

# Elektrokemijske metode za istovremeno određivanje amlodipina i drugih lijekova za terapiju hipertenzije i hiperlipidemije

---

Puhin, Nikola

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:809126>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-01**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Nikola Puhin**

**Elektrokemijske metode za istovremeno  
određivanje amlodipina i drugih lijekova za  
terapiju hipertenzije i hiperlipidemije**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024 .

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

*Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Biljani Nigović na svojoj pomoći koju mi je pružila prilikom pisanja ovog diplomskog rada, posebno na njezinoj iznimnoj susretljivosti i ljubaznosti te pobuđivanju mog interesa za analitiku lijekova.*

*Želim se zahvaliti i cijeloj svojoj bližoj i daljnjoj obitelji na podršci i vjerovanju u mene kako tijekom fakulteta tako i tijekom cijelog školovanja. Također, veliko hvala mojim najboljim prijateljima koji su sa mnom prošli sve: vrtičke dane, školske klupe te sad i cijelo fakultetsko obrazovanje (sve ono dalje nas još čeka) kao i svim mojim kolegama s fakulteta, od kojih su neki postali (nadam se da će i ostati) prijatelji za cijeli život.*

*Posebno se zahvaljujem svojoj mami Andreji jer bez nje ništa od ovoga ne bi bilo moguće i ja ne bih bio osoba kakva sam danas. Mama, hvala ti!*

## SADRŽAJ

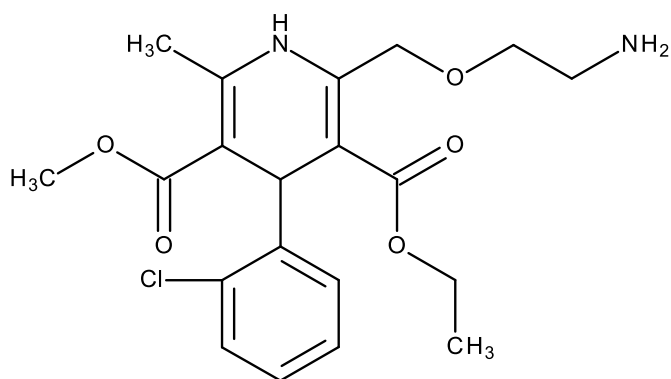
1. UVOD.....	1
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	6
3. MATERIJALI I METODE.....	7
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	8
4.1. VOLTAMETRIJSKE METODE ZA ODREĐIVANJE AMLODIPINA.....	8
4.2. VOLTAMETRIJSKE METODE ZA ISTOVREMENO ODREĐIVANJE AMLODIPINA I DRUGIH LIJEKOVA.....	13
4.2.1. AMLODIPIN I HIDROKLOTIAZID.....	13
4.2.2. AMLODIPIN I ATORVASTATIN.....	17
4.2.3. AMLODIPIN I ROSUVASTATIN.....	21
4.2.4. AMLODIPIN I VALSARTAN.....	24
4.2.5. AMLODIPIN I RAMIPRIL.....	27
4.2.6. AMLODIPIN I OSTALI LIJEKOVI KOJI SE KORISTE U TERAPIJI HIPERTENZIJE.....	31
4.2.7. AMLODIPIN, HIDROKLOTIAZID I VALSARTAN.....	33
4.2.8. AMLODIPIN, HIDROKLOTIAZID, AMILORID I ATENOLOL.....	36
5. ZAKLJUČCI.....	39
6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA.....	40
7. LITERATURA.....	41
8. SAŽETAK/SUMMARY.....	48
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

## 1.UVOD

Hipertenzija je najčešća kardiovaskularna bolest u svijetu i prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji pogađa 1,28 milijardi ljudi u dobi od 30 do 79 godina diljem svijeta (Mancia i sur., 2023). Prema definciji Europskog kardiološkog društva iz 2018. hipertenzija podrazumijeva izmjerene ponovljene vrijednosti krvnog tlaka iznad 140 mmHg za sistolički i/ili 90 mmHg za dijastolički tlak (Williams i sur., 2018). Unatoč toj definciji postoji poveznica između kardiovaskularnih i renalnih poremećaja/fatalnih događaja već za vrijednosti krvnog tlaka veće od 115 mmHg za sistolički odnosno veće od 75 mmHg za dijastolički tlak (Mancia i sur., 2023). S obzirom na vrijednosti krvnog tlaka hipertenzija se klasificira u 1. stupanj 1 (140 -159 mmHg za sistolički i/ili 90-99 mmHg za dijastolički), 2. stupanj hipertenzije (160 -179 mmHg za sistolički i/ili 100-109 za dijastolički) te 3. stupanj hipertenzije (vrijednosti sistoličkog tlaka veće ili jednake 180 mmHg i/ili vrijednosti dijastoličkog tlaka veće ili jednake 100 mmHg). Također, klasifikacija razlikuje još i izoliranu sistoličku i izoliranu dijastoličku hipertenziju u kojima je povišena samo jedna vrijednost tlaka.

Prvi korak u tretiranju hipertenzije uključuje nefarmakološke mjere kao što su: redukcija unosa soli, smanjenje prekomjerne tjelesne mase, smanjenje unosa alkohola, prestanak pušenja te bavljenje fizičkom aktivnosti. Takva promjena životnog stila preporuča se za sva tri stupnja hipertenzije, međutim u 2. i 3. stupnju ona obavezno mora biti praćena i farmakoterapijom, a prema novijim smjernicama farmakoterapija se preporuča već i za pacijente sa 1. stupnjem hipertenzije.

U prvoj liniji liječenja hipertenzije nalazi se 5 većih skupina lijekova: ACE inhibitori, blokatori receptora za angiotenzin 2 (ARB), blokatori kalcijevih kanala (CCB), tiazidi i njima slični diuretici te beta blokatori (Williams i sur., 2018). Lijekovi iz tih skupina se vrlo često kombiniraju kako bi se postigle ciljane vrijednosti krvnog tlaka i optimizirali ishodi liječenja. Lijek koji se vrlo često nalazi u tim kombinacijama s drugim lijekovima je blokator kalcijevih kanala amlodipin, o kojem će biti više riječi u ovom diplomskom radu.



**Slika 1.** Kemijska struktura amlodipina

Amlodipin (Slika 1.) je dugodjelujući, lipofilni dihidropiridinski blokator kalcijevih kanala 3. generacije. On blokira influks kalcijevih iona u stanice glatkih mišića i miokarda što rezultira smanjenim perifernim otporom. Upravo zbog toga indiciran je za liječenje hipertenzije i angine pectoris. Osim mehanizma djelovanja na blokadu kalcijevih kanala, otkriveno je da amlodipin zahvaljujući svojoj lipofilnosti i kemijskoj strukturi smanjuje oksidativna oštećenja lipidnog dvosloja staničnih membrana i produkciju slobodnih radikala. Također, zabilježeno je da amlodipin povećava stvaranje prirodnog vazodilatatora NO u mikrovaskulaturi, a to nije značajka ostalih blokatora kalcijevih kanala. Nadalje, on regulira ekspresiju interleukina što ima antiproliferativni učinak i pokazuje pozitivne učinke na remodeliranje izvanstaničnog matriksa. Svi navedeni mehanizmi imaju učinak na preveniranje stvaranja aterosklerotskih plakova i zbog toga se amlodipin razmatra i kao lijek izbora u prevenciji ateroskleroze.

Zbog već spomenutog dugog poluvijeka života u plazmi dozira se uglavnom jednom dnevno što povećava adherenciju kod pacijenata. Početna doza amlodipina uglavnom iznosi 5 mg, a maksimalna dnevna doza je 10 mg. Kod starijih pacijenata i onih s bolestima jetre preporuča se početna doza od 2,5 mg. Zahvaljujući svojem postepenom početku djelovanja uglavnom ne dovodi do refleksne neuroendokrine aktivacije koja se kod ranijih generacija dihidropiridina manifestirala kroz ubrzani srčani ritam i negativni utjecaj na metabolizam ugljikohidrata i lipida (Fares i sur., 2016).

Apsorpcija amlodipina nakon oralne primjene je spora, a maksimalne koncentracije u plazmi postižu se nakon 6-8 sati od primjene. On se značajno distribuira u ljudskom organizmu (volumen distribucije mu iznosi 1,300 -1,600 L) i također se u velikoj mjeri veže za proteine plazme (92-95% kod pacijenata s hipertenzijom) (Abernethy, 1992).

Njegova je bioraspoloživost visoka (60-80 %), podliježe metabolizmu u jetri (uglavnom reakcije 1. faze – oksidativni put) i pokazuje promjene u eliminaciji u slučaju ciroze jetre, međutim ne kod bubrežnog oštećenja budući da se samo manje od 5% lijeka izlučuje nepromijenjeno putem bubrega. Eliminacija iz organizma traje od 40 – 60 sati, a u slučaju prekida terapije krvni tlak se unutar jednog tjedna vraća na vrijednosti prije terapije bez opasnih *rebound* povišenja krvnog tlaka (Fares i sur., 2016). Klirens iz organizma je manji u odnosu na ostale blokatore kalcijevih kanala (15 – 30 L/h za amlodipin u usporedbi s više od 50 L/h za ostale). Upravo taj niži klirens i značajna distribucija u organizmu rezultiraju već spomenutim dugim poluvijekom života amlodipina, što predstavlja još jednu njegovu razliku od ostalih lijekova te skupine (Abernethy, 1992).

Amlodipin ima dobar sigurnosni profil, a najčešća zabilježena nuspojava je pojava perifernih edema. Ta se nuspojava može izbjeći ili minimalizirati uzimanjem amlodipina uvečer ili uzimanjem niže doze lijeka (2,5 ili 5 mg dnevno). Ostale nuspojave uključuju glavobolju, vrtoglavicu, mučninu i palpitacije, međutim te nuspojave su sve blažeg karaktera i u većini slučajeva njihova pojava ne rezultira prekidanjem uzimanja amlodipina. Kontraindikacije za njegovu primjenu uključuju kardiogeni šok, nestabilnu anginu, preosjetljivost na djelatnu tvar, stenozu aorte, dojenje (<https://halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/Amlodipin-PharmaS-SPC.pdf>).

Iako monoterapija amlodipinom nije inferiorna monoterapijama ostalim antihipertenzivima, danas se, kao što je već spomenuto, fokus stavlja na kombiniranu terapiju hipertenzije. Naime, poznato je da manje od 50% pacijenata sa 1. i 2. stupnjem hipertenzije postižu adekvatnu kontrolu krvnog tlaka sa samo jednim lijekom. Budući da se radi o multifaktorijelnoj bolesti koju prate brojni različiti komorbiditeti kombinirana terapija je u većini slučajeva uspješnija. Ona uključuje različite mehanizme koji onda vode uspješnijem sniženju krvnog tlaka i također blokira kontraregulatorne mehanizme u organizmu koji su često razlog neuspjeha monoterapije. Nadalje, kombinirana terapija uključuje niže doze lijekova što može smanjiti njihove potencijalne nuspojave i time povećati suradljivost pacijenata. Amlodipin se za liječenje hipertenzije koristi u kombinacijama s ostalim velikim skupinama antihipertenziva: tiazidnim diureticima, alfa blokatorima, beta blokatorima ili ACE inhibitorima (<https://halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/Amlodipin-PharmaS-SPC.pdf>).

Postoje brojne studije koje su istraživale učinkovitost različitih kombinacija antihipertenziva i njihovu superiornost naspram monoterapija. Rezultati tih studija pokazuju

veću učinkovitost dualne terapije u kojoj je jedan lijek amlodipin naspram one bez amlodipina i također dokazuju superiornost dualne terapije naspram monoterapije amlodipinom. Dostupno je sve više dokaza koji upućuju na to da kombinacija blokatora kalcijevih kanala i ACE inhibitora/ARB-ova osigurava najbolje dugoročne učinke. Razlog tomu je što kombiniranjem RAAS inhibitora s amlodipinom dolazi do smanjenja aktivacije RAAS sustava uzrokovane vazodilatacijom do koje dovodi sam amlodipin i posljedično bolje kontrole krvnog tlaka. Danas, uz dualnu terapiju postoje i fiksne kombinacije tri antihipertenziva te se upravo kombinacija tri lijeka: amlodipina, hidroklorotiazida i valsartana pokazala superiornijom naspram bilo koje kombinacije dva lijeka od ta tri navedena (Fares i sur., 2016). Zbog svega navedenog može se naslutiti kako će kombiniranje dva i više lijekova biti temelj liječenja hipertenzije u budućnosti.

Za analizu amlodipina dostupno je više različitih metoda; u literaturi se navodi mogućnost korištenja UV spektrofotometrije, spektrofluorometrije, kapilarne elektroforeze, plinske kromatografije, tankoslojne kromatografije, obrnuto fazne tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (RP-HPLC), tankoslojne kromatografije visoke djelotvornosti (HPTLC), spregnutih tehnika kao što su LC – MS/MS, LC – ESI/MS/MS, UHPLC – ESI/MS/MS te danas sve popularnijih elektroanalitičkih metoda o kojima će biti više riječi u ovom diplomskom radu (<https://www-webofscience-com.ezproxy.nsk.hr/wos/woscc/summary/80c7b34d-1ccb-45fa-8e63-b842ad88ba76-e57a66b6/relevance/1>).

Kod elektroanalitičkih metoda se podatak o aktivitetu, koncentraciji ili nekom drugom termodinamičkom svojstvu analita dobiva u ovisnosti o električnom naboju, struji ili naponu. One se dijele na potenciometriju, voltometriju, kronoamperometriju, konduktometriju, kulometriju, elektrogravimetriju i kronopotenciometriju. Njihova podjela zasniva se na varijabli koja se mjeri i iz koje se dobiva željeni analitički podatak. Velika prednost elektroanalitičkih metoda je ta da ne zahtijevaju prethodno provođenje postupaka odjeljivanja, visoko su osjetljive, točne i precizne (Nigović i Behetić, 2007). Isto tako odlikuje ih jednostavnost, niski troškovi instrumenata, mogućnost određivanja analita u stvarnom vremenu, manji utjecaj matriksa u usporedbi s primjerice kromatografskim metodama (Beitollahi i sur., 2016). One osiguravaju selektivnu detekciju lijekova i pri tome selektivnost ovisi o dostupnom rasponu potencijala elektroaktivnih tvari. Njihova primjena u farmaciji vrlo je široka, od ranih faza istraživanja i razvoja lijekova do identifikacije i određivanja



lijekova u različitim uzorcima (djelatne tvari, farmaceutski oblici i biološki uzorci nakon primjene lijeka) (Nigović i Behetić, 2007).

Jedna od elektroanalitičkih metoda koja se može koristiti u analizi amlodipina je i voltometrija. Njezin temelj je mjerenje struje radne elektrode nastale kontinuiranim mijenjanjem njenog potencijala, a prikazivanjem ovisnosti struje o potencijalu dobiva se voltamogram. Postoje različite vrste voltometrijskih metoda, a neke od njih su: diferencijalna pulsna, ciklička, pravokutnovalna, *stripping* voltometrija te različite vrste polarografija. Voltometrijske metode imaju raznoliku primjenu u farmaciji, kao što su: istraživanje kinetike i mehanizama redoks reakcija, kvantitativna analiza analita u vodenom i nevodenom mediju, elektrokemijska detekcija eluiranih analita u tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti (Nigović i Behetić, 2007). Voltometrija se može koristiti za analizu samog amlodipina, no kao što je već rečeno budući da se radi o lijeku koji se često kombinira s drugim antihipertenzivima i lijekovima iz drugih farmakoterapijskih skupina, važno je da se te metode mogu koristiti i za simultano određivanje amlodipina uz još neki lijek tj. analit. Simultano određivanje amlodipina uz pomoć elektrokemijskih metoda detaljnije će biti obrađeno u nastavku ovog diplomskog rada.

