

# Oksidacija i adsorpcija nepafenaka na površini elektrode modificirane različitim nanomaterijalima

---

**Brusač, Edvin**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:608087>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-10**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Edvin Brusač**

**Oksidacija i adsorpcija nepafenaka na površini  
elektrode modificirane različitim nanomaterijalima**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

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

Želio bih se zahvaliti svojoj mentorici prof. dr. sc. Biljani Nigović na vodstvu i pomoći u izradi ovog diplomskog rada te usmjeravanju mog profesionalnog interesa ka analitici, kao i ostalim djelatnicima Zavoda za analitiku i kontrolu lijekova na ugodnoj radnoj atmosferi.

## KRATICE

ATK	anatomsko-terapijsko-kemijska
BR	Britton-Robinson
CNF	ugljikova nanovlakna (engl. <i>carbon nanofibers</i> )
CV	ciklička voltometrija
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
DPV	diferencijalno-pulsna voltometrija
EMA	Europska agencija za lijekove (engl. <i>European Medicines Agency</i> )
GC	staklasti ugljik (engl. <i>glassy carbon</i> )
GCE	elektroda od staklastog ugljika (engl. <i>glassy carbon electrode</i> )
GRO	grafen oksid (engl. <i>graphene oxide</i> )
GRP	grafen nanopločice (engl. <i>graphene nanoplatelets</i> )
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>high-performance liquid chromatography</i> )
LMWH	heparin niske molekularne gustoće (engl. <i>low molecular weight heparin</i> )
LSV	linearna voltometrija (engl. <i>linear sweep voltammetry</i> )
NPV	normalno-pulsna voltometrija
NSAID	nesteroidni protuupalni lijek (engl. <i>non-steroidal antiinflammatory drug</i> )
SEM	skenirajuća elektronska mikroskopija (engl. <i>scanning electron microscopy</i> )
SWV	pravokutnovalna voltometrija (engl. <i>square-wave voltammetry</i> )

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. NEPAFENAK .....	2
1.2. ELEKTROANALITIČKE METODE.....	3
1.2.1. VOLTAMETRIJA .....	4
1.2.1.1. CIKLIČKA VOLTAMETRIJA.....	6
1.2.1.2. PRAVOKUTNOVALNA VOLTAMETRIJA .....	9
1.2.2. KRUTE ELEKTRODE.....	10
1.2.2.1. ELEKTRODA OD STAKLASTOG UGLJIKA .....	11
1.2.2.2. ZLATNA ELEKTRODA.....	12
1.2.2.3. DIJAMANTNA ELEKTRODA S PRIMJESAMA BORA	12
1.2.3. NANOMATERIJALI.....	13
1.2.3.1. GRAFEN.....	13
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	17
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	19
3.1. KEMIKALIJE .....	20
3.2. RADNI INSTRUMENTI.....	20
3.3. PRIPREMA OTOPINA I SUSPENZIJA.....	21
3.3.1. MATIČNA OTOPINA .....	21
3.3.2. BRITTON-ROBINSON PUFER .....	21
3.3.3. RADNE OTOPINE .....	22
3.3.4. SUSPENZIJE NANOMATERIJALA .....	22
3.4. PRIPREMA ELEKTRODA.....	23
3.5. UVJETI MJERENJA .....	23
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	24
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	39
<b>6. LITERATURA</b> .....	41

**7. SAŽETAK/SUMMARY.....46**

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

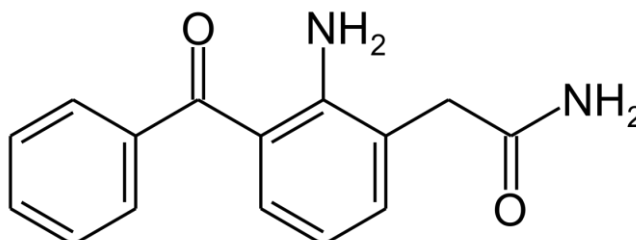
**BASIC DOCUMENTATION CARD**

# **1. UVOD**

## 1.1. NEPAFENAK

Nepafenak je nesteroidni protuupalni lijek (engl. *non-steroidal antiinflammatory drug*, NSAID), prolijek amfenaka. Prema ATK klasifikaciji svrstava se u skupinu S01BC10, Lijekovi s djelovanjem na osjetila – Lijekovi za liječenje bolesti oka – Glukokortikoidi i kombinacije – Nesteroidni protuupalni spojevi. Koristi se u obliku vodene suspenzije te se topički nanosi na oko, gdje penetrira kroz rožnicu i metabolizira do amfenaka (sadrži karboksilnu kiselinu nastalu hidrolizom amida), inhibitora prostaglandin H sintaze (ciklooksigenaze), enzima koji sintetizira prostaglandine, medijatore upale i boli. Uz supresiju sinteze prostaglandina, pokazalo se da nepafenak inhibira i raspad krvno-moždane barijere ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

Gledano s fizikalno-kemijskog aspekta, nepafenak (2-amino-3-benzoilbenzenacetamid) (Slika 1) je krutina svijetložute do žute boje, bez mirisa. Molekulska formula spoja je  $C_{15}H_{14}N_2O_2$ , a molekulska masa iznosi 254.289 g/mol. Talište mu iznosi 184 °C te je gotovo netopljiv u vodi ([www.accessdata.fda.gov](http://www.accessdata.fda.gov)).



