrijeđivanjem 1 x 10^{-4} M otopine nepafenaka. Navedeni volumeni se odnose na količinu potrebne matične otopine nepafenaka koncentracije 1 x 10^{-3} M, no budući su to sve mali volumeni, bilo je potrebno najprije razrijediti do 1 x 10^{-4} M.



Slika 18. Pravokutnovalni voltamogrami jednog dijela koncentracijskog niza otopina nepafenaka u BR puferu pH 6 snimljeni pri optimalnim uvjetima. Prikazane su koncentracije: 2,5 x 10^{-7} M (maslinasto zelena), 5 x 10^{-7} M (tirkizno), 7,5 x 10^{-7} M (crno), 1 x 10^{-6} M (ljubičasto), 2,5 x 10^{-6} M (plavo), 4 x 10^{-6} M (crveno), 5 x 10^{-6} M (zeleno) i 7,5 x 10^{-6} M (tamno plavo)



Slika 19. Pravokutnovalni voltamogrami drugog dijela koncentracijskog niza otopina nepafenaka u BR puferu pH 6 snimljeni pri optimalnim uvjetima. Prikazane koncentracije: 2 x 10^{-6} M (ljubičasto), 6 x 10^{-6} M (plavo), 1 x 10^{-5} M (maslinasto zeleno), 1,5 x 10^{-5} M (tirkizno) i 2 x 10^{-5} M (crno)

Nakon što su sve te otopine bile pripremljene i izmjerene, na svakom voltamogramu je izmjerena visina strujnog pika i taj rezultat je grafički doveden u vezu s odgovarajućom koncentracijom (Slika 20.). Primijećeno je da postoje dva područja linearnosti te su izračunate jednadžbe kalibracijskih pravaca kojima oni odgovaraju.

Za područje koncentracija od 2,5 x 10^{-7} M do 4 x 10^{-6} M vrijedi kalibracijski pravac:

$$ip\ (\mu A) = 2{,}00 \times 10^{6}\ c\ (M) + 0.24$$

uz koeficijent korelacije 0,9988.

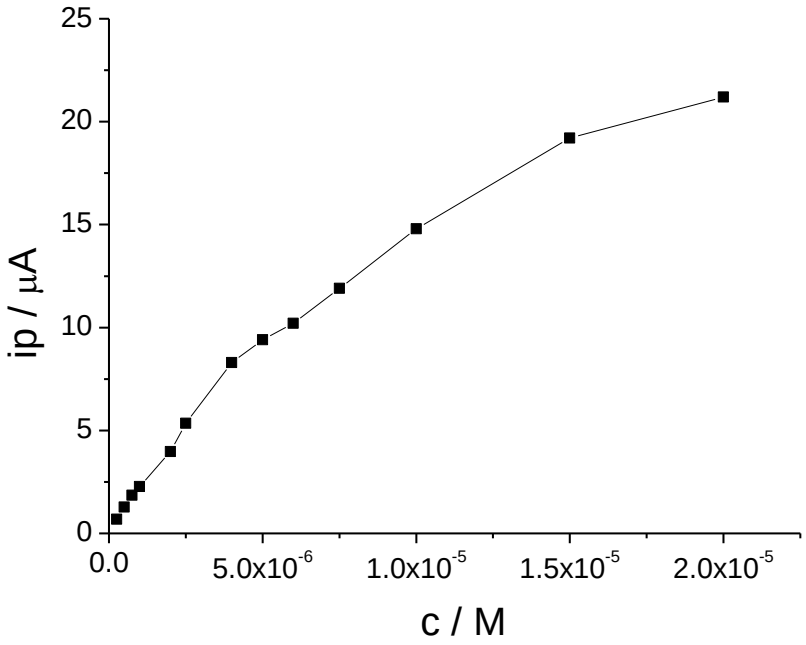
Za područje koncentracija od 4 x 10^{-6} M do 1,5 x 10^{-5} M vrijedi drugi kalibracijski pravac:

$$ip\ (\mu A) = 1{,}00 \times 10^{6}\ c\ (M) + 4.36$$

uz koeficijent korelacije 0,9985.

Tim područjima nisu obuhvaćene koncentracije iznad 1,5 x 10^{-5} M jer se mjerenjem s ovom metodom nije dobio linearan odgovor. Vjerojatno dolazi do zasićenja modificirane površine elektrode.

Koncentracija 4 x 10^{-6} M spada u oba linearna područja (na Slici 20. je to 7. točka gledano i s lijeva i s desna) i prema njoj će se najlakše orijentirati koji kalibracijski pravac koristiti prilikom kvantitativne analize.