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

S obzirom na visoku incidenciju hipertenzije u modernom društvu, koja je iz dana u dan u sve većem porastu, jedni od najčešće primjenjivanih lijekova danas su različiti antihipertenzivi. Kao što je već spomenuto, zbog same prirode bolesti ti se lijekovi često kombiniraju i to u fokus stavlja analitičke metode kojima je moguće istovremeno analizirati dva i više lijekova. Budući da je amlodipin zbog svojih specifičnosti i posebnosti u odnosu na ostale blokatore kalcijevih kanala vrlo čest u tim kombinacijama potrebno je razvijati metode za njegovo simultano određivanje u prisutnosti drugog lijeka/lijekova. Zahvaljujući svojoj jednostavnosti i brojnim drugim prednostima, elektroanalitičke metode su vrlo korisne upravo za to. Stoga, cilj ovog preglednog diplomskog rada je pretraživanjem literature istražiti detaljan pregled elektroanalitičkih metoda za simultano određivanje amlodipina, uz kritički osvrt na same metode i pružanje smjernica za njihov daljnji razvoj u budućnosti.

### **3. MATERIJALI I METODE**

Za izradu ovog preglednog diplomskog rada upotrebljava se relevantna stručna i znanstvena literatura koja obrađuje tematiku primjene elektroanalitičkih metoda za analizu amlodipina (samog i istovremeno s drugim lijekom/lijekovima). Za potrebe izrade rada pretražena je baza podataka Web of Science, a ključne riječi koje su pritom korištene su: amlodipine, voltammetry, electrode, methods, analysis, determination, pharmacology, mechanism, hypertension, simultaneous, analytical. Također, pretražit će se i mrežne stranice koje se bave navedenom problematikom.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

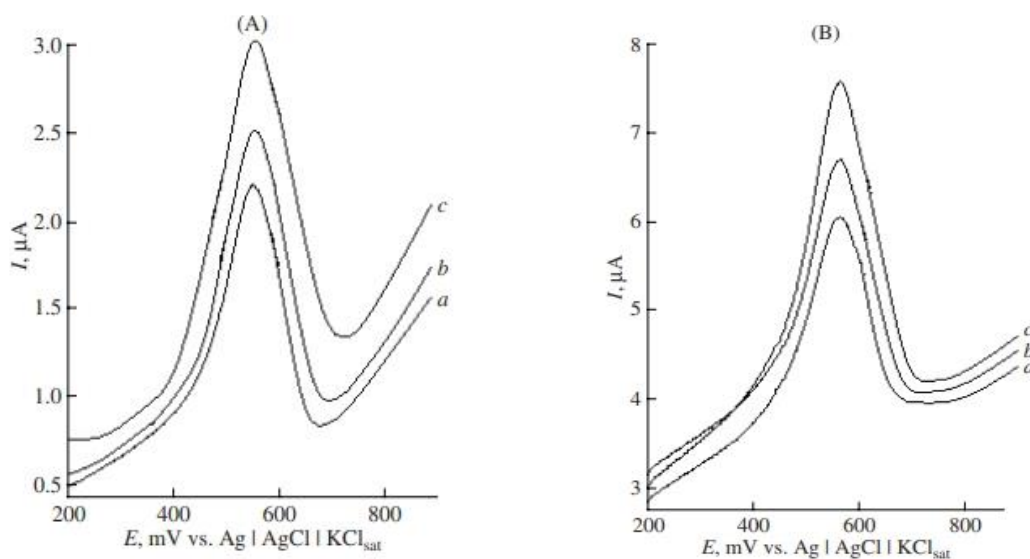
U nastavku diplomskog rada bit će navedena podjela na elektroanalitičke metode koje se primjenjuju za analizu samog amlodipina i na simultane elektroanalitičke metode za njegovu analizu, koje će kasnije biti detaljnije obrađene.

### 4.1. VOLTAMETRIJSKE METODE ZA ODREĐIVANJE AMLODIPINA

Od voltametrijskih metoda koje se mogu koristiti za analizu amlodipina najčešće spominjana u literaturi je diferencijalna pulsna voltametrija (*engl. Differential pulse voltammetry*, DPV). Kod nje se pulsevi određene veličine primjene na radnu elektrodu uz mjerenje razlike u struji (neposredno prije primjene pulsa i na kraju pulsa) kao funkcije potencijala. Tako dobiveni voltamogrami imaju jasno izražene strujne vrhove pa je stoga metoda pogodna za određivanje niskih koncentracija elektroaktivnih komponenti u farmaceutskim i biološkim uzorcima.

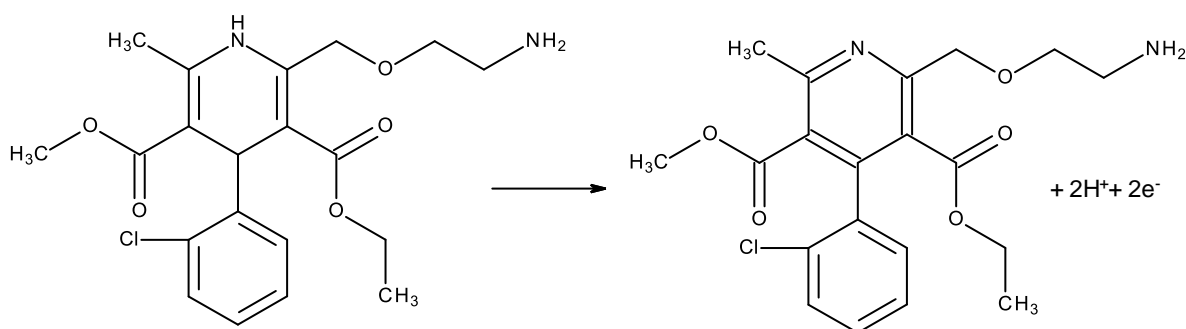
Voltametrijska metoda koja se također može koristiti u analizi amlodipina je i pravokutnovalna voltametrija (*engl. Square-wave voltammetry*, SWV). Njezina je prednost korištenje vrlo brzih promjena potencijala čime se značajno skraćuje trajanje same analize.

*Stripping* voltametrija se također koristi za analizu amlodipina, a ona uključuje elektrolitičko ili adsorpcijsko pretkoncentriranje analita na površinu elektrode prije mjerenja. Istaloženi analit se određuje voltametrijski, a otapa se s elektrode primjenom promjene potencijala. U slučaju amlodipina analit se oksidira natrag u otopinu (anodna *stripping* voltametrija), a struja koja je izmjerena tijekom tog koraka je proporcionalna koncentraciji analita na elektrodi (Slika 2.). Budući da je koncentracija na površini elektrode veća od one u otopini to omogućuje određivanje vrlo niskih koncentracija analita (Nigović i Behetić, 2007). Kao što je već spomenuto, u analizi amlodipina promatraju se oksidacijski procesi stoga se koriste krute elektrode (staklasta ugljikova elektroda, grafitna, zlatna) koje su uglavnom modificirane nanočesticama različitih materijala. Primjenom takvih modificiranih elektroda povisuje se visina strujnog vrha, a oksidacijski potencijal se smanjuje, odnosno takve elektrode pokazuju elektrokatalitičku aktivnost na oksidaciju amlodipina.



**Slika 2.** Voltamogrami amlodipina dobiveni diferencijalno pulsnom (A) i pravokutnovalnom (B) anodnom *stripping* voltametrijom uz *carbon paste* elektrodu u fosfatnom puferu, pH 11; (a)  $7,0 \times 10^{-8}$  M amlodipin; (b)  $9,9 \times 10^{-8}$  M amlodipin; (c)  $1,4 \times 10^{-7}$  M amlodipin (preuzeto i prilagođeno iz Kazemipour i sur., 2009 sukladno CC4 licenci)

Svim ovim metodama ispitano je i potvrđeno elektrokemijsko ponašanje amlodipina poznato od ranije. Njegova elektrokemijska oksidacija je ireverzibilan proces koji se na voltamogramu vidi kao jedinstven i prepoznatljiv strujni pik na potencijalu od +0,51 V do +0,75 V (ovisno o vrsti elektrode i osnovnog elektrolita). Upravo zbog takvog niskog oksidacijskog potencijala amlodipina moguće ga je određivati istovremeno s drugim lijekovima budući da su potencijali lijekova s kojima se on često kombinira uglavnom viši (oko 1 V). Oksidacija amlodipina se zbiva na dihidropiridinskom prstenu uz nastajanje piridina, a u proces su uključena dva protona i dva elektrona, kao što je prikazano na Slici 3.



**Slika 3.** Reakcija oksidacije amlodipina

Dobiveni rezultati za linearnost, limite detekcije i određivanja razlikovali su se od metode do metode, kao i mogućnosti određivanja amlodipina u dozirnom obliku ili biološkom uzorku ili pak oboje. Tablica 1. daje pregled razvijenih elektrokemijskih metoda za određivanje amlodipina s opisom pripadajuće modificirane ili nemodificirane elektrode.

**Tablica 1.** Voltametrijske metode za određivanje amlodipina i pripadajuće vrste elektroda

Vrsta voltametrijske metode	Elektroda
<b>Diferencijalna pulsna stripping voltometrija</b>	<p>Staklasta ugljikova elektroda modificirana hidrofilnim ugljikovim nanočesticama (adsorpcija) (Amiri i Imanzade, 2017)</p> <p>Staklasta ugljikova elektroda modificirana nanočesticama <math>ZrO_2</math> (Mohammadizadeh i sur., 2017)</p> <p>Staklasta ugljikova elektroda modificirana poli-L-metioninom i nanočesticama zlata (Emami i sur.,2014)</p> <p><i>Screen printed</i> ugljikova elektroda modificirana magnetskim nanočesticama manganova ferita (Mohammadi i sur., 2019)</p> <p>Grafitna elektroda modificirana nanokompozitom od <math>TiO_2</math>, zlata i kitozana (Fard i Sabzi, 2023)</p> <p><i>Carbon paste</i> elektroda s CuO-NiO nanokompozitom i ionskom tekućinom (Firouzi i sur., 2021)</p>

	<p><i>Screen printed</i> elektroda modificirana platina-NiCO<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanokompozitom (Javer i sur., 2022)</p> <p>Staklasta ugljikova elektroda modificirana CeO<sub>2</sub>-Au nanovlaknima i grafen oksidom (Arvand i Samie, 2018)</p> <p>Staklasta ugljikova elektroda modificirana AgCe<sub>2</sub>(WO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> i ugljikovim vlaknima u nanokompozitu (Sudha i sur., 2021)</p> <p>Staklasta ugljikova elektroda modificirana poli-kavenom kiselinom-L-argininom i MoS<sub>2</sub> nanokompozitom (Prasannan i sur., 2023)</p> <p>Staklasta ugljikova elektroda modificirana natrijevim bentonitom nanodimenzija (Sikkander i sur., 2016)</p>
<p><b>Pravokutnovalna voltometrija s adsorptivnom akumulacijom (anodna stripping)</b></p>	<p>Staklasta ugljikova elektroda (Gazy, 2004)</p> <p>Zlatna elektroda modificirana oksidiranim višeslojnim ugljikovim nanocjevčicama (Stoiljkovic i sur., 2012)</p> <p>Grafitna elektroda modificirana ugljikovim nanocjevčicama (Goyal i Bishnoi, 2010)</p> <p>Nemodificirana <i>carbon paste</i> elektroda (Kazemipour i sur., 2009)</p>

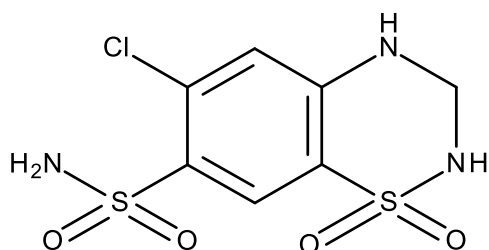
<p><b>Diferencijalna pulsna voltametrija</b></p>	<p>Dijamantna elektroda s primjesama bora (Cinková i Svorc, 2015)</p> <p>Staklasta ugljikova elektroda (Altiokka i sur., 2002)</p> <p>Dijamantna elektroda s primjesama bora (Svorc i sur., 2014)</p> <p>Nemodificirana <i>screen printed</i> elektroda, uz SDS (Khorshed i sur., 2019)</p>
<p><b>Ciklička voltametrija</b></p>	<p><i>Carbon paste</i> elektroda modificirana srebrovim i bakrovim nanočesticama te višeslojnim ugljikovim nanocjevčicama (Naikoo i sur., 2020)</p> <p>Platinska elektroda modificirana biokompozitnim filmom lipaze u želatina- polianilin željezovom oksidu (Djaalab i sur., 2018)</p> <p>Staklasta ugljikova elektroda modificirana poli(anilin-ko-antranilne kiseline) filmom (Hrichi i sur., 2017)</p> <p>Staklasta ugljikova elektroda modificirana NiO nanostrukturama (Khand i sur., 2021)</p>
<p><b>Pravokutnovalna voltametrija i transformacija</b></p> <p><i>stripping</i></p> <p><b>Fourierova</b></p>	<p><i>Carbon paste</i> elektroda s prethodnom elektromembranskom ekstrakcijom (Mofidi i sur., 2017)</p>



## 4.2. VOLTAMETRIJSKE METODE ZA ISTOVREMENO ODREĐIVANJE AMLODIPINA I DRUGIH LIJEKOVA

### 4.2.1. AMLODIPIN I HIDROKLOROTIAZID

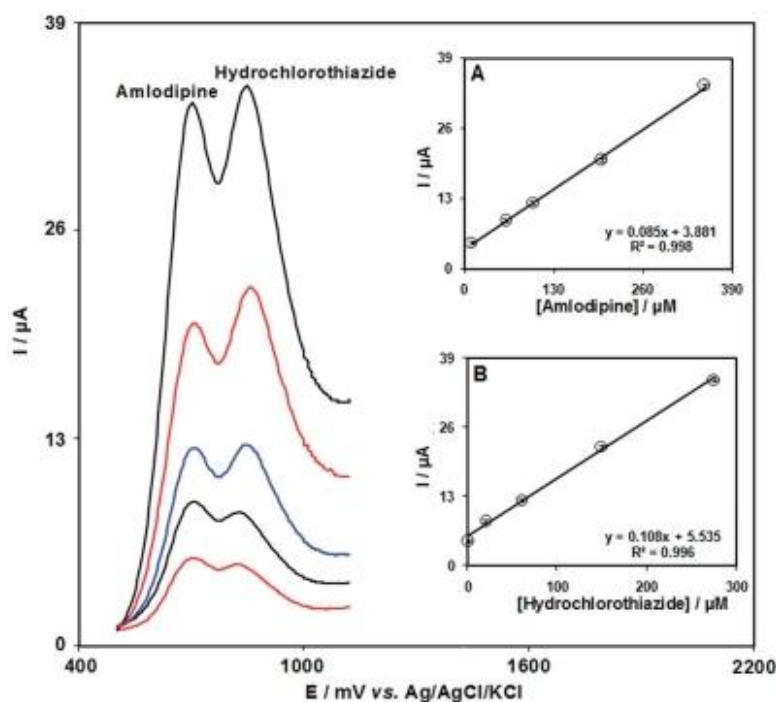
Pretraživanjem relevantne literature pronađeno je 5 radova koji se bave temom primjene voltametrijskih metoda za istovremeno određivanje amlodipina i diuretika hidroklorotiazida (Slika 4.). Hidroklorotiazid spada u skupinu tiazidnih diuretika, a djeluje tako da povećava renalno izlučivanje vode i elektrolita pa posljedično snižava i povišeni krvni tlak. Budući da je upravo ova kombinacija amlodipina i hidroklorotiazida vrlo često propisivana važno je razvijati jednostavne, osjetljive i točne metode za njihovo simultano određivanje, posebice za potrebe kontrole kvalitete njihovih farmaceutskih oblika.