Slika 1. Strukturna formula nepafenaka ([www.drugs.com](http://www.drugs.com))

Kapi za oko s nepafenakom koriste se za prevenciju i liječenje postoperativne boli i upale povezane s operacijom katarakte te smanjenje rizika od postoperativnog makularnog edema povezanog s operacijom katarakte kod bolesnika s dijabetesom. Primjenjuju se tri puta na dan (1 kap ako je lijek jačine 1 mg/mL). U većine ispitanika zapažene su niske, ali mjerljive plazmatske koncentracije nepafenaka i amfenaka. Topikalno primijenjeni nepafenak distribuira se lokalno iz prednjeg dijela oka u stražnji segment oka te podliježe brzom bioaktivaciji pomoću intraokularnih hidrolaza u amfenak koji je nađen kao glavni metabolit. Nisu zabilježene interakcije nepafenaka ni amfenaka s drugim lijekovima niti aktivnošću citokroma P450. Eliminacija lijeka je brza ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).



Oprez kod primjene je potreban kod pacijenata sa preosjetljivošću na acetilsalicilnu kiselinu, derivate feniloctene kiseline i druge nesteroidne protuupalne lijekove jer može doći do križne preosjetljivosti. Također, potreban je oprez kod pacijenata s povećanom sklonošću krvarenju te kod pacijenata koji primaju druge lijekove koji mogu produžiti vrijeme krvarenja ([www.pbm.va.gov](http://www.pbm.va.gov)).

U Hrvatskoj je registriran jedan lijek centraliziranim postupkom od strane Europske agencije za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA) pod nazivom Nevanac, tvrtke Alcon, koji je suspenzija nepafenaka koncentracije 1 mg/mL u obliku kapi za oko ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)).

## 1.2. ELEKTROANALITIČKE METODE

Elektroanalitičke metode nude jedinstven pristup informacijama o kemijskim i biokemijskim, kao i fizikalnim sustavima. One čine skupinu analitičkih metoda kod kojih se podatak o koncentraciji, aktivitetu ili drugom termodinamičkom svojstvu određivane molekulske vrste dobiva u ovisnosti o električnom naponu, struji ili naboju. Elektroorganska sinteza farmakološki zanimljivih molekula, korelacija redoks potencijala i aktivnosti, praćenje interakcija lijekova s metalnim ionima, proteinima ili DNK, identifikacija, određivanje te selektivna detekcija ljekovitih tvari su neke od mnogih primjena elektroanalitičkih metoda u farmaciji (Nigović i Behetić, 2007). Koriste se kao alternativne ili komplementarne tehnike spektrofotometrijskim ili separacijskim tehnikama zbog svoje visoke osjetljivosti, brzine analize, male potrebne količine uzorka te niske cijene u usporedbi s ostalim tehnikama (Uslu i Ozkan, 2010).

Prema signalu pobude, koji uzrokuje elektrokemijsku reakciju na radnoj elektrodi i iz koje se dobiva željeni podatak o analiziranoj otopini, dijele se na: potenciometriju, voltometriju, kronoamperometriju, elektrogravimetriju, kronopotenciometriju, kulometriju i konduktometriju. Primjenjuju se u raznim stadijima istraživanja i razvoja lijekova: potenciometrijski, primjerice, određuje se sadržaj ljekovitih i pomoćnih tvari (lidokain hidroklorid) te sadržaj onečišćenja u farmaceutskim tvarima (jodidi u ioheksolu), kao i udio kiselih ili lužnatih onečišćenja u nekom pripravku. Amperometrijskom titracijom određuje se voda u ljekovitim tvarima Karl-Fischerovom titracijom (Nigović i Behetić, 2007), konduktometrijski se određuje čistoća farmaceutske vode mjerenjem njezine vodljivosti te

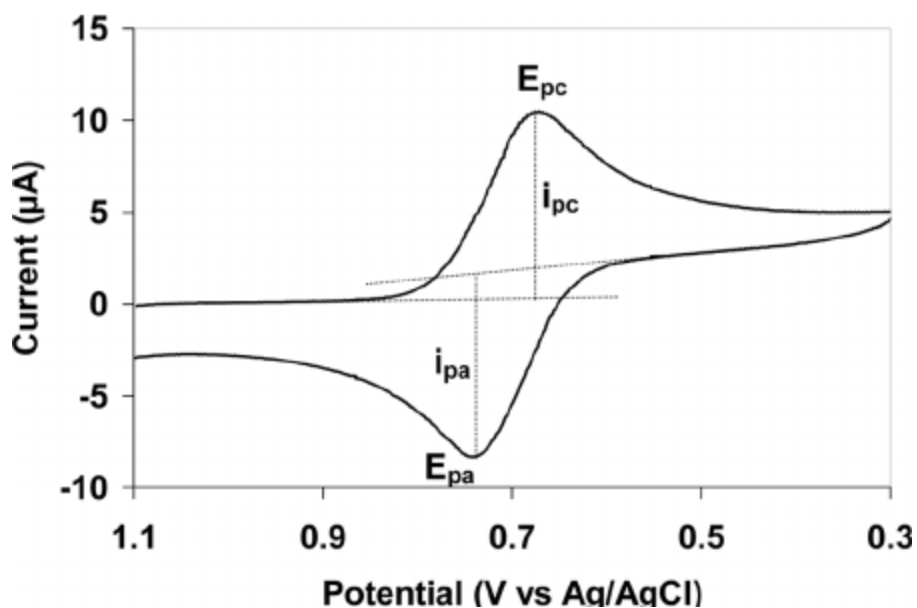
čistoća farmaceutskih tvari (ioheksol, LMWH) (European Pharmacopoeia 9<sup>th</sup> ed., 2017), a voltametrijski određuju se, primjerice, bisoprolol i propranolol (Nigović i sur., 2011).