Slika 20. Grafički prikaz ovisnosti strujnog vrha nepafenaka o koncentraciji.

5. ZAKLJUČCI

1) Usporedba pokusa s različitim nanomaterijalima i otapalima za pripremu njihovih suspenzija pokazala je da analit daje najbolji odgovor kada se običnoj elektrodi od staklastog ugljika modificira površina s grafen nanopločicama i ugljikovim nanovlaknima u 0,3 %-tnoj etanolnoj otopini nafiona.
2) Najprikladniji pH elektrolita za analizu nepafenaka je pH 6.
3) Utvrđeni su optimalni parametri metode pravokutnovalne voltametrije za nepafenak i to su: frekvencija 50 Hz, amplituda pulsa 30 mV i porast potencijala od 6 mV.
4) Cikličkom voltametrijom iz ovisnosti oksidacijskog strujnog vrha nepafenaka o brzini promjene potencijala utvrđeno je da je elektrooksidacija lijeka na površini modificirane GCE adsorpcijski kontrolirana elektrodna reakcija te da bi se adsorpcija lijeka mogla koristiti u razvoju osjetljive *stripping* voltametrijske metode za analizu nepafenaka.
5) Eksperimenti su pokazali da je optimalno vrijeme akumulacije 60 sekundi pri potencijalu od 0,2 V u razvoju metode pretkoncentriravanja u svrhu postizanja najboljeg mogućeg odziva nepafenaka.
6) Kod ispitivanja linearnosti metode uočena su dva područja linearnosti koja su okarakterizirana dvama kalibracijskim pravcima ovisnosti strujnog vrha o koncentraciji:

$$ip = 2{,}00 \times 10^{6}\ c + 0.24$$

$$ip = 1{,}00 \times 10^{6}\ c + 4.36$$

čija je zajednička (prijelomna) točka koncentracije 4×10^{-6} M, a pravci zajedno obuhvaćaju koncentracije od $2{,}5 \times 10^{-7}$ M do $1{,}5 \times 10^{-5}$ M. Sve iznad $1{,}5 \times 10^{-5}$ M više ne spada u područje linearnosti metode jer dolazi do zasićenja površine elektrode.

6. LITERATURA

1) Brooks MA, Tsai EW. Elctrochemistry in Pharmaceutical Analysis in Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry. Kissinger PT, Heineman WR, urednici, New York-Basel , Marcel Dekker Inc., 1996, 769-812.
2) Cervini P, Cavalheiro ETG. Determination of hydroquinone in a square wave voltammetry procedure using a graphite-polyurethane composite electrode. *Eclet. Quím*. 2006, vol.31 no.4 São Paulo
3) CV: ilustracija promjene potencijala, https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=10624, pristupljeno 30.6.2018
4) CV: prikaz voltamograma, https://en.wikipedia.org/wiki/Cyclic_voltammetry, pristupljeno 30.6.2018.
5) Duan P, Liu Y, Li J. The comparative efficacy and safety of topical non-steroidal anti-inflammatory drugs for the treatment of anterior chamber inflammation after cataract surgery: a systematic review and network meta-analysis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2017 Apr;255(4):639-649.
6) Elektrokemijski članak, http://pubs.rsc.org/-/content/articlehtml/2015/ay/c4ay90088j, pristupljeno 28.6.2018.
7) European Pharmacopoeia 8th ed., Council of Europe, Strasbourg, 2014
8) Huang J, Liu Y, You T. Carbon nanofiber based electrochemical biosensors: A review. *Anal. Methods*, 2010, 2, 202-211
9) Katarakta, http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/oftalmologija/katarakta, pristupljeno 23.6.2018.
10) Kounaves SP. Voltammetric Techniques. U: Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry. Frank A Settle, Upper Saddle River, NJ : Prentice Hall PTR, 1997, str 709-725
11) Lim BX, Lim CH, Lim DK, Evans JR, Bunce C, Wormald R. Prophylactic non-steroidal anti-inflammatory drugs for the prevention of macular oedema after cataract surgery. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016 Nov 1;11:CD006683.
12) Nepafenak: godina puštanja u promet i način doziranja (Sažetak za javnost kod puštanja u promet), http://www.ema.europa.eu/docs/hr_HR/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000818/WC500027153.pdf, pristupljeno 3.12.2017.
13) Nepafenak: indikacije (SMPC), http://www.ema.europa.eu/docs/hr_HR/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000818/WC500027158.pdf, pristupljeno 20.11.2017.