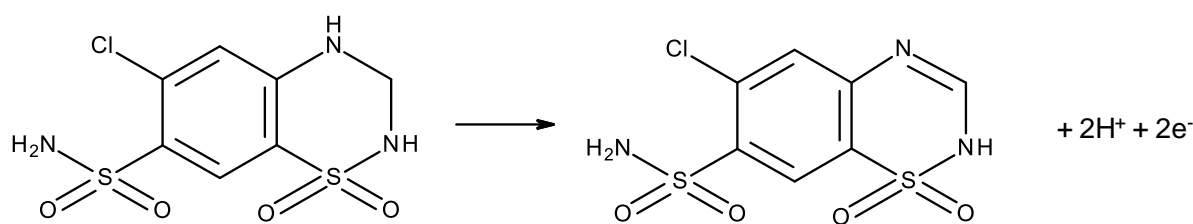
**Slika 4.** Kemijska struktura hidroklorotiazida

U jednom od proučenih radova za istovremeno određivanje amlodipina i hidroklorotiazida korištena je *carbon paste* elektroda modificirana ionskom tekućinom i magnetskim *core-shell*  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  i  $\text{SiO}_2$  nanočesticama i višeslojnim ugljikovim nanocjevčicama (Slika 5.) (Beitollahi i sur., 2016). Modificirana *screen printed carbon* elektroda upotrijebljena je u drugom radu koji opisuje razvoj voltametrijske metode za istovremeno određivanje ova dva lijeka, a površina elektrode modificirana je hibridnim nanostrukturama od molibdenovog disulfida i grafena (Mohammadi i sur., 2014). U trećem radu za potrebe istraživanja korištena je katodno tretirana dijamantna elektroda s primjesama bora (*engl. Boron-doped diamond electrode*, BDDE) (Silva i sur., 2015). BDDE se koristila i u četvrtom znanstvenom radu (Mansano i Sartori, 2015), dok se u petom radu određivanje provodilo pomoću razvijenog elektrokemijskog senzora koji se temeljio na grafitu i biorazgradivom polimeru od polikaprolaktona (da Silva i sur., 2020).

Pravokutnovalna voltometrija koristila se za simultano određivanje amlodipina i hidroklorotiazida u prvom, trećem i četvrtom istraživanju, a diferencijalna pulsna voltometrija u drugom i petom istraživanju. Svih pet metoda pokazalo se uspješnima u simultanom određivanju ova dva analita tj. lijeka. Razlog tomu je taj što se oksidacijski pikovi amlodipina i hidroklorotiazida pojavljuju na različitim potencijalima. Kod amlodipina oksidacija se zbiva na dihidropiridinskom prstenu uz nastajanje piridina, a pojavljuje se na potencijalu u rasponu od 0,71 V do 0,88 V (postoje razlike od metode do metode zbog primjene različitih elektroda i uvjeta oksidacije molekula amlodipina i hidroklorotiazida). Hidroklorotiazid prolazi kroz ireverzibilnu oksidaciju dajući klorotiazid kao produkt (Slika 6.), a ta oksidacija događa se na potencijalu u rasponu od 0,81 do 1,30 V (da Silva i sur., 2020).



**Slika 5.** Pravokutnovalni voltamogrami oksidacije amlodipina i hidroklorotiazida dobiveni pomoću *carbon paste* elektrode modificirane ionskom tekućinom i magnetskim *core-shell*  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  i  $\text{SiO}_2$  nanočesticama i višeslojnim ugljikovim nanocjevčicama u 0,1 M fosfatnom puferu pH 7 koji sadrži različite koncentracije lijekova (iznutra prema van: 10 + 1, 60 + 20, 100 + 60, 200 + 150 i 350 + 275  $\mu\text{M}$  amlodipina i hidroklorotiazida); Graf (A) ovisnost struje o koncentraciji amlodipina i Graf (B) ovisnost struje o koncentraciji hidroklorotiazida (preuzeto i prilagođeno iz Beitollahi i sur. 2016 sukladno CC4 licenci)



**Slika 6.** Reakcija oksidacije hidroklorotiazida

Rezultati dobivenih istraživanja razlikuju se i po osjetljivosti razvijenih voltametrijskih metoda. Najosjetljivija metoda za dokazivanje amlodipina bila je diferencijalna pulsna voltametrija uz modificiranu *screen printed* carbon elektrodu (Mohammadi i sur., 2014) jer je vrijednost limita detekcije (LOD) za amlodipin iznosila 0,012  $\mu\text{M}$ , zatim slijedi pravokutnovalna voltametrija uz magnetski nanokompozit (Beitollahi i sur., 2016) s pripadajućom LOD vrijednosti za amlodipin od 0,015  $\mu\text{M}$ . LOD vrijednost za amlodipin dobivena u 4. radu iznosi 0,056  $\mu\text{M}$ , a u trećem 0,06  $\mu\text{M}$ . Najmanje osjetljivom metodom za dokazivanje amlodipina pokazala se diferencijalna pulsna voltametrija uz razgradljivi biokompozit (da Silva i sur., 2020) budući da najniža koncentracija amlodipina koju je njome moguće detektirati iznosi 0,068  $\mu\text{M}$ .

Kod osjetljivosti metoda za dokazivanje diuretika hidroklorotiazida postoje veće razlike između ovih pet istraživanja. Najosjetljivija metoda je ona iz prvog istraživanja budući da se njome može detektirati hidroklorotiazid u koncentraciji od 0,0085  $\mu\text{M}$  (Beitollahi i sur., 2016), a kao najmanje osjetljiva metoda pokazala se pravokutnovalna voltametrija uz dijamantnu elektrodu s primjesama bora kod koje LOD za hidroklorotiazid iznosi 2  $\mu\text{M}$  (Silva i sur., 2015).

Još jedan važan parametar metoda za simultano određivanje lijekova je i linearnost. Metoda kojom je dobiveno najšire područje linearnosti za amlodipin je ona iz 2. istraživanja budući da kod nje u rasponu koncentracija amlodipina od 0,04 do 400  $\mu\text{M}$  dobiveni strujni vrhovi pokazuju linearnu ovisnost o koncentraciji lijeka (Mohammadi i sur., 2014).

Zatim slijedi metoda razvijena u 1. istraživanju gdje područje linearnosti iznosi 0,25 – 500  $\mu\text{M}$  (Beitollahi i sur., 2016). Nešto uže područje linearnosti dobiveno je metodom iz 3. Istraživanja: 0,200 – 9,09  $\mu\text{M}$  (Silva i sur., 2015). U 4. i 5. znanstvenom radu rasponi koncentracija unutar kojih je moguće pratiti linearnu ovisnost struje vrha o koncentraciji

amlodipina su prilično uska 0,1 – 2,1  $\mu\text{M}$  (Mansano i Sartori, 2015) i 0,73 – 2,6  $\mu\text{M}$  (da Silva i sur., 2020). Situacija je slična i ako se promatraju dobivena područja linearnosti za dokazivanje hidroklorotiazida. U 1. znanstvenom radu navedeno je kako je raspon koncentracija hidroklorotiazida za koji vrijedi da je struja vrha proporcionalna njegovoj koncentraciji od 1 do 600  $\mu\text{M}$  (Beitollahi i sur., 2016).

Nešto uži raspon dobiven je u istraživanju obrađenom u 2. radu, od 0,04 do 400  $\mu\text{M}$  (Mohammadi i sur., 2014). U 3. radu područje linearnosti za hidroklorotiazid pokriva koncentracije od 4 do 100  $\mu\text{M}$  (Silva i sur., 2015), a u 4. i 5. raspon koncentracija je značajno uži 2 – 22  $\mu\text{M}$  (Mansano i Sartori, 2015) i 2,4 – 22  $\mu\text{M}$  (da Silva i sur., 2020).

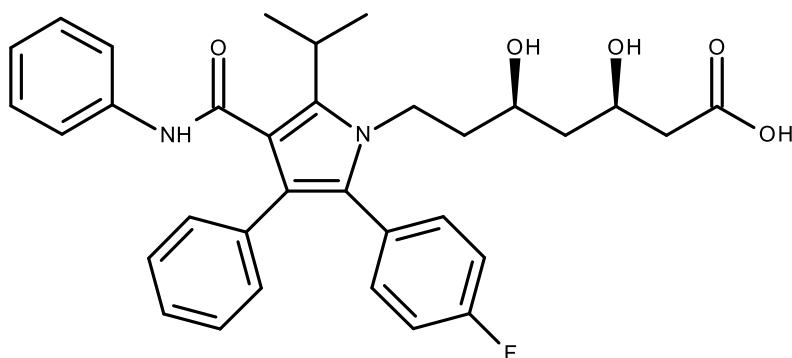
Za dva od pet istraživanja moguće je uspoređivati i točnost metoda; u 3. radu ispitivanom metodom dobiven je analitički prinos (*engl. Recovery, R*) u vrijednosti od 91,0 do 107% (Silva i sur., 2015), dok je u 5. radu R vrijednost za amlodipin iznosila 106,5%, a za hidroklorotiazid 103,2% (da Silva i sur., 2020).

Svih pet metoda, osim 2. temeljene na *screen printed carbon* elektrodi modificiranoj nanostrukturama molibdenovog disulfida i grafena, iskorišteno je i za uspješno dokazivanje lijekova u biološkim uzorcima tj. u uzorcima urina.

Moguće je zaključiti da postoji mogućnost istovremene analize amlodipina i hidroklorotiazida elektroanalitičkim tj. voltametrijskim metodama. Iako su sve od navedenih i proučenih metoda uspješne u postizanju simultane analize koristeći različite elektrode, za potrebe budućih istraživanja može biti važno koju točno metodu odabrati ovisno o potrebama same analize, npr. kolika je potrebna osjetljivost i linearnost metode za određenu svrhu.

#### 4.2.2. AMLODIPIN I ATORVASTATIN

Bolest često udružena s hipertenzijom je i dislipdemija tj. povišena vrijednost LDL i ukupnog kolesterola. Zbog postizanja jednostavnosti liječenja i bolje suradljivosti pacijenata nerijetko se amlodipin kombinira i s najčešće korištenim lijekovima za snižavanje kolesterola tj. statinima. Upravo zbog toga, važno je razvijati i metode za njihovo simultano dokazivanje i kvantitativno određivanje. Pretraživanjem relevantne literature pronađena su 3 znanstvena rada koja se bave temom simultane analize amlodipina i široko primjenjivanog visokopotentnog statina atorvastatina (Slika 7.). U nastavku slijedi njihova usporedba.

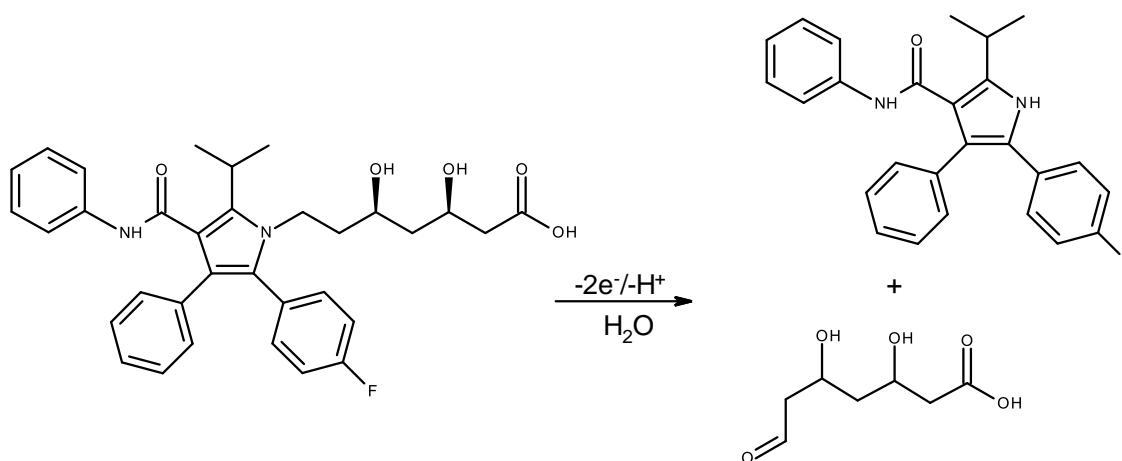


**Slika 7.** Kemijska struktura atorvastatina

Atorvastatin je, kao i ostali statini, inhibitor 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A reduktaze, enzima koji katalizira konverziju HMG-CoA u mevalonat, što predstavlja ograničavajući korak u brzini biosinteze kolesterola. Vrlo je malo općenito dostupnih metoda za simultanu analizu ova dva lijeka. Opisana je samo tekućinska kromatografija uz UV detekciju i spektrofotometrija, a čiji su nedostaci brojne interferencije pomoćnih tvari iz farmaceutskih oblika i potencijalni gubitci lijeka u postupcima ekstrakcije. Također, trajanje samih analiza je dugotrajno te uključuje složene postupke pripreme uzoraka te skupu i sofisticiranu opremu. Upravo su zbog toga elektrokemijske metode za simultanu analizu amlodipina i atorvastatina metode izbora kojima se u zadnje vrijeme okreće sve veći broj analitičara (Dogan-Topal i sur., 2009).

Jedna od voltametrijskih metoda za istovremeno određivanje amlodipina i atorvastatina koristi prvu derivaciju *ratio* voltamograma dobivenog primjenom diferencijalno pulsne i pravokutnovalne voltametrijske tehnike. Ta tehnika temelji se na mjerenju prve derivacije *ratio* voltamograma kao funkcije koncentracije lijeka odnosno analita (Dogan – Topal i sur., 2009).

Takve metode su iznimno korisne za rješavanje spomenutih problema interferencija matriksa formulacije lijeka i za razlikovanje voltametrijskih signala koji se preklapaju. Osim toga, još jedna prednost takvih metoda je eliminiranje potrebe za posebnom pripremom uzoraka i postupcima ekstrakcije prije same analize. Prije simultane analize proučeno je elektrokemijsko ponašanje ova dva lijeka na površini staklaste ugljikove elektrode. Budući da u strukturi atorvastatina postoje dva dijela u molekuli koja se mogu oksidirati (pirolni prsten i fenil-karbamoilna skupina) na voltamogramu se dobiju dva anodna pika (Slika 8.).

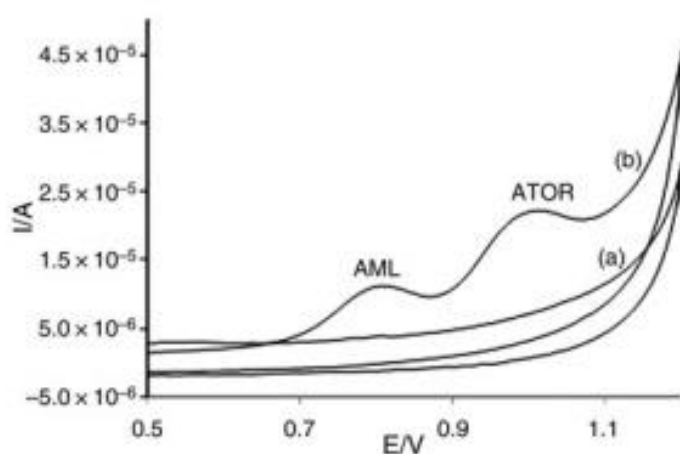


**Slika 8.** Reakcija oksidacije atorvastatina

Kao što je već spomenuto, oksidacija amlodipina se vidi kao jedan pik, a uključuje reakciju oksidacije dihidropiridinskog prstena do piridina uz izmjenu dva elektrona i dva protona. Kako pH vrijednost otopine lijeka za analizu utječe na izgled voltamograma, a samim tim i na razlikovanje strujnih pikova ova dva lijeka u smjesi, bilo je potrebno pronaći optimalan pH osnovnog elektrolita koji se koristi za pripremu otopina analiziranih lijekova. Najbolji rezultati uz najbolji izgled pikova dobiveni su pri pH 5 u Britton-Robinson puferu uz stalni udio metanola (20%).