Elektrokemijski senzori pronašli su primjenu u rutinskim analizama (Nigović i Behetić, 2007). Jedan takav senzor poznat mnogim dijabetičarima jest amperometrijski senzor glukoze koji se koristi kod određivanja glukoze u krvi. Glukoza se glukoza oksidazom prevodi u glukonsku kiselinu uz nastajanje vodikovog peroksida, koji se zatim na anodi oksidira te se prati prijenos elektrona koji je proporcionalan količini glukoze u krvi (Yoo i Lee, 2010.)

### 1.2.1. VOLTAMETRIJA

Povijesno se grana elektrokemije koju danas nazivamo voltametrija razvila otkrićem polarografije 1922. godine češkog kemičara Jaroslava Heyrovskog, za koju je 1959. godine osvojio Nobelovu nagradu za kemiju. Rane voltametrijske metode nailazile su na niz problema, što ih nije činilo prikladnima za rutinske analize, no 60-ih i 70-ih godina 20. stoljeća postignuti su veliki pomaci u svim aspektima voltametrije (teoriji, metodologiji i radnim instrumentima), čime se povećala osjetljivost te proširio repertoar analitičkih metoda (Kounaves, 1997).

Zajednička značajka svih voltametrijskih metoda je primjena potencijala ( $E$ ) na elektrodu te praćenje nastale jakosti struje ( $i$ ) u elektrokemijskoj ćeliji. Često se primijenjeni potencijal mijenja ili se jakost struje nadzire u nekom vremenu  $t$ ; stoga se voltametrijske metode mogu smatrati funkcijama potencijala, protoka struje te vremena. Smatraju se aktivnim tehnikama, za razliku od pasivnih tehnika poput potenciometrije, jer primijenjeni potencijal potiče reakciju tvari na površini elektrode i uzrokuje promjenu njene koncentracije oksidirajući ili reducirajući navedenu tvar (Kounaves, 1997). Prikaz ovisnosti struje o potencijalu naziva se voltamogram (Slika 2).

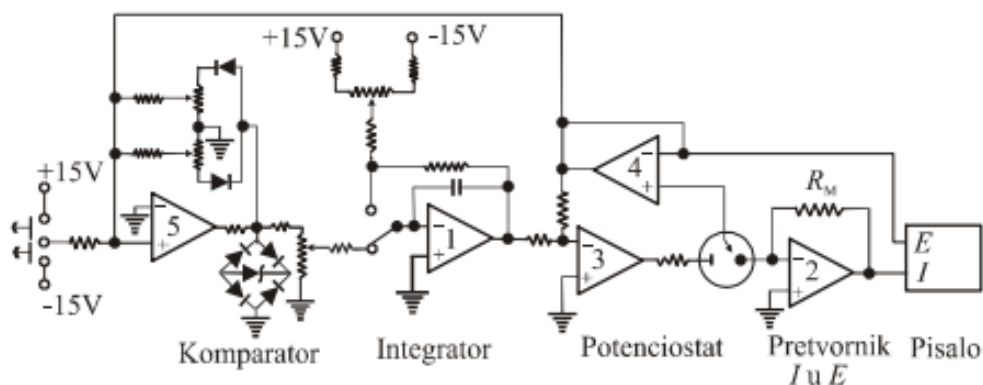


Slika 2. Ciklički voltamogram (Petrovic, 2010)

Voltametrijske metode koriste se u analizi organskih, kao i anorganskih tvari u vodenim i nevodenim medijima, istraživanju kinetike i mehanizma redoks reakcija, određivanju redoks potencijala te detekciji eluiranih analita u tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) (Nigović i Behetić, 2007).

Osnovne komponente elektroanalitičkog sustava za voltametriju su potencijostat, elektrokemijski članak te računalo (Slika 3). Potencijostat vrši ulogu primjene poznatog potencijala te mjerenja jakosti struje. Elektrokemijski članak sastoji se od uzorka u odgovarajućem otapalu, ionskog elektrolita i najčešće tri elektrode: referentne (engl. *reference*), pomoćne ili protuelektrode (engl. *counter*) te radne (engl. *working*) elektrode, definiranih površina (Kounaves, 1997). Mjerenje potencijala odvija se između radne i referentne elektrode, čime se kontrolira signal pobude, dok se struja mjeri između radne i protuelektrode praćenjem signala odziva sustava (Nigović i Behetić, 2007).

Prema referentnoj elektrodi, koja je najčešće Ag/AgCl elektroda, se regulira pobudni signal ili mjeri odzivni signal. Pomoću protuelektrode, koja može biti zlatna, platinska, ugljikova itd. ostvaruje se tok električne struje kroz ćeliju, dok se na radnoj elektrodi odvija redoks reakcija (Piljac, 2010).