14) Nepafenak: mehanizam djelovanja, https://www.drugs.com/monograph/nepafenac.html, pristupljeno 3.12.2017.
15) Nepafenak: struktura, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nepafenac#section=2D-Structure, pristupljeno 20.11.2017.
16) Nigović B, Behetić S. Elektroanalitika u farmaciji. *Farm. Glas.* 63, 3/2007
17) Rusling JF, Kumosinski TF. Nonlinear Computer Modeling of Chemical and Biochemical Data. San Diego, Academic press, 1996. str. 177-205
18) Szunerits S, Boukherroub R. Electrochemistry of graphene: The current state of art. *Electrochemistry*, 2013, 12, 211–242
19) Uslu B, Ozkan SA. Solid Electrodes in Electroanalytical Chemistry: Present Application and Prospect for High Throughput Screening of Drug Compounds. *Comb Chem High T Scr*, 2007, 10, 495-513.
20) Wang J. Analytical Electrochemistry. New York, Wiley - VHC Publishers, 2000.
21) Wang J, Lin Y. Functionalized carbon nanotubes and nanofibers for biosensing applications. *Trends Analyt Chem*. 2008, 27(7): 619–626.
22) Xu K, Dexter SC, Luther GW. Voltammetric Microelectrodes for Biocorrosion Studies. *Corrosion* -Houston Tx-, 1998, 54(10):814-823
23) Zhao X, Xia S, Wang E, Chen Y. Comparison of the efficacy and patients' tolerability of Nepafenac and Ketorolac in the treatment of ocular inflammation following cataract surgery: A meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One*. 2017 Mar 2;12(3):e0173254

7. SAŽETAK/SUMMARY

7.1. SAŽETAK

Nepafenak je nesteroidni protuupalni lijek koji se koristi za prevenciju i liječenje postoperativne boli i upale povezane s operacijom katarakte te smanjenje rizika za pojavu makularnog edema nakon operacije katarakte kod bolesnika s dijabetesom.

U eksperimentalnom dijelu rada proveden je niz pokusa koji čine dio razvoja nove voltametrijske metode za određivanje nepafenaka. Ispitan je utjecaj modifikacije radne elektrode od staklastog ugljika na voltametrijski odziv nepafenaka pri čemu su korištene grafen nanopločice i/ili ugljikova nanovlakna u otopini kitozana ili nafiona. Napravljen je probir pH vrijednosti Britton-Robinson pufera koji je služio kao elektrolit za mjerenja. Jedan od koraka u radu bila je optimizacija parametara pravokutnovalne voltametrijske metode. Cikličkom voltametrijom utvrđeno je da je oksidacija nepafenaka na modificiranoj elektrodi adsorpcijski kontrolirana elektrodna reakcija te da bi se adsorpcija lijeka mogla koristiti u razvoju osjetljive *stripping* voltametrijske metode za analizu nepafenaka. Određeno je optimalno vrijeme i potencijal akumulacije za ukoncentriravanje analita na površini modificirane elektrode. Naposljetku, nakon što su parametri i uvjeti metode bili u potpunosti definirani, odrađen je jedan dio validacije metode. Naime, proveden je pokus koji je za cilj imao utvrditi područje linearnosti i dati eksperimentalne kalibracijske krivulje koje bi se mogle koristiti kod određivanja sadržaja nepafenaka.

7.2. SUMMARY

Nepafenac is a nonsteroidal anti-inflammatory drug and is used for prevention and treatment of pain and inflammation after the cataract surgery. It is also used as a prophylactic drug for prevention of macular oedema after the cataract surgery in patients with diabetes.

In the experimental part of this thesis, a number of experiments were carried out as a part of development of a new voltametric method for the determination of nepafenac.The influence of surface modification of working glassy carbon electrode on nepafenac response was investigated and the graphene nanoplatelets and/or carbon nanofibers in solutions with chitosan or nafion were used. The selection of a pH values of Britton-Robinson buffer solution which was used as an electrolyte solution during measurements was made. The optimization of the parameters of a method for a square-wave voltammetry was one of the steps in an experimental procedure. Cyclic voltammetry has shown that the oxidation of nepafenac on modified electrode is an adsorption-controlled electrode reaction. Furthermore, adsorption of nepafenac could be used in development of a sensitive stripping voltametric method for analysis of nepafenac. Duration of accumulation and deposition potential were determined. Last but not least, after all the parameters of the new voltammetric method for determination of nepafenac were entirely defined one part of validation of the new method was carried out. In short, an experiment which had to determine the linearity range was performed. That same experiment gave a calibration curve that could be used for a quantitative determination of nepafenac.