Na voltamogramima dobivenim diferencijalno pulsnom i pravokutnovalnom voltametrijom pikovi amlodipina i atorvastatina su se preklapali te ih ne bi bilo moguće istovremeno odrediti. Zbog toga su dobiveni voltamogrami amlodipina podijeljeni različitim koncentracijama atorvastatina kako bi se dobili kalibracijski pravci (i obrnuto). Nakon uspostavljanja optimalnih radnih uvjeta kalibracijski pravci dobiveni su očitanjem struje pikova za potencijale 0,84 V (DPV) i 0,86 V (SWV) za amlodipin te 0,90 V (DPV) i 0,94 V (SWV) za atorvastatin. Nakon toga, bilo je moguće odrediti koncentracije lijekova (Dogan – Topal i sur., 2009).

U drugom istraživanju umjesto staklaste ugljikove elektrode za istovremeno određivanje amlodipina i atorvastatina korištena je *carbon paste* elektroda modificirana ugljikovim nanocjevčicama (Slika 9.) (Mohammadi i sur., 2013). Takva elektroda omogućila je, u odnosu na staklastu elektrodu, porast u strujnom vrhu zahvaljujući velikoj elektroaktivnoj površini. Također, nanomaterijali u sastavu elektrode pomažu transfer elektrona između analita tj. lijeka i elektrode ubrzavajući time reakciju oksidacije, što posljedično utječe na visinu strujnog vrha. Simultano određivanje amlodipina i atorvastatina provedeno je pomoću dieferencijalno pulsne voltametrije.



**Slika 9.** Ciklički voltamogram prikazuje oksidaciju amlodipina i atorvastatina koncentracija 20  $\mu\text{g/ml}$  na površini nemodificirane staklaste ugljikove elektrode (a) i *carbon paste* elektrode modificirane ugljikovim nanocjevčicama (b) pri pH pufera 6 (preuzeto i prilagođeno iz Mohammadi i sur., 2013 sukladno CC4 licenci)

Ista voltametrijska tehnika korištena je i obrađena u 3. radu koji se bavi ovom tematikom. Razlika je ponovno u izboru elektrode, u ovom slučaju korištena je anodno tretirana dijamantna elektroda s primjesama bora. Pri pH vrijednosti 4 u Britton-Robinson puferu dobivena su dva jasno odijeljena i reproducibilna oksidacijska pika koji potječu od oksidacije amlodipina i atorvastatina (Rebech i sur., 2017).

Iako su sva 3 rada pokazala uspješne voltametrijske metode za simultanu analizu amlodipina i atorvastatina između njih postoje razlike u osjetljivosti, točnosti, linearnosti itd. Najosjetljivija metoda za dokazivanje amlodipina je ona obrađena u 3. radu budući da najniža koncentracija amlodipina koju je njome moguće detektirati iznosi 0,028  $\mu\text{M}$  (Rebech i sur., 2017).

Zatim slijede DPV i SWV metode iz prvog rada, LOD vrijednosti za amlodipin dobivene njima iznose 0,801  $\mu\text{M}$  i 0,853  $\mu\text{M}$  (Mohammadi i sur., 2009). Najmanje osjetljiva metoda je ona opisana u 2. preglednom radu budući da tamo navedena LOD vrijednost za amlodipin iznosi 1  $\mu\text{g/ml}$  odnosno 2,446  $\mu\text{M}$  (Mohammadi i sur., 2013).

Analogni poredak metoda po osjetljivosti vrijedi i za atorvastatin (3. rad LOD je 0,38  $\mu\text{M}$ , 1. rad LOD je 0,470  $\mu\text{M}$  i 0,595  $\mu\text{M}$  te 2. rad 2,446  $\mu\text{M}$ ).

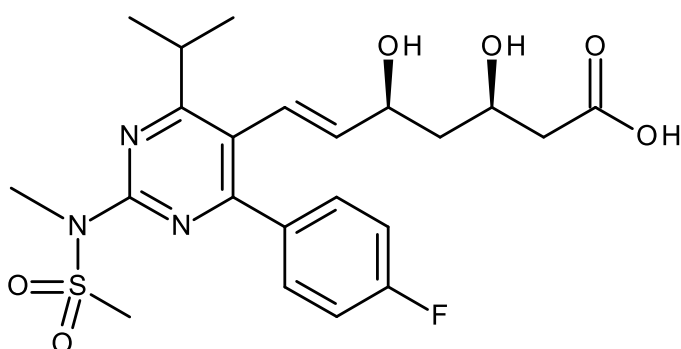
Najšire područje linearnosti za amlodipin dobiveno je metodom iz 2. rada jer je moguće pratiti linearnu ovisnost struje vrha o koncentraciji lijeka u rasponu od 6,11 do 244,6  $\mu\text{M}$  (Mohammadi i sur., 2013). Nešto uži raspon koncentracija opisan je u 1. radu: 4 – 100  $\mu\text{M}$  (Mohammadi i sur., 2009). Najuže područje linearnosti je ono iz 3. rada: 2,0 – 28  $\mu\text{M}$  (Rebech i sur., 2017). Sve isto vrijedi i za atorvastatin (2. rad linearnost od 4,48 do 179  $\mu\text{M}$ , 1. rad od 2 do 100  $\mu\text{M}$  i 3. rad od 1 do 50  $\mu\text{M}$ ).

Nadalje, sve tri metode iskorištene su i za dokazivanje i određivanje amlodipina i atorvastatina u farmaceutskim oblicima tj. tabletama u kojima se ova dva lijeka nalaze u fiksnim kombinacijama. Tim analizama dobivene su sljedeće R vrijednosti (prinos): 100,92% (DPV) i 100,46 % (SWV) za amlodipin, 100,28% (DPV) i 100,67% (SWV) za atorvastatin (Dogan-Topal i sur., 2009), u 2. radu analizom su dobiveni prinosi od 98,8% za amlodipin i 101,5% za atorvastatin (Mohammadi i sur., 2013). R vrijednost dobivena metodom opisanom u 3. radu iznosila je 95% (Rebech i sur., 2017). Može se zaključiti kako je najtočnija metoda za istovremeno određivanje amlodipina i atorvastatina ona razvijena u 1. radu. Međutim, visoki prinosi i preostale dvije metode navode nas na zaključak da su voltametrijske metode selektivne i točne za istovremenu analizu ova dva lijeka bez interferencija otapala i ostalih pomoćnih tvari korištenih u oblikovanju dozirnih oblika što je još jedna njihova prednost za simultanu analizu lijekova (Mohammadi i sur., 2013).



#### 4.2.3. AMLODIPIN I ROSUVASTATIN

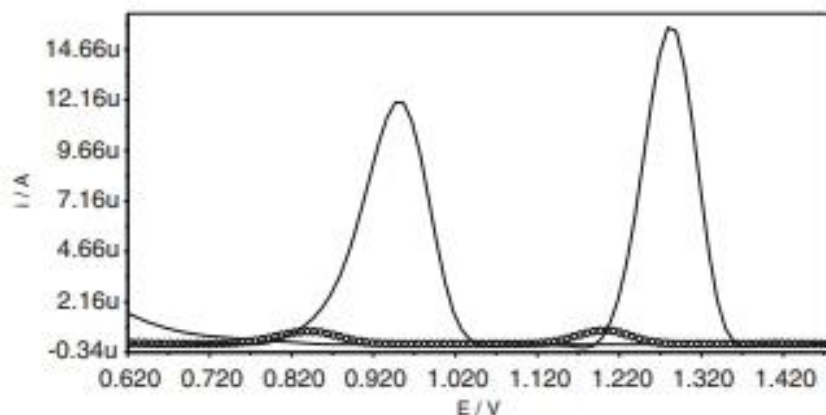
Visokopotentni statin, koji se uz atorvastatin, vrlo često koristi za liječenje hiperlipidemije je i rosuvastatin (Slika 10.). On se također kombinira s amlodipinom i za liječenje su dostupne njihove fiksne kombinacije u jednoj tableti. Iz ovih i već ranije navedenih razloga od interesa je farmaceutske industrije razvijati selektivne i precizne elektroanalitičke metode za njihovu simultanu analizu. Pretraživanjem relevantne literature pronađena su samo dva rada koja obrađuju tu tematiku. U prvom od ta dva rada, istraživači su za njihovu simultanu analizu koristili kromatografske metode (HPLC i UPLC) kao i voltametrijske metode.



**Slika 10.** Kemijska struktura rosuvastatina

Zbog teme samog diplomskog rada, ovdje će veći naglasak biti na voltametrijskim metodama. Cikličkom voltametrijom proučeno je elektrokemijsko ponašanje amlodipina i rosuvastatina na površini staklaste ugljikove elektrode (Karadas-Bakirhan i sur., 2016 ). Zaključeno je da oba lijeka prolaze kroz ireverzibilne reakcije oksidacije koje se vide kao dva jasna dobro definirana oksidacijska pika na potencijalima 0,94 V za amlodipin i 1,25 V za rosuvastatin (Slika 11.). Mehanizam oksidacije amlodipina poznat je i naveden ranije, a za rosuvastatin točan mehanizam do sad još nije utvrđen. Nadalje, zaključeno je da se porastom pH ispitivane otopine oksidacijski potencijal amlodipina pomiče prema manje pozitivnim vrijednostima, što ukazuje na sudjelovanje protona u tom procesu. Također, oksidacijski pik rosuvastatina se smanjivao kako se pH otopine pufera povećavao. Zbog dobivenih najnižih LOD i LOQ vrijednosti, najbolje selektivnosti i ponovljivosti te najboljeg razdvajanja pikova amlodipina i rosuvastatina kao optimalni medij odabrana je 0,5 M otopina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Za kvantitativnu analizu amlodipina i rosuvastatina korištene su i pravokutnovalna i diferencijalno-pulsna voltametrija te iako su se obje pokazale pogodnima za simultanu

analizu, pravokutnovalna voltometrija se pokazala više osjetljivom te je ona korištena u daljnjoj analizi.



**Slika 11.** Pravokutnovalni voltamogrami amlodipina (5,67  $\mu\text{g/ml}$ ) i rosuvastatina (10,0  $\mu\text{g/ml}$ ) snimljeni na površini staklaste ugljikove elektrode pri neoptimiziranim uvjetima (deblja linija pri dnu) i pri optimiziranim uvjetima (puna crna linija) (preuzeto i prilagođeno iz Karadas-Bakirhan i sur., 2016 sukladno CC4 licenci)

U drugom radu lijekovi su također analizirani HPLC-om i voltametrijskim metodama tj. diferencijalno-pulsnom voltametrijom. Ovdje su elektrokemijske reakcije analita proučavane pomoću platinske disk elektrode ( Yilmaz i Yilmaz, 2020).

Voltametrijskom metodom opisanom u prvom radu dobivene su LOD vrijednosti za amlodipin i rosuvastatin u iznosu od 0,001  $\mu\text{g/ml}$  te 0,003  $\mu\text{g/ml}$ , što ju čini puno osjetljivijom od kromatografskih metoda obrađenih u istom radu (LOD vrijednosti kromatografske metode su 0,011 i 0,027  $\mu\text{g/ml}$ ) ( Karadas-Bakirhan i sur., 2016). S druge strane, kromatografske metode pokrile su širi raspon koncentracija s područjem linearnosti od 0,5 do 100  $\mu\text{g/ml}$ , dok je pomoću SWV metode dobiveno područje linearnosti iznosilo od 0,006 do 2,85  $\mu\text{g/ml}$  za amlodipin i od 0,01 do 5  $\mu\text{g/ml}$  za rosuvastatin.

Nadalje, kao što su voltametrijskim metodama dobivene niže LOD vrijednosti nego kromatografskim tako je i s LOQ vrijednostima, odnosno najnižim koncentracijama analita koje je moguće pouzdano odrediti ispitivanom metodom. LOQ vrijednost za amlodipin dobivena SWV metodom iznosila je 0,004  $\mu\text{g/ml}$ , a HPLC-om 0,082  $\mu\text{g/ml}$ . Isto to vrijedi i za rosuvastatin (0,009  $\mu\text{g/ml}$  za SWV i 0,128  $\mu\text{g/ml}$  za HPLC). Drugačiji rezultati dobiveni su u drugom radu, LOQ vrijednost dobivena HPLC-om bila je niža od one dobivene diferencijalno-pulsnom voltametrijom (0,06  $\mu\text{g/ml}$  i 0,21  $\mu\text{g/ml}$  za amlodipin i rosuvastatin)

te se iz toga može zaključiti kako je SWV metoda opisana u 1. radu osjetljivija za određivanje amlodipina i rosuvastatina od one opisane u 2. radu (Yilmaz i Yilmaz, 2020).

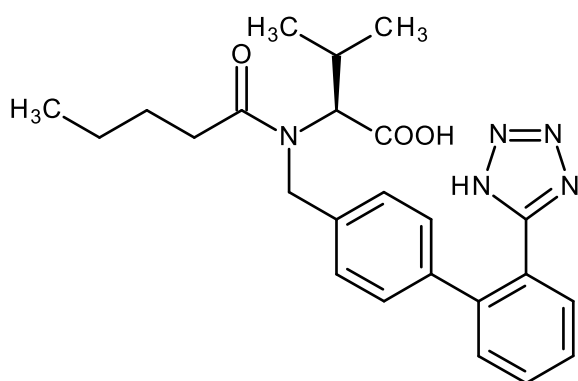
Objekti voltametrijske metode su uspješno iskorištene za simultanu analizu lijekova u farmaceutskom obliku tj. tableti. Pritom su dobivene visoke vrijednosti analitičkog prinosa (101,8 % za amlodipin i 100,3 % za rosuvastatin ) što ukazuje na visoku točnost, ali i selektivnost metoda bez utjecaja pomoćnih tvari iz tableta na voltametrijske odgovore samih lijekova, odnosno njihovo kvantitativno određivanje. Također, rezultati dobiveni kromatografskim i voltametrijskim metodama u prvom istraživanju uspoređeni su statistički uz pomoć studentovog  $t$  testa i  $F$  testa. Tim testovima je zaključeno da između njih nema značajnih razlika što se tiče točnosti i preciznosti metode (Karadas – Bakirhan i sur., 2016).

To sve još jednom potvrđuje veliki potencijal koje nude voltametrijske metode, budući da su svojom preciznošću i točnošću usporedive s jednom od najšire primjenjivanih tehnika u analitici lijekova: HPLC-om, a značajno su jeftinije i jednostavnije za analizu od spomenute. Osim toga, pokazano je da iako pokrivaju niži raspon koncentracija u kojem se postiže linearnost odnosa koncentracija i voltametrijskih strujnih vrhova od kromatografskih tehnika, mogu biti korisne za detekciju i određivanje značajno nižih koncentracija nego što je to slučaj s HPLC-om i UPLC-om. Dakle, voltametrijske metode mogu biti pogodne za simultano određivanje amlodipina i rosuvastatina, a hoće li ih (i koju točno) analitičar izabrati ispred kromatografskih metoda ovisi naravno o zahtjevima same analize (npr. je li važnije pokriti širi raspon koncentracija ili postići niže LOD i LOQ vrijednosti).

Nadalje, pregledom literature uočeno je da nema objavljene niti jedne voltametrijske metode za istovremeno određivanje amlodipina i rosuvastatina koja se temelji na elektrokemijskom senzoru dizajniranom korištenjem nanomaterijala koji također imaju značajan potencijal u poboljšanju izvedbenih značajki voltametrijskih metoda.

#### 4.2.4. AMLODIPIN I VALSARTAN

Vrlo važne i široko primjenjivane skupine antihipertenziva su one koje djeluju na endogeni RAAS sustav. Jedna od njih su i blokatori AT1 receptora (receptora za angiotenzin II), a u tu skupinu spada i valsartan (Slika 12.). On je potentan i visoko selektivan antagonist AT1 receptora, preko kojih angiotenzin II ostvaruje sve svoje negativne učinke na kardiovaskularni sustav. Blokiranjem tih receptora valsartan, a tako i ostali sartani, sprječava vazokonstrikciju posredovanu angiotenzinom II, dilatira krvne žile i posljedično snižava povišeni krvni tlak. (Erden i sur., 2014). U slučajevima kad dobra kontrola krvnog tlaka nije postignuta samostalno uz amlodipin ili valsartan u liječenju se može uvesti njihova fiksna kombinacija. Budući da se radi o kombinaciji antihipertenziva velike farmakološke aktivnosti, kontrola sadržaja lijekova u gotovom farmaceutskom obliku je važna, ponekad čak i ključna za zdravlje i sigurnost pacijenata koji koriste tu terapiju.