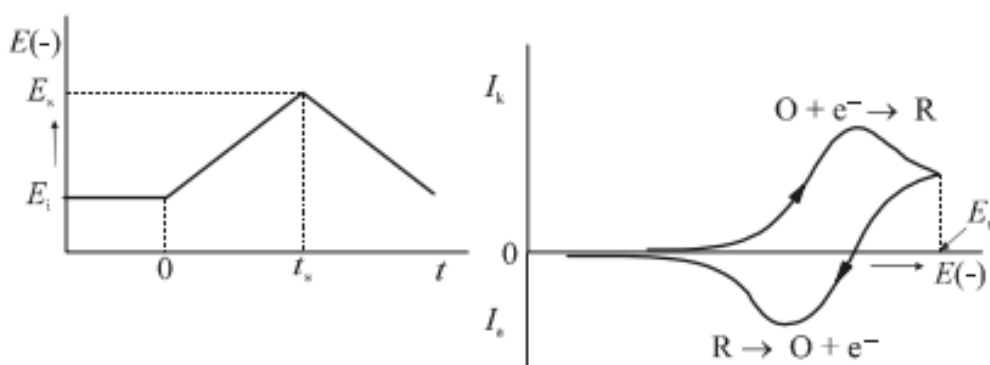
Slika 3. Naprava za voltometriju i cikličku voltometriju (Piljac, 2010)

Od mnogih voltometrijskih tehnika najviše primjene nalaze linearna ili *linear sweep* (LSV), ciklička (CV), polarografija (linearna voltometrija s kapajućom živinom elektrodom), normalno pulsna (NPV), diferencijalna pulsna (DPV), pravokutnovalna (engl. *square-wave* voltammetry, SWV) i *stripping* voltometrija (Hussam, 2006).

### 1.2.1.1. CIKLIČKA VOLTAMETRIJA

Ciklička voltometrija (CV) je bitna i široko primjenjivana elektroanalitička tehnika u raznim granama kemije. Otkrili su ju, uz voltometriju s linearnom promjenom potencijala, Matheson i Nichols 1938. godine, a teorijski opisali Randles i Ševčik (Piljac, 2010). Rijetko se koristi za kvantitativne analize jer u optimalnim uvjetima granica detekcije iznosi  $10^{-5}$ – $10^{-6}$  M (Nigović i Behetić, 2007), ali često za proučavanje redoks procesa, razumijevanje reakcijskih međuprodukata te dobivanje informacija o stabilnosti reakcijskih produkata (Kounaves, 1997). Također se koristi za uvid u kemijske reakcije koje prethode ili slijede prijenosu elektrona te za razne učinke adsorpcije na površini elektrode. Najčešće je ciklička voltometrija početni korak elektrokemijske studije (Nigović, 2009).

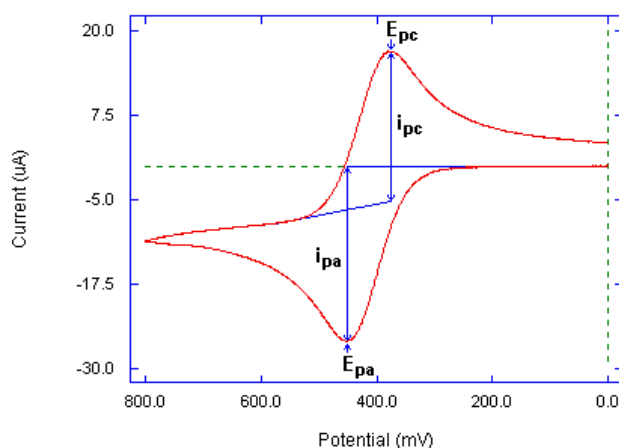
U cikličkoj voltometriji, potencijal radne elektrode mijenja se konstantnom brzinom (u voltima po sekundi,  $\frac{V}{s}$ ), te se mjeri protok struje u odnosu na proteklo vrijeme. Promjena potencijala se obrće na određenoj točki potencijala, otkud i potječe naziv ciklička voltometrija. S obzirom da je brzina promjene potencijala (engl. *sweep rate*; *scan rate*) konstantna, proteklo vrijeme se može prevesti u potencijal te rezultate prikazati kao graf ovisnosti jakosti struje o primijenjenom potencijalu, tj. voltamogram (Slika 4) ([www.courses.chem.indiana.edu](http://www.courses.chem.indiana.edu)).



Slika 4. Signali pobude i odziva cikličke voltametrije (Piljac, 2010)

Kako se potencijal približava redoks potencijalu analita, mjerena jakost struje raste. Promjenom potencijala preko karakterističnog potencijala redoks procesa nastaje strujni vrh (pik) zbog promjene oksidacijskog stanja analita, a nakon tog javlja se pad jakosti struje, posljedica smanjenja koncentracije analita u blizini elektrode. Povratkom potencijala na početnu vrijednost dolazi do oksidacije/redukcije produkata nastalih u prvoj polovici ciklusa u slučaju reverzibilne reakcije. Oblik cikličkog voltamograma ovisi o raznim parametrima, poput brzine prijenosa tvari, prijenosa elektrona i kemijskim reakcijama koje se odvijaju uz redoks reakcije (Nigović i Behetić, 2007).

Važni parametri cikličke voltametrije su potencijali vrha redukcije ( $E_{pc}$ ) i oksidacije ( $E_{pa}$ ) te vršne jakosti struje ( $i_{pc}$  i  $i_{pa}$ ) (Slika 5).