8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za analitiku i kontrolu lijekova
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

PRIMJENA UGLJIKOVIH NANOVLAKANA I GRAFENA U RAZVOJU NOVOG SENZORA ZA ANALIZU NEPAFENAKA

Ivana Jurić

SAŽETAK

Nepafenak je nesteroidni protuupalni lijek koji se koristi za prevenciju i liječenje postoperativne boli i upale povezane s operacijom katarakte te smanjenje rizika za pojavu makularnog edema nakon operacije katarakte kod bolesnika s dijabetesom.

U eksperimentalnom dijelu rada, proveden je niz pokusa koji čine dio razvoja nove voltametrijske metode za određivanje nepafenaka. Ispitan je utjecaj modifikacije radne elektrode od staklastog ugljika na voltametrijski odziv nepafenaka pri čemu su korištene grafen nanopločice i/ili ugljikova nanovlakna u otopini kitozana ili nafiona. Napravljen je probir pH vrijednosti Britton-Robinson pufera koji je služio kao elektrolit za mjerenja. Jedan od koraka u radu bila je optimizacija parametara pravokutnovalne voltametrijske metode. Cikličkom voltametrijom utvrđeno je da je oksidacija nepafenaka na modificiranoj elektrodi adsorpcijski kontrolirana elektrodna reakcija te da bi se adsorpcija lijeka mogla koristiti u razvoju osjetljive *stripping* voltametrijske metode za analizu nepafenaka. Određeno je optimalno vrijeme i potencijal akumulacije za ukoncentriravanje analita na površini modificirane elektrode. Naposljetku, nakon što su parametri i uvjeti metode bili u potpunosti definirani, odrađen je jedan dio validacije metode. Naime, proveden je pokus koji je za cilj imao utvrditi područje linearnosti i dati eksperimentalne kalibracijske krivulje koje bi se mogle koristiti kod određivanja sadržaja nepafenaka.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 44 stranice, 20 grafičkih prikaza, 4 tablice i 23 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Nepafenak, voltametrija, ciklička voltametrija, pravokutnovalna voltametrija, grafen nanopločice, ugljikova nanovlakna, modificirana elektroda

Mentor: **Prof. dr. sc. Biljana Nigović**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ime i Prezime**, *viši asistent/ docent/ izvanredni profesor/ redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Ime i Prezime, *viši asistent/ docent/ izvanredni profesor/ redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Ime i Prezime, *viši asistent/ docent/ izvanredni profesor/ redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2018.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical Analysis
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

CARBON NANOFIBERS AND GRAPHENE APPLICATION IN DEVELOPMENT OF A NEW SENSOR FOR NEPAFENAC ANALYSIS

Ivana Jurić

SUMMARY

Nepafenac is a nonsteroidal anti-inflammatory drug and is used for prevention and treatment of pain and inflammation after the cataract surgery. It is also used as a prophylactic drug for prevention of macular oedema after the cataract surgery in patients with diabetes.

In the experimental part of this thesis, a number of experiments were carried out as a part of development of a new voltametric method for the determination of nepafenac.The influence of surface modification of working glassy carbon electrode on nepafenac response was investigated and the graphene nanoplatelets and/or carbon nanofibers in solutions with chitosan or nafion were used. The selection of a pH values of Britton-Robinson buffer solution which was used as an electrolyte solution during measurements was made. The optimization of the parameters of a method for a square-wave voltammetry was one of the steps in an experimental procedure. Cyclic voltammetry has shown that the oxidation of nepafenac on modified electrode is an adsorption-controlled electrode reaction. Furthermore, adsorption of nepafenac could be used in development of a sensitive stripping voltametric method for analysis of nepafenac. Duration of accumulation and deposition potential were determined. Last but not least, after all the parameters of the new voltammetric method for determination of nepafenac were entirely defined one part of validation of the new method was carried out. In short, an experiment which had to determine the linearity range was performed. That same experiment gave a calibration curve that could be used for a quantitative determination of nepafenac.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 44 pages, 20 figures, 4 tables and 23 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Nepafenac, voltammetry, cyclic voltammetry, square-wave voltammetry, graphene nanoplatelets, carbon nanofiber, modified elctrode

Mentor: **Biljana Nigović**, **Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ime i Prezime**, **Ph.D.** */Assistant Professor/ Associate Professor/ Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ime i Prezime, **Ph.D.** */Assistant Professor/ Associate Professor/ Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ime i Prezime, **Ph.D.** */Assistant Professor/ Associate Professor/ Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2018.