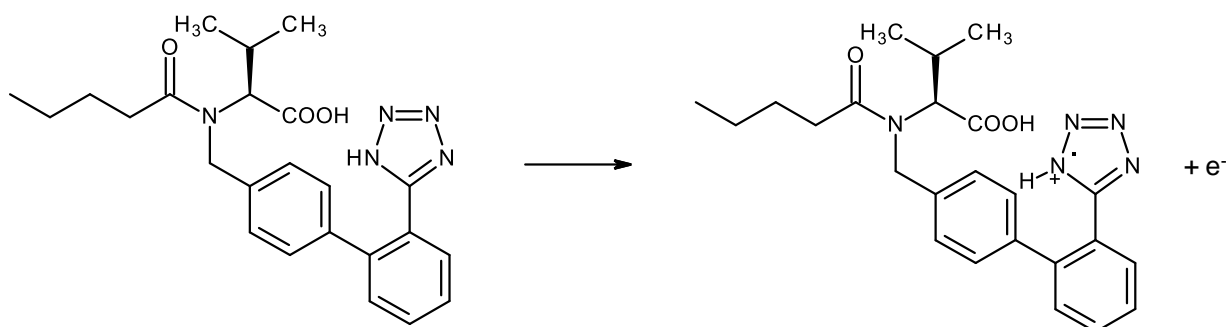
**Slika 12.** Kemijska struktura valsartana

Dakle, vrlo je poželjno imati jednostavne i selektivne analitičke metode za simultano dokazivanje i određivanje ova dva lijeka kako u biološkim uzorcima tako i u dozirnom obliku, ponajviše za potrebe kontrole kvalitete tijekom rutinske analize (Mansano i sur., 2015). U nastavku slijedi usporedba dvije voltametrijske metode obrađene u dva znanstvena rada.

U prvom preglednom radu razvijena je diferencijalna pulsna voltometrija uz korištenje dijamantne elektrode s primjesama bora (Mansano i sur., 2015). BDD elektroda je vrlo korisna u elektroanalitici zbog toga što pokriva široki radni raspon potencijala u vodenim otopinama, a to omogućuje kvantifikaciju elektroaktivnih analita bez interferencija ostalih spojeva iz vodene otopine. Uz to, karakterizira ju i visoka stabilnost, inertnost njezine površine za adsorpciju produkata reakcije, dobra otpornost prema pasivizaciji te niska osjetljivost prema otopljenom kisiku.

Razlika u potencijalima od 0,575 V između oksidacijskih pikova amlodipina (potencijal oksidacije 0,785 V) i valsartana (potencijal oksidacije 1,36 V) pokazala se dovoljnom za simultano selektivno određivanje ova dva lijeka. Zaključeno je kako oba lijeka prolaze kroz ireverzibilne reakcije oksidacije, pri čemu u procesu oksidacije valsartana sudjeluje jedan elektron, a tijekom oksidacije amlodipina dva, kao što je već ranije navedeno.

U strukturi valsartana smatra se da se oksidacija događa u tetrazolnom prstenu (Slika 13.). Najbolji uvjeti postignuti su pri pH 5 u Britton-Robinson puferu, što je u skladu s radovima obrađenima ranije u ovom poglavlju diplomskog rada. Pomoću SWV pokazano je da promjena koncentracije jednog lijeka u otopini nije imala značajan utjecaj na oksidacijski strujni vrh i potencijal oksidacije drugog lijeka te da su oksidacijski procesi amlodipina i valsartana na površini katodno tretirane BDD elektrode potpuno neovisni jedan o drugome.



**Slika 13.** Reakcija oksidacije valsartana

U drugom znanstvenom radu elektroaktivnost amlodipina i valsartana proučena je uz pomoć cikličke voltametrije i SWV upotrebom staklaste ugljikove elektrode (Erden i sur., 2014). Oksidacijski pik amlodipina dobiven je na potencijalu 0,95 V, a valsartana na 1,15 V. Također je zaključeno kako su oba oksidacijska procesa ireverzibilna te da su posljedica dijelom i adsorpcije i difuzije na površini staklaste ugljikove elektrode. Nadalje, ponovno je i ovdje potvrđeno da se povišenjem pH pufera pikovi oksidacije pomiču prema manje anodnom potencijalu (tj. oksidacija se lakše odvija prvi višem pH) što ukazuje na korak deprotonacije molekule prije samog transfera elektrona. Diferencijalno pulsnom voltametrijom dobiveni su najviše simetrični, najbolje odvojeni i najveći pikovi oksidacije stoga je ona korištena u daljnjoj optimizaciji metode za kvantitativnu analizu.

Što se linearnosti metoda tiče, metodom iz 1. rada dobivena su sljedeća područja linearnosti: 0,497 – 28  $\mu\text{M}$  za amlodipin i 19,8 – 280  $\mu\text{M}$  za valsartan (Mansano i sur., 2015).

U usporednoj metodi dobiven je širi raspon koncentracija za amlodipin (1 – 35  $\mu\text{M}$ ), a uži za valsartan (1,5 – 32  $\mu\text{M}$ ) (Erden i sur., 2014).

LOD vrijednosti za amlodipin i valsartan dobivene u prvom radu iznosile su: 0,0764  $\mu\text{M}$  i 0,193  $\mu\text{M}$  (Mansano i sur., 2015). Dakle, ta se metoda pokazala osjetljivijom od one opisane u 2. radu jer su tamo LOD vrijednosti za amlodipin i valsartan iznosile 0,31 i 0,36  $\mu\text{M}$  (Erden i sur., 2014). Također, metodom opisanom u 2. radu dobivene su LOQ vrijednosti od 1,03  $\mu\text{M}$  za amlodipin i 1,21  $\mu\text{M}$  za valsartan, dok u 1. radu autori ne navode limite određivanja.

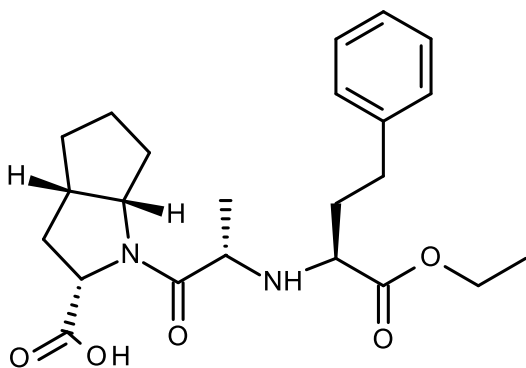
Obje metode uspješno su primjenjene za analizu oba lijeka iz kombiniranih tableta pri čemu su dobivene visoke R vrijednosti: 96,24% za amlodipin i 100,35 % za valsartan (Mansano i sur., 2015) te 94,8 – 107% za amlodipin i 93,1 – 106 % za valsartan (Erden i sur., 2014), što ukazuje na izostanak utjecaja matriksa uzoraka na analizu ova dva lijeka.

Nadalje, ispitana je i uspješnost metoda u analizi lijekova u biološkim uzorcima: u 1. radu lijekovi su analizirani u sintetičkom urinu cijepljenom standardnom otopinom lijeka, a u 2. radu je kao biološki uzorak korišten humani serum cijepljen standardnom otopinom lijeka. Pri tome, voltametrijski su izmjerene bazne linije bioloških uzoraka bez sadržanih ispitivanih lijekova te je zaključeno da nema dodatnih voltametrijskih signala u okolini oksidacijskih pikova amlodipina i valsartana. To, uz visoke vrijednosti prinosa iz te složene matrice uzorka čine metode dovoljno selektivnima za analizu lijekova u biološkim uzorcima bez interferencija organskih i anorganskih spojeva prisutnih u njima.

Zaključno, iako su obje opisane metode jednostavne, učinkovite i selektivne za simultanu analizu amlodipina i valsartana, ona opisana u 1. radu pokazala se osjetljivijom i pokrila je širi linearni raspon koncentracija valsartana. Također, još jedna njena prednost je eliminiranje potrebe za obnovom površine elektrode prije svakog mjerenja budući da je korištena BDD elektroda. Na njezinoj površini nije zamjećena adsorpcija oksidacijskih produkata amlodipina i valsartana i poprilično je otporna prema deaktivaciji. S druge strane, staklasta ugljikova elektroda korištena u metodi opisanoj u 2. radu pri visokim oksidacijskim potencijalima može korodirati i pritom podlijeći mikrostrukturnim i površinskim kemijskim promjenama (Mansano i sur., 2015). Te promjene mogu značajno utjecati na voltametrijski odgovor elektrode prema analitima zbog čega ona zahtijeva česte i dugotrajne postupke čišćenja površine prije mjerenja, a to pak može utjecati na odabir metode tj. elektrode ovisno o potrebama analize i vremenu koje analitičar ima na raspolaganju za istu.

#### 4.2.5. AMLODIPIN I RAMIPRIL

Uz već spomenute sartane, na endogeni RAAS sustav djeluju i inhibitori angiotenzin konvertirajućeg enzima (ACE inhibitori). Lijek takvog mehanizma djelovanja je i ramipril (Slika 14.). On je zapravo prolijek koji se deesterifikacijom u jetri prevodi u svoj aktivni oblik ramiprilat koji onda blokira aktivnost angiotenzin konvertaze. Blokiranjem tog enzima sprječava se nastanak angiotenzina II iz prekursora angiotenzina I i posljedično njime posredovana vazokonstrikcija, što onda dovodi do snižavanja krvnog tlaka. Osim za hipertenziju primjenjuje se i u liječenju kongestivnog zatajenja srca i bubrežnih problema, a kombinacija ramiprila i amlodipina se, osim što djeluje sinergistički na snižavanje povišenog krvnog tlaka, pokazala korisnom u sprječavanju oštećenja srca, bubrega i mozga (Doulache i sur., 2020).



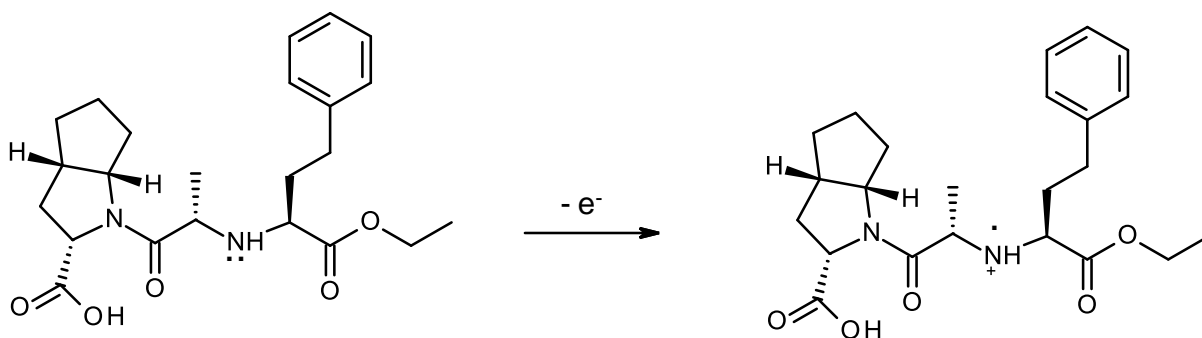
**Slika 14.** Kemijska struktura ramiprila

Iako su za simultanu analizu amlodipina i ramiprila dostupne metode poput HPLC-a i UV – spektrofotometrije njihova dugotrajnost, kompleksnost i visoka cijena ne čini ih uvijek prvim metodama izbora. Kao što je već na nekoliko mjesta u ovom diplomskom radu objašnjeno i pokazano, nedostaci tih metoda čine voltametrijske i ostale elektrokemijske metode vrlo atraktivnima za daljnje razvijanje i proučavanje za potrebe simultane analize lijekova (Doulache i sur., 2020). Također, kao što je već spomenuto, modificiranje površina elektroda različitim materijalima pokazalo se korisnim u vidu postizanja veće osjetljivosti elektroda i promoviranja procesa prijenosa elektrona elektroaktivnih analita. Jedna od takvih modifikacija je i korištenje polimernih filmova koji se odlikuju visokom stabilnošću, osjetljivošću i selektivnošću prema različitim analitima, snažnom prijanjanju za površinu elektrode, sposobnošću osiguravanja veće površine zbog formiranja homogenog filma i ubrzavanja procesa transfera elektrona.

U radu koji se bavi temom istovremene analize amlodipina i ACE inhibitora ramiprila korišten je poli-glicinski film za modificiranje površine staklaste ugljikove elektrode (GCE) (Doulache i sur., 2020). Anodni pikovi amlodipina i ramiprila dobiveni su na potencijalima 0,75 i 1.34 V te je zbog izostanaka redukcijskih pikova zaključeno kako se kod oba lijeka radi o ireverzibilnoj oksidaciji. Ta razlika u potencijalima dovoljna je za provedbu uspješne simultane analize.

Ispitan je i utjecaj debljine polimernog filma i koncentracije otopine monomera na analizu te se uvidjelo kako je optimalno vrijeme elektropolimerizacije 40 sekundi. Vrlo tanki polimerni film na površini GCE ne posjeduje dovoljno efikasna aktivna mjesta za interakciju s molekulama lijekova, a vrlo debeli film ometa proces transfera elektrona. Optimalna koncentracija monomera iznosila je 0,04 M. Najbolji uvjeti postignuti su pri pH pufera 1,0. Nadalje, zaključeno je i da u elektrokemijskim događajima na površini elektrode modificirane polimernim filmom uglavnom dominira adsorpcija.

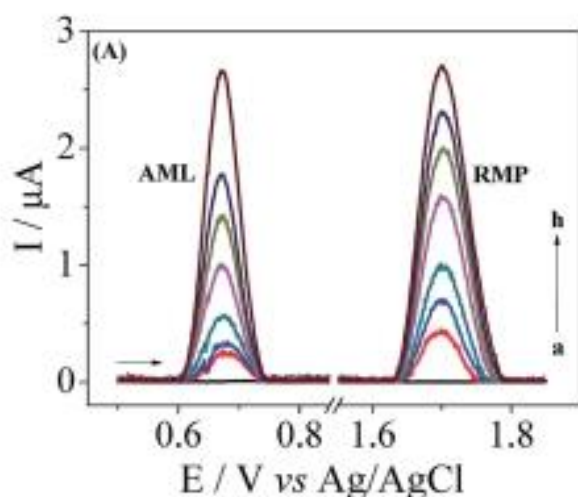
Uz već objašnjen mehanizam oksidacije amlodipina (istovjetan opisan i u ovom radu) pretpostavljeno je da oksidacija ramiprila uključuje sekundarni amin uz gubitak jednog elektrona (Slika 15.). Da bi se dokazalo da je ova dva lijeka moguće dokazati istovremeno, svaki je analiziran u prisutnosti ovog drugog pomoću diferencijalno pulsne adsorptivne *stripping* voltametrije. Pritom je zaključeno da promjena u koncentraciji jednog lijeka nema značajan utjecaj na promjenu potencijala oksidacije i strujnog vrha drugog lijeka te da su oksidacijski procesi amlodipina i ramiprila na površini modificirane GCE poli-glicinskim filmom neovisni jedan o drugome.



**Slika 15.** Reakcija oksidacije ramiprila



Slični su rezultati dobiveni u 2. radu koji obrađuje istu tu temu, a u tom radu metoda je razvijena uz pomoć dijamantne elektrode s primjesama bora koja je za potrebe analize bila katodno tretirana budući da o toj obradi elektrode ovisi elektrokemijsko ponašanje analita (Moraes i sur., 2019). Tako je uz katodno tretiranu BDD elektrodu ramipril pokazao jasno definiran oksidacijski pik na potencijalu 1,54 V, za razliku od nejasnog, slabo definiranog oksidacijskog procesa pri 1,65 V uz anodno tretiranu BDD elektrodu. U ovom slučaju kao optimalan pH izabran je 6 (Britton - Robinson pufer) budući da je osigurao porast vrijednosti struje za oba lijeka. Dobiveni razmak između pikova iznosio je 0,895 V što je dovoljno za njihovu uspješnu simultanu analizu (Slika 16.). Za razliku od prethodnog rada, u ovom je zaključeno kako su procesi na elektrodi uglavnom kontrolirani difuzijom.