Slika 5. Prikaz pravilne grafičke obrade i određivanja potencijala i vršnih jakosti struja na cikličkom voltamogramu reverzibilnog elektrokemijskog procesa (www.basinc.com)

Potencijal vrha je karakteristika pojedinog spoja, a u korelaciji je s afinitetom primanja ili davanja elektrona istog spoja. Ako je brzina prijenosa elektrona puno brža od ostalih procesa

u otopini poput difuzije, reakcija je reverzibilna, a broj izmijenjenih elektrona se može odrediti iz razlike potencijala vrhova prema jednadžbi (1):

$$\Delta E_p = |E_{pa} - E_{pc}| = 2,303 \frac{RT}{nF} \quad (1)$$

pri čemu je  $\Delta E_p$  razlika između potencijala vrha oksidacije i redukcije,  $R$  opća plinska konstanta koja iznosi  $8,314 \frac{\text{J}}{\text{molK}}$ ,  $T$  apsolutna temperatura (izražena u K),  $n$  broj izmijenjenih elektrona, a  $F$  Faradayeva konstanta koja iznosi  $96485,34 \frac{\text{C}}{\text{mol}}$ . Pri uvjetima od  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  za reakciju prijenosa  $n$  elektrona  $\Delta E_p$  iznosi  $0,0592 \frac{\text{V}}{n}$ , odnosno  $59,2 \text{ mV}$  po jednom elektronu (Nigović i Behetić, 2007).

Randles-Ševčikova jednadžba (2) stavlja u odnos koncentraciju i jakost struje u slučaju reverzibilnih procesa, tj. iz nje slijedi da je vršna struja voltametrijskog vala ( $i_p$ ), a isto vrijedi za struju u bilo kojoj točki voltamograma, izravno proporcionalna koncentraciji elektroaktivne vrste u otopini:

$$i_p = (2,99 \times 10^5) n^{\frac{3}{2}} A c_0 D^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}} \quad (2)$$

pri čemu je  $i_p$  vršna jakost struje izražena u amperima,  $A$  površina radne elektrode izražena u  $\text{cm}^2$ ,  $D$  difuzijski koeficijent izražen u  $\frac{\text{cm}^2}{\text{s}}$ ,  $c_0$  koncentracija analita u  $\frac{\text{mol}}{\text{cm}^3}$ ,  $v$  brzina promjene potencijala u  $\frac{\text{V}}{\text{s}}$ , a  $n$  broj elektrona. Ova jednadžba predstavlja temelj za primjenu voltametrije u kvantitativnoj elektrokemijskoj analizi (Piljac, 2010).

Ukoliko je redoks proces ireverzibilan, na cikličkom voltamogramu nedostaje povratni pik (Nigović, 2009), proces je karakteriziran sporijom izmjenom elektrona, pikovi su razdvojeni i manji,  $E_p$  se pomiče prema negativnijim (proces redukcije) ili pozitivnijim (proces oksidacije) vrijednostima povećanjem brzine promjene potencijala, a vršna jakost struje definirana izrazom (3):

$$i_p = (2,99 \times 10^5) n (\alpha n_a)^{\frac{1}{2}} A c_0 D_0^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}} \quad (3)$$

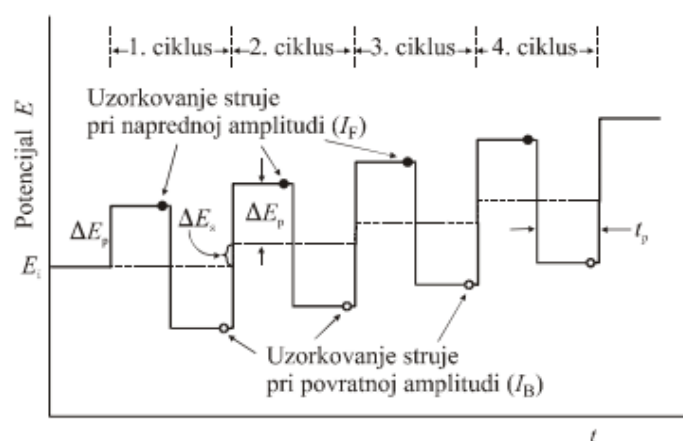
gdje su  $n_a$  broj elektrona u koraku prijenosa naboja, a  $\alpha$  koeficijent prijelaza. Ostali parametri jednaki su kao i u Randles-Ševčikovoj jednadžbi (Piljac, 2010), a iz jednadžbe je vidljivo kako je vršna jakost struje i dalje proporcionalna koncentraciji.

Cikličkom voltametrijom može se odrediti i reverzibilnost ili ireverzibilnost reakcije (kod ireverzibilnih reakcija potencijal vrha oksidacije ovisi o brzini promjene potencijala, dok kod reverzibilnih ne ovisi) (Piljac, 2010), kao i sudjelovanje protona u prijenosu elektrona putem nagiba pravca ovisnosti potencijala o pH.

Neke od suvremenijih primjena cikličke voltametrije uključuju određivanje irinotekana (Norouzi i sur., 2009), interakciju derivata 5-fluorouracila i DNK (Qin i sur., 2014), praćenje promjene razine dopamina *in vitro* (Hoffman i sur., 2016) te analizu LSD-a u vodenom mediju (de Oliveira i sur., 2017).

### 1.2.1.2. PRAVOKUTNOVALNA VOLTAMETRIJA

Pravokutnovalna voltametrija (SWV) je diferencijalna tehnika u kojoj se na radnu elektrodu primjenjuje signal pobude koji se sastoji od osnovnog stepenastog napona ( $E_i$ ) na koji se superponira izmjenični pravokutni puls ( $\Delta E_p$ ). Nakon svakog ciklusa napon se mijenja za vrijednost  $\Delta E_s$  (Wang, 2006). Struja se mjeri dvaput tijekom jednog ciklusa: pri kraju trajanja pozitivne ( $I_f$ ) i negativne poluperiode ( $I_b$ ) izmjeničnog pravokutnog pulsa, a jakost struje na voltamogramu prikazana je kao razlika struja pri negativnoj, odnosno pozitivnoj poluperiodi izmjeničnog pravokutnog signala pobude za svaki od ciklusa pobude (Piljac, 2010).



Slika 6. Prikaz signala pobude i vremena uzorkovanja struje u pravokutnovalnoj voltametriji (Piljac, 2010)

Najveća prednost ove tehnike je njena velika brzina. Kako frekvencije mogu varirati od 1 do 100 ciklusa u sekundi, promjene potencijala mogu biti iznimno brze, čime se skraćuje vrijeme snimanja voltamograma na nekoliko sekundi (Nigović i Behetić, 2007).

Tehnika je pogodna i za određivanje analita jer je visina vrha direktno proporcionalna koncentraciji elektroaktivne specije, a granice detekcije sežu i do  $10^{-8}$  M (Kounaves, 1997), čime je tehnika dovoljno osjetljiva za analizu lijekova u biološkim tekućinama nakon terapijskih doza. Također se može primijeniti za istraživanje mehanizama prijenosa elektrona budući da je za reverzibilnu reakciju redukcije veličina pulsa dovoljna da se produkt stvoren polaznim pulsom oksidira povratnim pulsom (Nigović i Behetić, 2007).

Neke od mnogih primjena pravokutnovalne voltametrije u farmaciji su određivanje antioksidativne aktivnosti u korijenu vrste *Echinacea purpurea* (Newair i sur., 2017), praćenje kontroliranog otpuštanja lijeka iz matriksa od celuloznog acetata (Rodrigues Filho i sur., 2015) i određivanje hidrosiklorokina u farmaceutskim oblicima (Deroco i sur., 2014).

## 1.2.2. KRUTE ELEKTRODE

Ograničen anodni raspon potencijala živinih elektroda smanjuje njihovu primjenjivost u analitici tvari koje oksidiraju; stoga su krute elektrode s proširenim rasponom potencijala zadobile velik analitički interes (Wang, 2006). Također, rukovanje krutim elektrodama je puno jednostavnije zbog njihove stabilnosti i čvrstoće (Ozkan i Uslu, 2011).

Jedna od prednosti krutih elektroda je njihovo lako korištenje kod visokih temperatura i u velikom rasponu tlaka. Također, njihova mala veličina i netoksičnost čine ih idealnima u *in vivo* istraživanjima biokemijskih procesa.

Bitan faktor kod korištenja krutih elektroda je ovisnost odgovora o površinskom stanju elektrode. Sukladno tome, uporaba takvih elektroda zahtijeva predobradu te poliranje same elektrode kako bi se dobili reproducibilni rezultati. Najčešće se za metalne elektrode koristi mehaničko poliranje, dok se za ugljikove elektrode primjenjuju razni elektrokemijski, kemijski ili termalni postupci (Wang, 2006).

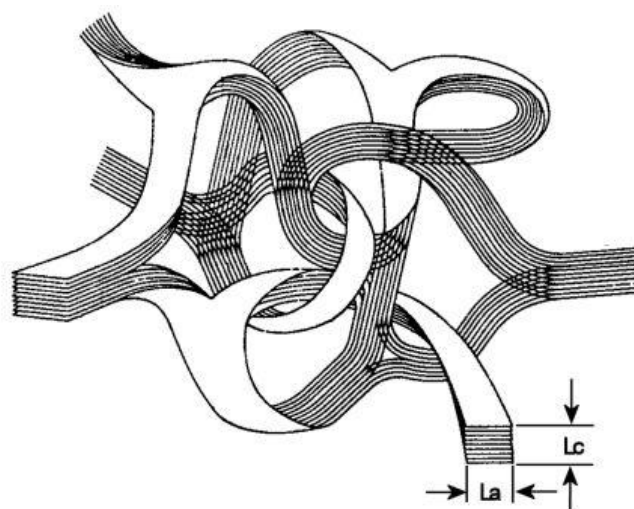


Krute elektrode ponajviše se primjenjuju za oksidacijske procese, a neke od korištenijih su elektroda od staklastog ugljika, dijamantna elektroda s primjesama bora, ugljikova, platinska, zlatna itd.(Nigović i Behetić, 2007).

### 1.2.2.1. ELEKTRODA OD STAKLASTOG UGLJIKA

Krute elektrode zasnovane na ugljiku su trenutno u širokoj upotrebi u elektroanalitici, ponajviše zbog svog širokog raspona potencijala, niske pozadinske struje, bogate površinske kemije, niske cijene, kemijske inertnosti i prikladnosti za različite kvalitativne i kvantitativne metode. Iako svi često korišteni ugljikovi materijali u elektrodama imaju osnovnu strukturu šesteročlanog aromatskog prstena i  $sp^2$  hibridizaciju, razlikuju se u relativnoj gustoći na svojim površinama te posljedično i u kinetici prijenosa elektrona. Najpopularniji ugljikovi materijali u primjeni uključuju staklasti ugljik, ugljikovu pastu, ugljikova vlakna, film, trake, grafit impregniran voskom i druge (Wang, 2006).