**Slika 16.** Diferencijalno pulsni voltamogrami dobiveni uz dijamantnu elektrodu s primjesama bora u Britton – Robinsonovom puferu pH 6 koji je sadržavao (a) 0 i (b – h) 0,99 – 14,0  $\mu\text{mol/L}$  amlodipina i 0,29 – 1,98  $\mu\text{mol/L}$  ramiprila (preuzeto i prilagođeno iz Moraes i sur., 2019 sukladno CC4 licenci)

Simultano određivanje korištenjem BDD elektrode izvedeno je i pravokutnovalnom i diferencijalno-pulsnom voltametrijom, a budući da se DPV pokazala osjetljivijom (dobivene su niže LOD vrijednosti) za oba lijeka ona je odabrana za daljnji razvoj metode. Uspoređeni su rezultati dobiveni tom analizom s drugim dostupnim rezultatima dobivenim drugim metodama (npr. HPLC uz UV detekciju, spektrofotometrija) te se zaključilo kako su dobivene vrijednosti za LOD i područje linearnosti usporedive, a u nekim slučajevima čak i bolje.

Uz to, priprema uzoraka za voltametrijsku analizu bila je jednostavna i samom analizom stvoreno je manje otpada (toksična organska otapala) što je u skladu sa zahtjevima zelene kemije i još je jedna od prednosti voltametrijskih metoda (Moraes i sur., 2019).

Analogno ranije opisanoj metodi iz 1. rada i ovdje je zaključeno kako mijenjanjem koncentracije jednog lijeka u otopini ne dolazi do promjene oksidacijskog pika onog drugog čime je potvrđena neovisnost oba elektrokemijska procesa.

Usporedbom dviju razvijenih voltametrijskih metoda može se zaključiti da je prva metoda pokrila šire područje linearnosti za oba analita: 0,5 – 25  $\mu\text{M}$  (Doulache i sur., 2020) dok je 2. metodom dobiveno linearno područje za amlodipin iznosilo od 0,99 do 14  $\mu\text{M}$ , a za ramipril je bilo značajno uže; od 0,29 do 1,29  $\mu\text{M}$  (Moraes i sur., 2019). Uz modificiranu staklastu ugljikovu elektrodu (Doulache i sur., 2020) limiti detekcije za amlodipin i ramipril iznosili su 0,08 i 0,130  $\mu\text{M}$ , a uz katodno tretiranu BDD elektrodu (Moraes i sur., 2019) 0,26 i 0,08  $\mu\text{M}$ . Dakle, metoda opisana u 1. radu osjetljivija je za detekciju amlodipina od one druge, a obrnuto vrijedi za ramipril. Druga voltametrijska metoda ispitana je i u analizi amlodipina i ramiprila iz kombiniranog dozirnog oblika te usporedbom s komparativnom metodom nisu pronađene značajne razlike u dobivenom sadržaju lijekova ni značajni utjecaj pomoćnih tvari iz farmaceutskog oblika na rezultate (Moraes i sur., 2019).

Obje metode pokazale su se uspješnima i prilikom analize bioloških uzoraka; 1. metoda koristila se za analizu lijekova iz humanog seruma i urina, a 2. je kao biološki uzorak koristila serum štakora. Dobivene su visoke vrijednosti analitičkih prinosa čime je potvrđena mogućnost korištenja obje metode i za analizu bioloških uzoraka.

#### 4.2.6. AMLODIPIN I OSTALI LIJEKOVI KOJI SE KORISTE U TERAPIJI HIPERTENZIJE

Pretraživanjem literature pronađeni su i radovi koji obrađuju upotrebe voltametrijskih metoda za simultanu analizu amlodipina i još nekih lijekova koji nisu obrađeni ranije u ovom diplomskom radu. Tako je amlodipin moguće analizirati i istovremeno s još nekim ACE inhibitorima, kao što su enalapril i lizinopril, zatim s blokatorom AT1 receptora irbesartanom, beta blokatorom atenololom te još jednim blokatorom kalcijevih kanala: nifedipinom. U Tablici 2. navedeni su lijekovi analizirani istovremeno s amlodipinom te metode i elektrode korištene u tu svrhu.

**Tablica 2.** Voltametrijske metode za analizu amlodipina i drugih lijekova koji se koriste u terapiji hipertenzije uz pripadajuće elektrode

<b>Lijek analiziran istovremeno s amlodipinom</b>	<b>Vrsta voltametrijske metode</b>	<b>Elektroda</b>
Enalapril	Pravokutnovalna voltametrija	<i>Carbon paste</i> elektroda modificirana višeslojnim ugljikovim nanocjevčicama uz kationski surfaktant cetiltrimetilamonijev bromid (CTAB) (Valezi i sur., 2014)
Lizinopril	Pravokutnovalna voltametrija	PANI-CeO <sub>2</sub> /zlatno senzor (Jadon i sur., 2019)
Irbesartan	Pravokutnovalna voltametrija	Kapajuća živina elektroda (Palabiyik i sur., 2022)
Atenolol	Pravokutnovalna voltametrija	Katodno tretirana dijamantna elektroda s primjesama bora (Moraes i sur., 2016)
Nifedipin	Ciklička i pravokutnovalna voltametrija	Zlatna elektroda (Stoiljkovic i sur., 2013)

Iz toga se da zaključiti kako su voltametrijske metode izuzetno korisne i primjenjive za simultanu analizu velikog broja lijekova različitih mehanizama djelovanja, kemijskih struktura i farmakoterapijskih skupina. To je od iznimne važnosti za analitiku lijekova, posebno antihipertenziva koji se vrlo često kombiniraju zajedno pa samim time i zahtijevaju jednostavne, točne i selektivne metode za istovremenu analizu.

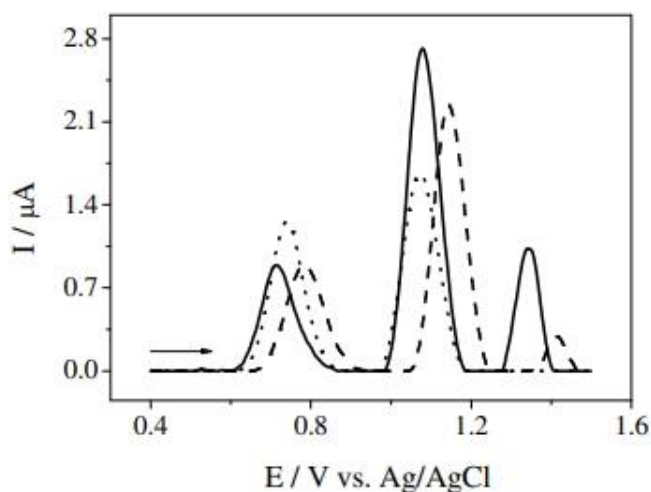
#### 4.2.7. AMLODIPIN, HIDROKLOROTIAZID I VALSARTAN

Kao što je ranije spomenuto, hipertenzija je bolest na koju utječe veći broj čimbenika i to ju ponekad čini vrlo teškom za kontrolu. Danas sve većem broju pacijenata dvojna antihipertenzivna terapija nije dovoljna za postizanje optimalnih vrijednosti krvnog tlaka te se kod njih u terapiju uvodi i treći (ponekad i četvrti lijek) kako bi se povišeni krvni tlak snizio. Budući da je poznato da porastom broja lijekova u terapiji opada adherencija pacijenata, a to onda potencijalno ugrožava i ishode liječenja bolesti (zaboravljivost, svjesno/nesvjesno neuzimanje lijeka zbog politerapije) korisna alternativa je izrada jednog farmaceutskog oblika koji će sadržavati tri lijeka u fiksnoj kombinaciji.

Iz tog razloga javlja se i potreba za razvojem metoda koje će biti uspješne u analiziranju tri i više lijekova istovremeno, a tu ponovno potencijal imaju voltametrijske metode. Pronađeni su pregledni radovi koji opisuju razvoj voltametrijskih metoda za analizu amlodipina uz još dva ili tri lijeka što će detaljnije biti opisano u nastavku.

Kombinacija tri antihipertenziva kao što je ona amlodipina, hidroklorotiazida i valsartana koristi se za liječenje hipertenzije u slučajevima kad se ovi lijekovi korišteni zasebno nisu pokazali uspješnima. Budući da ova kombinacija tri lijeka posjeduje snažno farmakološko djelovanje na snižavanje krvnog tlaka, za zdravlje i sigurnost pacijenata tijekom liječenja važna je kontrola sadržaja lijekova u farmaceutskim oblicima. Iz tog je razloga potrebno razvijati metode za simultanu analizu ova tri lijeka.

Mansano i suradnici opisuju razvoj takve voltametrijske metode (SWV) uz upotrebu katodno tretirane dijamantne elektrode s primjesama bora (Mansano i sur., 2015). Cikličkom voltametrijom dokazali su na voltamogramu prisutnost tri oksidacijska pika, na najnižem potencijalu (0,781 V) dogodila se oksidacija amlodipina, na 1,14 V hidroklorotiazida i na 1,41 V valsartana. Razlike u potencijalima za ta tri procesa su dovoljno velike da se može postići simultana analiza za sva tri analita. Sva tri procesa oksidacije su bila ireverzibilna.



**Slika 17.** Pravokutnovalni voltamogrami uzorka s  $1,9 \times 10^{-6}$  mol/L amlodipina,  $9,7 \times 10^{-6}$  mol/L hidroklorotiazida i  $4,9 \times 10^{-5}$  mol/L valsartana u Britton – Robinson puferu pri različitim pH vrijednostima: 4 – crtkana linija, 5 – puna linija i 6 – točkasta linija, dobiven uz katodno tretiranu dijamantnu elektrodu s primjesama bora (preuzeto i prilagođeno iz Mansano i sur., 2015 uz suglasnost izdavača)

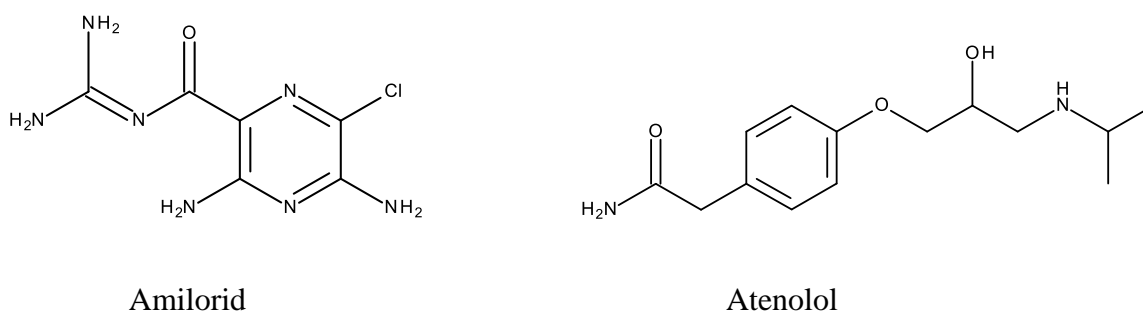
Pretpostavljeni mehanizmi oksidacije lijekova i izračunati broj elektrona koji sudjeluje u tim procesima u skladu je s rezultatima drugih studija, navedenima ranije u diplomskom radu. Kao optimalan pH izabran je pH 5 (Britton-Robinson pufer) zbog najbolje ponovljivosti analitičkih signala (Slika 17.).

Dobivena područja linearnosti iznosila su: 0,49 – 7,2 μM za amlodipin, 2,9 – 45 μM za hidroklorotiazid i 9,7 – 130 μM za valsartan. Iz tih vrijednosti zaključuje se da se najširi raspon koncentracija unutar kojih se može razmatrati linearnost koncentracije i anodne struje postiže za valsartan. Također, autori navode kako se metoda može koristiti za određivanje ovih lijekova u svim farmaceutskim oblicima, različitim doza, dostupnih na tržištu. Pomoćne tvari iz komercijalnih tableta nisu značajno utjecale na određivanje ova tri lijeka, kao ni askorbinska kiselina, dopamin i mokraćna kiselina, za koje je utvrđeno da se oksidiraju pri nižim potencijalima (0,5 V), a prepoznati su kao moguće interferencije iz uzorka urina. Dakle, metoda se može koristiti i u analizi bioloških uzoraka tj. uzoraka urina (Mansano i sur., 2015).

Kao komparativna metoda korištena je HPLC te je usporedbom zaključeno kako nema značajnih razlika između dobivenih vrijednosti sadržaja amlodipina, hidroklorotiazida i valsartana u tabletama. Nadalje, dobivene visoke R vrijednosti ( 97.3% – 102% za amlodipin , 95.1% – 104% za hidroklorotiazid i 98.4% – 103% za valsartan) navode na zaključak kako na ovu metodu ne utječu značajno interferencije matriksa (Mansano i sur., 2015). Dakle, iz cijelog opisa navedene metode može se zaključiti kako je pravokutnovalna voltometrija dobar izbor za simultanu analizu amlodipina u kombinaciji s hidroklorotiazidom i valsartanom zbog svoje jednostavnosti, kratkog vremena analize, dobre selektivnosti i osjetljivosti te niske cijene u usporedbi s npr. HPLC, a potreban je još dodatan razvoj njoj sličnih metoda koji bi omogućio njihovu kritičku usporedbu.

#### 4.2.8. AMLODIPIN, HIDROKLOROTIAZID, AMILORID I ATENOLOL

Uz diuretik hidroklorotiazid, čija je kombinacija s amlodipinom već spomenuta ranije u ovom dijelu diplomskog rada, amlodipin se može naći u kombinaciji s još jednim diuretikom: amiloridom i beta blokatorom, atenololom (Slika 18). Amilorid djeluje u distalnim tubulima bubrega gdje povećava ekskreciju natrija, a pritom štedi kalij. Koristi se uglavnom u kombinaciji s ostalim diureticima za snižavanje povišenog krvnog tlaka (Moraes i sur., 2017). Atenolol je kardioselektivni blokator beta 1-adrenergičkih receptora (primarno djeluje u srcu) čime dovodi do smanjenja brzine i intenziteta otkucaja srca. Osim za hipertenziju, koristi se i za liječenje angine pectoris, srčanih aritmija i stanja nakon infarkta miokarda (<https://halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/Atenolol-Pliva-SPC.pdf>).



**Slika 18.** Kemijske strukture amilorida i atenolola

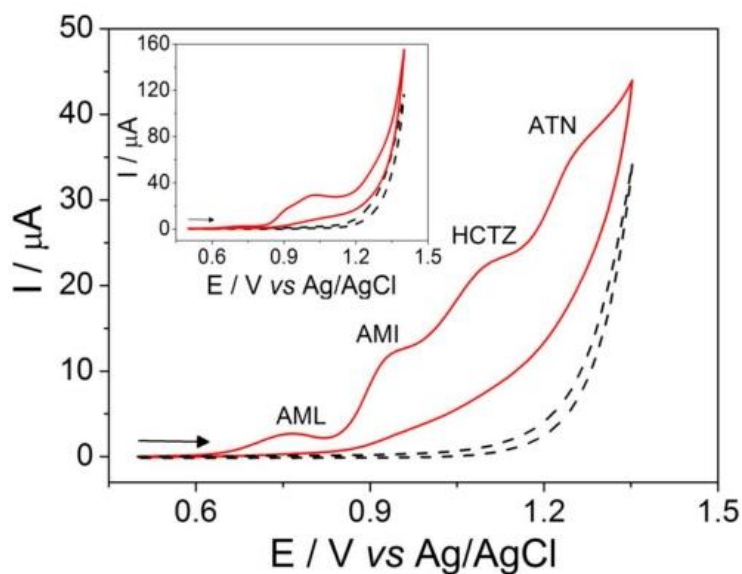
U slučaju kombinacije ova četiri lijeka na hipertenziju se djeluje četirima različitim mehanizmima što potencijalno može ugroziti pacijente i uzrokovati im neželjene nuspojave (npr. jaka hipotenzija) u slučaju da njihov sadržaj u dozirnom obliku nije točno i precizno kontroliran. Zbog toga je, posebno za potrebe kontrole kvalitete u rutinskoj analizi, važno razvijati analitičke metode uspješne u simultanoj detekciji i kvantifikaciji ova četiri lijeka.