Staklasti ugljik (engl. *glassy carbon*, GC) je popularan materijal u izradi krutih elektroda zbog svojih izvrsnih mehaničkih i električkih svojstava, širokog raspona potencijala, kemijske inertnosti i reproducibilnosti. Materijal se priprema pažljivim zagrijavanjem predmodelirane polimerne smole u inertnoj atmosferi. Strukturno, staklasti ugljik se sastoji od tankih i smotanih trakica poprečno povezanih slojeva grafita (slika 7).



Slika 7. Struktura staklastog ugljika (Jenkins i Kawamura, 1971)

Zbog svoje velike gustoće i male veličine pora, elektrode od staklastog ugljika ne zahtijevaju proces impregnacije. No, predobradba površine je potrebna kako bi se osigurala reproducibilnost, često u vidu poliranja aluminijevim česticama promjera oko 0,05  $\mu\text{m}$  te ispiranja deioniziranom vodom (Wang, 2006).

#### 1.2.2.2. ZLATNA ELEKTRODA

Zlatna elektroda je jedna od najprimjenjivanijih metalnih elektroda. Nudi vrlo dobru kinetiku prijenosa elektrona i velik raspon potencijala, pogotovo anodnih.

Jedan od problema zlatne elektrode jest velika pozadinska struja koja se povezuje s nastajanjem oksida ili adsorbiranih slojeva vodika, što može promijeniti kinetiku reakcije i dovesti do nereproducibilnosti. Ovi problemi se manje javljaju u nevedenim medijima, što ju čini idealnim izborom za takva ispitivanja uzevši u obzir kako je inertnija i manje podložna stvaranju filmova oksida od platinske elektrode.

Često se zlatna elektroda koristi za *stripping* mjerenja metala u tragovima (Wang, 2006).

#### 1.2.2.3. DIJAMANTNA ELEKTRODA S PRIMJESAMA BORA

Iako je sam dijamant izolator, slojevi dijamanta s primjesama bora posjeduju elektronska svojstva u rasponu od poluvodičkih do polumetalnih te su korisni u elektrokemijskim ispitivanjima. Neka od spomenutih svojstava uključuju širok raspon potencijala, nisku i stabilnu pozadinsku struju, zanemarivu adsorpciju organskih tvari, nisku osjetljivost na otopljeni kisik te iznimnu čvrstoću.

Dijamantna elektroda nudi nove mogućnosti za rad pri ekstremnim uvjetima poput jako visokih anodnih potencijala, medija bogatih površinskih tvarima te polarizacije u kiselom mediju (Wang, 2006). Ove prednosti već su primijenjene u elektroanalitici, gdje se dijamantna elektroda koristila kod istovremenog određivanja paracetamola i kofeina u formulacijama (Lourenção i sur., 2009), određivanja sulfadiazina i sulfametoksazola u formulacijama (Souza i sur., 2008) itd.

### 1.2.3. NANOMATERIJALI

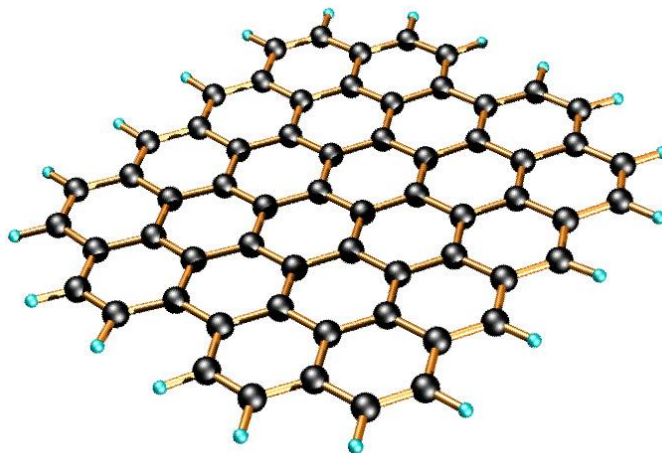
Pod pojmom nanomaterijali smatraju se materijali čije su strukturne komponente manje od 1  $\mu\text{m}$  u barem jednoj dimenziji, iako je u znanstvenim krugovima više prihvaćena definicija veličine do 100 ili čak 50 nm (Buzea i sur., 2007). Zbog svojih jedinstvenih optičkih, elektronskih i mehaničkih svojstava (Hübler i Osuagwu, 2010), nanomaterijali se mogu smatrati i posebnim stanjem tvari, uz čvrsto, tekuće, plinovito stanje i plazmu (Buzea i sur., 2007).

U vidu elektroanalitike, nanomaterijali su vrlo interesantno područje. Njihovom uporabom moguće je smanjiti dimenzije senzorskih površina potenciometrijskih, voltametrijskih, konduktometrijskih i optičkih senzora, čime se može postići minijaturizacija mjernih naprava (Piljac, 2010). Također, modifikacijom već postojećih senzorskih površina moguće je poboljšati parametre metode poput osjetljivosti, reproducibilnosti, selektivnosti itd. (Wang, 2006).

Neki od korištenih nanomaterijala u elektroanalitici uključuju grafen u raznim oblicima te nanočestice metala (zlato, paladij itd.) i metalnih oksida.