Kao što je već poznato, metode koje se mogu koristiti u takvim slučajevima, a da su pritom jednostavne, brze, osjetljive, relativno niskih troškova analize i u skladu s rastućom potrebom zaštite okoliša (manje korištenje toksičnih, organskih otapala) su voltametrijske metode ukoliko su potencijali oksidacije molekula tih lijekova dovoljno različiti.

*Moraes* i suradnici su u svojem znanstvenom radu opisali jednu takvu metodu (Moraes i sur., 2017). Oni su koristili pravokutnovalnu voltametriju uz anodno tretiranu dijamantnu elektrodu s primjesama bora, čije su prednosti pred modificiranim elektrodama već ranije objašnjene, kako bi postigli simultano dokazivanje i određivanje četiri antihipertenziva. Pritom su pri pH 9 amonijevog pufera na voltamogramima dobivena četiri jasna, dobro

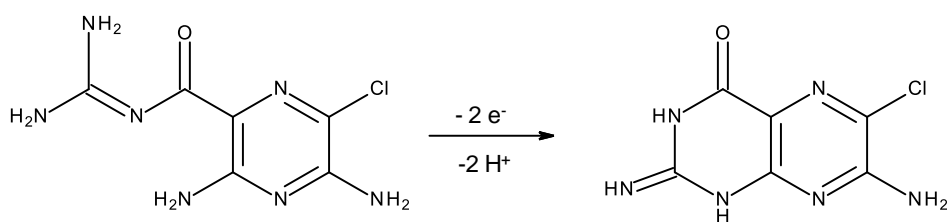


definirana i razdvojena oksidacijska pika (amlodipin 0,68 V, amilorid 0,89 V, hidroklorotiazid 1,04 V i atenolol 1,21 V) (Slika 19.).

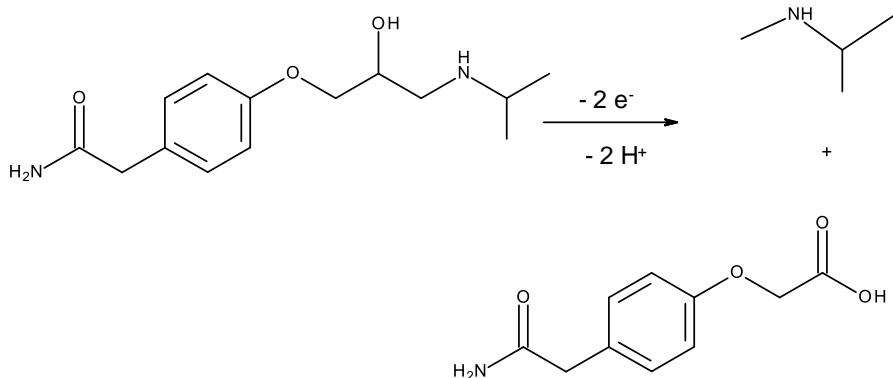


**Slika 19.** Ciklički voltamogram slijepe probe (crtkana linija) i otopine 24.5  $\mu\text{mol/L}$  amlodipina, 136  $\mu\text{mol/L}$  amilorida, 272  $\mu\text{mol/L}$  hidroklorotiazida i 90.7  $\mu\text{mol/L}$  atenolola (puna crvena linija) u amonijevom puferu pH 9 uz anodno tretiranu dijamantnu elektrodu s primjesama bora (preuzeto i prilagođeno iz Moraes i sur., 2017 uz suglasnost izdavača)

Navedene razlike u potencijalima oksidacije tih lijekova, odnosno između strujnih vrhova, bile su dovoljne za uspješno provođenje simultane analize. Uz ranije navedene pretpostavljene mehanizme oksidacije amlodipina i hidroklorotiazida ( istovjetne i u ovome radu ) smatra se da oksidacija amilorida uključuje amino skupinu uz zatvaranje šesteročlanog prstena dok se oksidacija atenolola zbiva na sekundarnom alkoholu, kao što je prikazano na Slikama 20. i 21. (Moraes i sur., 2017).



**Slika 20.** Reakcija oksidacije amilorida



**Slika 21.** Reakcija oksidacije atenolola

Nadalje, kao rezultat analize dobivena su sljedeća područja linearnosti: za amlodipin od 0,9 – 31  $\mu\text{M}$ , amilorid od 8,7 – 125  $\mu\text{M}$ , hidroklorotiazid od 29 do 260  $\mu\text{M}$  i atenolol od 11 do 91  $\mu\text{M}$ . Jasno je da je za hidroklorotiazid navedenom metodom postignuto najšire područje linearnosti, a za amlodipin najuže. Limiti detekcije (LOD) iznosili su 0,30, 0,09, 0,08 i 0,06  $\mu\text{M}$  za amlodipin, amilorid, hidroklorotiazid i atenolol. Dakle, najniže koncentracije koje je ovom metodom moguće detektirati su one atenolola, a najviše amlodipina.

Navedena metoda ispitana je i u analizi komercijalno dostupnih farmaceutskih oblika i uzorka vode iz slavine pri čemu su dobivene visoke R vrijednosti (od 93,9 do 104 %) koje ukazuju na izostanak interferencija matriksa na rezultate analize. Također, točnost metode je potvrđena usporedbom rezultata analize s rezultatima komparativne metode (HPLC) pri čemu između njih nije bilo statistički značajnih razlika. Na kraju, sve navodi na zaključak kako se u ovoj i njoj sličnim voltametrijskim metodama krije značajan potencijal za uspješno određivanje čak četiri lijeka istovremeno iz gotovog farmaceutskog oblika bez dugotrajnih prethodno provedenih postupaka separacije. Daljnji razvoj i istraživanje voltametrijskih metoda za simultano određivanje većeg broja lijekova tek slijedi, budući da je do sad ovo jedina takva opisana metoda kojom su uspješno određena ova četiri lijeka.

## 5. ZAKLJUČCI

Hipertenzija je rastući problem današnjeg društva, što antihipertenzive čini jednima od najšire primjenjivanih lijekova pa je stoga značajan razvoj analitičkih metoda za njihovo određivanje pojedinačno ili istovremeno u kombinaciji s drugim lijekovima u svrhu kontrole kvalitete farmaceutskih oblika ili analizu u biološkim uzorcima u svrhu terapijskog praćenja.

Ovim diplomskim radom pokazuje se veliki potencijal različitih vrsta voltametrijskih metoda u simultanoj analizi jednog od njih, amlodipina s brojnim drugim lijekovima (ostalim antihipertenzivima – valsartanom, ramiprilom, atenololom, diureticima – hidroklorotiazidom i amiloridom te hipolipemicima – atorvastatinom i rosuvastatinom).

U metodama opisanim u znanstvenim radovima analitičari su koristili različite elektrode, koje su nerijetko bile modificiranih površina, kako bi se povećala selektivnosti i osjetljivosti za svaki određivani analit. Razvijene voltametrijske metode uspoređene su s komparativnim metodama pri čemu je dokazano da im nisu inferiornije ni po točnosti ni po preciznosti.

Prikazan je i potencijal voltmetrijskih metoda u uspješnom ispitivanju različitih bioloških uzoraka (serum, urin) kao i primjena u analizi različitih farmaceutskih oblika (uključujući i tablete s fiksnim dozama lijekova).

Također, iz svega prethodno navedenog, vidljivo je da se atraktivnost voltametrijskih metoda za budući razvoj očituje i u njihovoj jednostavnosti, kratkom vremenu analize, niskoj cijeni te smanjenom zagađenju okoliša zbog manje upotrebe toksičnih organskih otapala zbog čega su one u skladu sa zahtjevima zelene kemije. Zbog svega toga, pregledom literature može se zaključiti kako je budućnost analize velikog broja elektroaktivnih lijekova u njihovom voltametrijskom određivanju.

## 6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

ACE – angiotenzin konvertirajući enzim

ARB – blokator receptora za angiotenzin II

AT1 – receptor za angiotenzin II

BDDE – dijamantna elektroda s primjesama bora

C<sup>+</sup>/zB – blokator kalcijevih kanala

DPAdSV – diferencijalna pulsna adsorptivna *stripping* voltometrija

DPV – diferencijalna pulsna voltometrija

GCE – staklasta ugljikova elektroda

HMG-CoA – hidroksi metil glutaril koenzim A

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

HPTLC – tankoslojna kromatografija visoke djelotvornosti

LC – ESI/MS/MS – tekućinska kromatografija spregnuta s elektrosprej ionizacijom i tandemskom masenom spektrometrijom

LC – MS/MS – tekućinska kromatografija spregnuta s tandemskom masenom spektrometrijom

LDL – lipoprotein niske gustoće

LOD – limit detekcije

LOQ – limit kvantifikacije (određivanja)

RAAS – renin angiotenzin aldosteron sustav

SPCE – *screen printed* ugljikova elektroda

SWV – pravokutnovalna voltometrija

UHPLC – ESI/MS/MS – tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti spregnuta s elektrosprej ionizacijom i tandemskom masenom spektrometrijom

UV – ultraljubičasto

## 7. LITERATURA

Abernethy DR. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of amlodipine. *Cardiology*, 1992, 80, 1, 31-36.

Altioikka G, Dogrukol-Ak D, Tunçel M, Aboul-Enein HY. Determination of Amlodipine in pharmaceutical formulations by differential-pulse voltammetry with a glassy carbon electrode. *Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.)*, 2002, 335, 2-3, 104-108.

Amiri M, Imanzade H. Adsorption of Amlodipine at the Surface of Tosyl-Carbon Nanoparticles for Electrochemical Sensing. *Iran. J. Pharm. Res.*, 2017, 15, 3, 303-311.

Arvand M, Samie HA. Electrospun CeO<sub>2</sub>-Au nanofibers/graphene oxide 3D nanonetwork structure for the electrocatalytic detection of amlodipine. *Ionics.*, 2018, 24, 6, 1813 – 1826.

Beitollahi H, Ebadinejad F, Shojaie F, Torkzadeh-Mahani M. A magnetic core-shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>/MWCNT nanocomposite modified carbon paste electrode for amplified electrochemical sensing of amlodipine and hydrochlorothiazide. *Anal. Methods*, 2016, 8, 32, 6185 – 6193.

Cinková K, Svorc L. Sensitive Voltammetric Quantification of Amlodipine in Pharmaceutical Tablets and Human Urine Using a Boron-Doped Diamond Electrode. *XXXV Moderni elektrochemicke metody.*, 2015, 17-21.

da Silva EM, de Oliveira GC, de Siqueira AB, Terezo AJ, Castilho M. Development of a composite electrode based on graphite and polycaprolactone for the determination of antihypertensive drugs. *Microchem. J.*, 2020, 158.

Djaalab E, Samar ME, Zougar S, Kherrat R. Electrochemical Biosensor for the Determination of Amlodipine Besylate Based on Gelatin-Polyaniline Iron Oxide Biocomposite Film. *Catalysts*, 2018, 8, 6.

Dogan-Topal B, Bozal B, Demircigil BT, Uslu B, Ozkan SA. Electroanalytical Studies and Simultaneous Determination of Amlodipine Besylate and Atorvastatine Calcium in Binary Mixtures Using First Derivative of the Ratio-Voltammetric Methods. *Electroanalysis*, 2009, 21, 22, 2427 – 2439.

Doulache M, Bakirhan NK, Saidat B, Ozkan SA. Highly Sensitive and Selective Electrochemical Sensor Based on Polyglycine Modified Glassy Carbon Electrode for Simultaneous Determination of Amlodipine and Ramipril from Biological Samples. *J. Electrochem. Soc.*, 2020, 167, 2.

Emami M, Shamsipur M, Saber R. Design of poly-L-methionine-gold nanocomposit/multi-walled carbon nanotube modified glassy carbon electrode for determination of amlodipine in human biological fluids. *J. Solid State Electrochem.*, 2014, 18,4, 985 – 992.

Erden PE, Tasdemir IH, Kaçar C, Kiliç E. Simultaneous Determination of Valsartan and Amlodipine Besylate in Human Serum and Pharmaceutical Dosage Forms by Voltammetry. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2014, 9, 5, 2208-2220.

Fard GP, Sabzi RE. Preparation of TiO<sub>2</sub> Nanoparticles-Au Nanoparticles-chitosan Nanocomposite Modified Pencil Graphite Electrode: Application for Electrochemical Measurement of Amlodipine in Biological and Pharmaceutical Samples. *J. Anal. Chem.*, 2023, 78, 6, 737- 747.

Fares H, DiNicolantonio JJ, O'Keefe JH, Lavie CJ. Amlodipine in hypertension: a first-line agent with efficacy for improving blood pressure and patient outcomes. *Open Heart*, 2016, 3, 2.

Firouzi M, Giahi M, Najafi M, Homami SS, Mousavi SHH. Electrochemical determination of amlodipine using a CuO-NiO nanocomposite/ionic liquid modified carbon paste electrode as an electrochemical sensor. *J. Nanopart. Res.*, 2021, 23, 4.

Gazy AAK. Determination of amlodipine besylate by adsorptive square-wave anodic stripping voltammetry on glassy carbon electrode in tablets and biological fluids. *Talanta.*, 2004, 62, 3, 575 – 582.

Goyal RN, Bishnoi S. Voltammetric determination of amlodipine besylate in human urine and pharmaceuticals. *Bioelectrochemistry*, 2010, 79, 2, 234-240.

Hrichi H, Monser L, Adhoum N. A novel electrochemical sensor based on electropolymerized molecularly imprinted poly(aniline-co-anthranilic acid) for sensitive detection of amlodipine. *J. Electroanal. Chem.*, 2017, 805, 133 – 145.

Jadon N, Pandey A, Sharma HK. Selective and sensitive PANI-CeO<sub>2</sub> coated gold sensor for electrocatalytic sensing of hypersensitive drugs. *Sens. Bio – Sens. Res.*, 2019, 22.

Javer HA, Mahmoudi-Moghaddam H, Garkani-Nejad Z, Dehghannoudeh G. Grass-like Pt-doped NiCo<sub>2</sub>O<sub>4</sub> modified electrode for electrochemical detection of amlodipine. *Measurements*, 2022, 191.

Karadas-Bakirhan N, Gumustas M, Uslu B, Ozkan SA. Simultaneous determination of amlodipine besylate and rosuvastatin calcium in binary mixtures by voltammetric and chromatographic techniques. *Ionics*, 2016, 22, 2, 277-288.

Kazemipour M, Ansari M, Mohammadi A, Beitollahi H, Ahmadi R. Use of adsorptive square-wave anodic stripping voltammetry at carbon paste electrode for the determination of amlodipine besylate in pharmaceutical preparations. *J. Anal. Chem.*, 2009, 64, 1, 65- 70.

Khand AA, Lakho SA, Tahira A, Ahmed M, Aftab U, Abro MI, Juno AA, Nafady A, Ibupoto ZH. Synthesis of Sheet Like Nanostructures of NiO Using Potassium Dichromate as Surface Modifying Agent for the Sensitive and Selective Determination of Amlodipine Besylate (ADB) Drug. *Electroanalysis*, 2021, 33, 5, 1121-1128.

Khorshed AA, Khairy M, Banks CE. Electrochemical determination of antihypertensive drugs by employing costless and portable unmodified screen-printed electrodes. *Talanta*, 2019, 198, 447 – 456.

Mancia G, Kreutz R, Brunström M, Burnier M, Grassi G, Januszewicz A, Muiesan ML, Tsioufis K, Agabiti-Rosei E, Algharably EAE, Azizi M, Benetos A, Borghi C, Hitij JB, Cifkova R, Coca A, Cornelissen V, Cruickshank JK, Cunha PG, Danser AHJ, Pinho RM, Delles C, Dominiczak AF, Dorobantu M, Doumas M, Fernández-Alfonso MS, Halimi JM, Járαι Z, Jelaković B, Jordan J, Kuznetsova T, Laurent S, Lovic D, Lurbe E, Mahfoud F, Manolis A, Miglinas M, Narkiewicz K, Niiranen T, Palatini P, Parati G, Pathak A, Persu A, Polonia J, Redon J, Sarafidis P, Schmieder R, Spronck B, Stabouli S, Stergiou G, Taddei S, Thomopoulos C, Tomaszewski M, Van de Borne P, Wanner C, Weber T, Williams B, Zhang ZY, Kjeldsen SE. 2023 ESH Guidelines for the management of arterial hypertension The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension: Endorsed by the International Society of Hypertension (ISH) and the European Renal Association (ERA). *J Hypertens*, 2023, 1;41(12):1874-2071.

Mansano GR, Sartori ER. Electrochemical Oxidation of Amlodipine and Hydrochlorothiazide On Boron Doped Diamond Electrode: Potential Simultaneous Determination in Urine. *Orbital: Electron. J. Chem.*, 2015, 7, 1, 81-86.

Mansano GR, Eisele APA, Dall'Antonia LH, Afonso S, Sartori ER. Electroanalytical application of a boron-doped diamond electrode: Improving the simultaneous voltammetric determination of amlodipine and valsartan in urine and combined dosage forms. *J. Electroanal. Chem.*, 2015, 738, 188-194.

Mansano GR, Eisele APP, Sartori ER. Electrochemical evaluation of a boron-doped diamond electrode for simultaneous determination of an antihypertensive ternary mixture of amlodipine, hydrochlorothiazide and valsartan in pharmaceuticals. *Anal. Methods*, 2015, 7, 3, 1053- 1060.

Mofidi Z, Norouzi P, Seidi S, Ganjali MR. Efficient design for *in situ* determination of amlodipine in whole blood samples using fast Fourier transform stripping square wave voltammetry after preconcentration by electromembrane extraction. *New J. Chem.*, 2017, 41, 22, 13567 – 13575.

Mohammadi SZ, Tajik S, Beitollahi H. Screen printed carbon electrode modified with magnetic core shell manganese ferrite nanoparticles for electrochemical detection of amlodipine. *J. Serb. Chem. Soc.*, 2019, 84, 9, 1005 – 1016.

Mohammadi S, Taher MA, Beitollahi H. Hybrid Nanostructure Composed of Homogeneously Decorated MoS<sub>2</sub> Nanosheets on Graphene for Simultaneous Electrochemical Determination of Amlodipine and Hydrochlorothiazide. *J. Electrochem. Soc.*, 2021, 168, 4.

Mohammadi A, Moghaddam AB, Eilkhani K, Alikhani E, Mozaffari S, Yavari T. Electro-oxidation and simultaneous determination of amlodipine and atorvastatin in commercial tablets using carbon nanotube modified electrode. *Micro Nano Lett.*, 2013, 8, 8, 413 - 417.

Mohammadzadeh N, Mohammadi SZ, Kaykhani M. Modified Glassy Carbon Electrode for low-trace Level Determination of Amlodipine by Differential Pulse Voltammetry. *Anal. Bioanal. Electrochem.*, 2017, 9, 4, 390 – 399.

Moraes JT, Eisele APP, Salamanca-Neto CAR, Scremin J, Sartori ER. Simultaneous Voltammetric Determination of Antihypertensive Drugs Amlodipine and Atenolol in



Pharmaceuticals Using a Cathodically Pretreated Boron-Doped Diamond Electrode. *J. Braz. Chem. Soc.*, 2016, 27, 7, 1264-1272.

Moraes JT, Salamanca-Neto CAR, Eisele APP, Coldibeli B, Ceravolo GS, Sartori ER. Fast and sensitive simultaneous determination of antihypertensive drugs amlodipine besylate and ramipril using an electrochemical method: application to pharmaceuticals and blood serum samples. *Anal. Methods*, 2019, 11, 31, 4006-4013.

Moraes JT, Salamanca-Neto CAR, Svorc L, Sartori ER. Advanced sensing performance towards simultaneous determination of quaternary mixture of antihypertensives using boron-doped diamond electrode. *Microchem. J.*, 2017, 134, 173-180.

Naikoo GA, Pandit UJ, Sheikh MUD, Ul Hassan I, Khan GA, Bhat AR, Das R, Horchani R. Synergistic effect of carbon nanotubes, copper and silver nanoparticles as an efficient electrochemical sensor for the trace recognition of amlodipine besylate drug. *SN Appl. Sci.*, 2020, 2, 5.

Nigović B, Behetić S. Elektroanalitika u farmaciji. *Farm. Glas*, 2007, 63, 3, 163 -175.

Palabiyik IM, Dogan A, Süslü I. Simultaneous Determination of Amlodipine and Irbesartan in Their Pharmaceutical Formulations by Square-Wave Voltammetry. *Comb. Chem. High Throughput Screening*, 2022, 25, 2, 241-251.

Prasannan A, Lee CY, Jayachitra R, Damastuti R, Yu H, Selvi SV, Hong PD. Highly water dispersible poly (caffeic acid- L-arginine)-MoS<sub>2</sub> nanocomposite modified sensor for effective electrochemical detection of amlodipine drug. *Microchem. J.*, 2023, 196.

Rebec I, Neto ARS, Scremin J, Sartori ER. Simultaneous Voltammetric Determination of Amlodipine and Atorvastatin on Anodically Pretreated Boron-Doped Diamond Electrode. *Orbital: Electron. J. Chem.*, 2017, 9, 4, 225 – 233.

Sažetak opisa svojstava lijeka – Amlodipin, <https://halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/Amlodipin-PharmaS-SPC.pdf>, pristupljeno 3.4.2024.

Sažetak opisa svojstava lijeka – Atenolol, <https://halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/Atenolol-Pliva-SPC.pdf>, pristupljeno 24.4.2024.

Sikkander AM, Vedhi C, Manisankar P. Utilization of sodium montmorillonite clay for enhanced electrochemical sensing of amlodipine. *Indian J. Chem., Sect. A: Inorg., Phys., Theor. Anal.*, 2016, 55, 5, 571-575.

Silva LP, Lourencao BC, Fatibello O. Simultaneous voltammetric determination of Amlodipine besylate and Hydrochlorothiazide in synthetic urine samples using a boron – doped diamond electrode. *Quim. Nova*, 2015, 38, 6, 801 – 806.

Stoiljkovic ZZ, Ivic MLA, Petrovic SD, Mijin DZ, Stevanovic SI, Lacnjevac UC, Marinkovic, AD. Voltammetric and Square-Wave Anodic Stripping Determination of Amlodipine Besylate on Gold Electrode. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2012, 7, 3, 2288-2303.

Stoiljkovic ZZ, Jovanovic VM, Mijin DZ, Nikolic V, Nikolic L, Petrovic SD, Ivic MLA. The Electrochemical Investigation of Inclusion Complexes of Nifedipine and Amlodipine with  $\beta$ -Cyclodextrin and (2-Hydroxypropyl)- $\beta$ -Cyclodextrin. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2013, 8, 7, 9543-9577.

Sudha K, Elangovan A, Jeevika A, Sharmila C, Arivazhagan G, Kalimuthu P. Electroanalytical detection of amlodipine in urine and pharmaceutical samples using Ag-Ce<sub>2</sub>(WO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>@CNF nanocomposite-modified glassy carbon electrode. *Microchem. J.*, 2021, 165.

Svorc L, Cinková K, Sochr J, Vojs M, Michniak P, Marton M. Sensitive electrochemical determination of amlodipine in pharmaceutical tablets and human urine using a boron-doped diamond electrode. *J. Electroanal. Chem.*, 2014, 728, 86-93.

Valezi CF, Duarte EH, Mansano GR, Dall'Antonia LH, Tarley CRT, Sartori ER. An improved method for simultaneous square-wave voltammetric determination of amlodipine and enalapril at multi-walled carbon nanotubes paste electrode based on effect of cationic surfactant. *Sens. Actuators, B*, 2014, 205, 234- 243.

Web of Science – amlodipine AND methods, <https://www-webofscience-com.ezproxy.nsk.hr/wos/woscc/summary/80c7b34d-1ccb-45fa-8e63-b842ad88ba76-e57a66b6/relevance/1>, pristupljeno 10.4.2024.

Williams B, Mancina G, Spiering W, Agabiti Rosei E, Azizi M, Burnier M, L Clement D, Coca A, de Simone G, Dominiczak A, Kahan T, Mahfoud F, Redon J, Ruilope L, Zanchetti A, Kerins M, Kjeldsen SE, Kreutz R, Laurent S, Lip GYH, McManus R, Narkiewicz K,

Ruschitzka F, Schmieder RE, Shlyakhto E, Tsioufis C, Aboyans V, Desormais I. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Hypertension (ESH). *Eur. Heart J*, 2018, 39, 33, 3021–3104.

Yilmaz B, Yilmaz N. Simultaneous determination of rosuvastatin and amlodipine in binary mixtures by differential pulse voltammetry and HPLC methods. *Eurasian Chem. Commun.*, 2020, 2, 8, 881-894.

## 8. SAŽETAK

Hipertenzija je najučestalija kardiovaskularna bolest i broj oboljelih od nje raste iz dana u dan. Za liječenje hipertenzije dostupan je velik broj lijekova različitih mehanizama djelovanja, koji se zbog prirode bolesti često kombiniraju. Lijek često zastupljen u tim kombinacijama je amlodipin, blokator kalcijevih kanala s posebnim značajkama koje ga razlikuju od njemu srodnih lijekova.

U ovom preglednom diplomskom radu prikazane su voltametrijske metode koje se mogu koristiti za analizu samog amlodipina kao i za istovremenu analizu njega i drugog lijeka/lijekova (hidroklorotiazid, atorvastatin, rosuvastatin, valsartan, ramipril, amilorid, atenolol i drugi). Pritom su u istraživanjima najčešće proučavane pravokutnovalna i diferencijalno pulsna voltometrija kao i *stripping* voltametrijske metode. Elektrode koje su najšire primjenjivane su krute elektrode: grafitna, staklasta ugljikova elektroda, dijamantna elektroda, čije su površine vrlo često bile modificirane različitim vrstama nanomaterijala kako bi se optimizirali procesi oksidacije, a samim time i rezultati analize.

Prikazana je međusobna usporedba dostupnih voltametrijskih metoda kao i njihova usporedba s ostalim komparativnim metodama (npr. HPLC). Objašnjene su prednosti voltametrijskih metoda u odnosu na one koje se također koriste za analizu antihipertenziva.

## 8. SUMMARY

Hypertension is the most common cardiovascular disease and the number of patients being diagnosed with it is getting bigger and bigger every day. Many drugs with different mechanisms of action are available for treating hypertension and because of the nature of the illness they are usually prescribed as a combination therapy. Medication often seen in combination with other molecules is amlodipine, a calcium channel blocker with special features that differ him from other calcium channel blockers.

In this thesis, voltammetric methods that can be used for analysis of amlodipine alone and for simultaneous analysis of amlodipine and other drug/drugs ( hydrochlorothiazide, atorvastatin, rosuvastatin, valsartan, ramipril, amiloride, atenolol and others ) are shown. The most widely used methods for that purpose are differential pulse and square - wave voltammetry, as well as adsorptive stripping voltammetric methods. Electrodes described in this thesis are mainly solid electrodes: carbon paste electrode, boron – doped diamond electrode, glassy carbon electrode etc., which surfaces were often modified using different nanomaterials. These modifications helped optimising oxidation processes occurring on surface of electrodes and with that ensured getting better results of analysis.

Also, described voltammetric methods were compared to eachother as well as to other analytical methods also used for determination of antihypertensive drugs ( for example HPLC). Advantages of voltammetric methods are also listed in this thesis.

# 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

## ELEKTROKEMIJSKE METODE ZA ISTOVREMENO ODREĐIVANJE AMLODIPINA I DRUGIH LIJEKOVA ZA TERAPIJU HIPERTENZIJE I HIPERLIPIDEMIJE

**Nikola Puhin**

### SAŽETAK

Hipertenzija je najučestalija kardiovaskularna bolest i broj oboljelih od nje raste iz dana u dan. Za liječenje hipertenzije dostupan je velik broj lijekova različitih mehanizama djelovanja, koji se zbog prirode bolesti često kombiniraju. Lijek često zastupljen u tim kombinacijama je amlodipin, blokator kalcijevih kanala s posebnim značajkama koje ga razlikuju od njemu srodnih lijekova. U ovom preglednom diplomskom radu prikazane su voltametrijske metode koje se mogu koristiti za analizu samog amlodipina kao i za istovremenu analizu njega i drugog lijeka/lijekova (hidroklorotiazid, atorvastatin, rosuvastatin, valsartan, ramipril, amilorid, atenolol i drugi). Pritom su u istraživanjima najčešće proučavane pravokutnovalna i diferencijalno pulsna voltometrija kao i *stripping* voltametrijske metode. Elektrode koje su najšire primjenjivane su krute elektrode: grafitna, staklasta ugljikova elektroda, dijamantna elektroda, čije su površine vrlo često bile modificirane različitim vrstama nanomaterijala kako bi se optimizirali procesi oksidacije, a samim time i rezultati analize. Prikazana je međusobna usporedba dostupnih voltametrijskih metoda kao i njihova usporedba s ostalim komparativnim metodama (npr. HPLC). Objašnjene su prednosti voltametrijskih metoda u odnosu na one koje se također koriste za analizu antihipertenziva.

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

Rad sadrži: 49 stranica, 21 grafičkih prikaza, 2 tablica i 53 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *amlodipin, voltometrija, elektrode, metode, simultana analiza, određivanje, hipertenzija*

Mentor: **Dr. sc. Biljana Nigović**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Biljana Nigović**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Željko Maleš**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Sandra Jurić**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2024.

## 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

### **ELECTROCHEMICAL METHODS FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF AMLODIPINE AND OTHER DRUGS FOR TREATING HYPERTENSION AND HYPERLIPIDEMIA**

**Nikola Puhin**

#### **SUMMARY**

Hypertension is the most common cardiovascular disease and the number of patients being diagnosed with it is getting bigger and bigger every day. Many drugs with different mechanisms of action are available for treating hypertension and because of the nature of the illness they are usually prescribed as a combination therapy. Medication often seen in combination with other molecules is amlodipine, a calcium channel blocker with special features that differ him from other calcium channel blockers. In this thesis, voltammetric methods that can be used for analysis of amlodipine alone and for simultaneous analysis of amlodipine and other drug/drugs ( hydrochlorothiazide, atorvastatin, rosuvastatin, valsartan, ramipril, amiloride, atenolol and others ) are shown. The most widely used methods for that purpose are differential pulse and square - wave voltammetry, as well as adsorptive stripping voltammetric methods. Electrodes described in this thesis are mainly solid electrodes: carbon paste electrode, boron – doped diamond electrode, glassy carbon electrode etc, which surfaces were often modified using different nanomaterials. These modifications helped optimising oxidation processes occurring on surface of electrodes and with that ensured getting better results of analysis. Also, described voltammetric methods were compared to each other as well as to other analytical methods also used for determination of antihypertensive drugs ( for example HPLC). Advantages of voltammetric methods are also listed in this thesis.

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

Thesis includes: 49 pages, 21 figures, 2 tables and 53 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *amlodipine, voltammetry, electrodes, methods, simultaneous analysis, determination, hypertension*

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

Reviewers: **Biljana Nigović, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Željko Maleš, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Sandra Jurić, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2024.