#### 1.2.3.1. GRAFEN

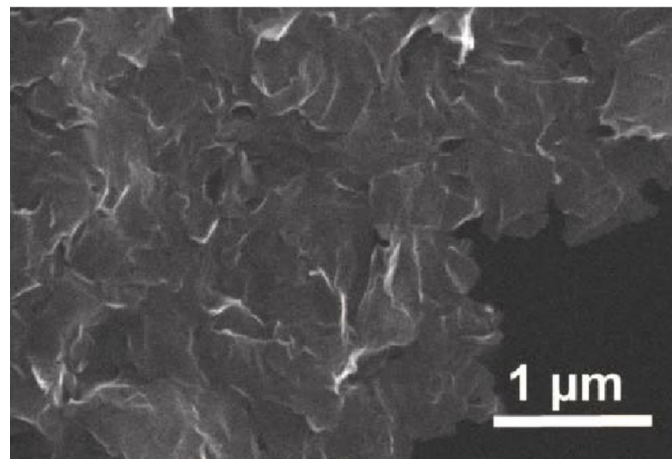
Grafen (slika 8) je alotropska modifikacija ugljika koja se sastoji od ugljikovih atoma raspoređenih u dvodimenzionalnu heksagonalnu strukturu koja se može usporediti s policikličkim aromatskim ugljikovodikom kvazibeskonačne veličine (Fitzer i sur., 1995).



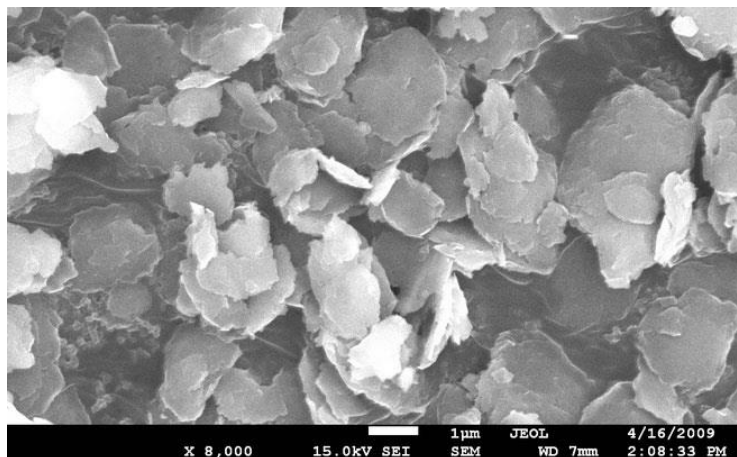
Slika 8. Idealizirani prikaz grafenskog sloja ([www.cnx.org](http://www.cnx.org))

Otkriven je, izoliran i karakteriziran 2004. godine na Sveučilištu u Manchesteru (Novoselov i sur., 2004). Posjeduje mnoga interesantna svojstva: jedan je od najtanjih i najčvršćih materijala, može podnijeti gustoću električne struje šest redova veličine veću od bakra, pokazuje rekordnu toplinsku provodnost te je nepropustan za plinove (Geim, 2009), što vodi do njegove sve češće primjene kako u ostalim područjima, tako i u elektroanalitici.

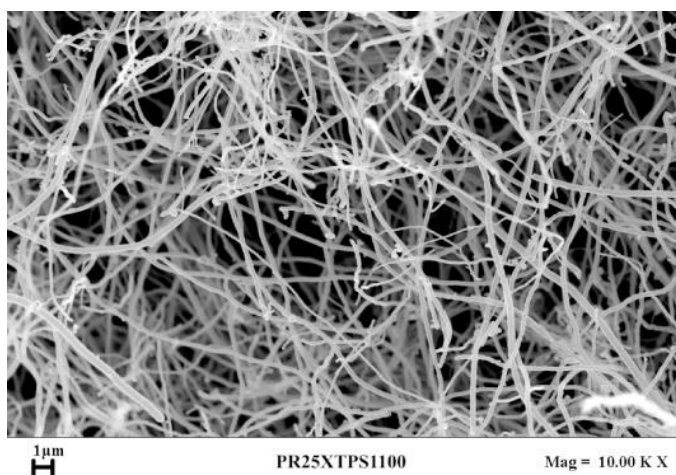
Grafen se može proizvesti u raznim oblicima, što konačno i uvjetuje raznolikost svojstava tog materijala. Najčešći su mono-, dvo- i troslojevi grafena, višeslojni grafen, grafen oksid (monosloj grafena s visokim sadržajem kisika u obliku karboksilnih, hidroksilnih i epoksidnih skupina) koji je prikazan na slici 9, grafitni oksid koji je prekursor grafen oksida, grafen nanopločice (2D materijal s debljinom i/ili lateralnim dimenzijama manjim od 100 nm), prikazane na slici 10, ugljikove nanocjevčice (cilindri slojeva grafena) (www.graphene.manchester.ac.uk) te ugljikova nanovlakna, tj. linearni,  $sp^2$ -hibridizirani diskontinuirani filamentu u kojima se slojevi grafena najčešće ne poklapaju s osi filamenta (Poveda i Gupta, 2016), prikazana na slici 11.



Slika 9. SEM prikaz grafen oksida (Jiang i sur., 2012)



Slika 10. SEM prikaz grafen nanopločica (www.knano.com.cn)



Slika 11. SEM prikaz ugljikovih nanovlakana (Guadagno i sur., 2013)

Postoje razne metode proizvodnje grafena. Geim i Novoselov su prvi izolirali monosloj grafena pomoću ljepljive vrpce i grafita, a danas se najčešće koriste tekuća eksfolijacija, tj. razbijanje slojeva grafita pomoću ultrazvučne energije u tekućem mediju, elektrokemijska eksfolijacija kojom se mogu proizvoditi grafen i grafen oksid (www.graphene.manchester.ac.uk), anodno vezanje, fotoeksfolijacija i laserska ablacija (skidanje slojeva grafita pomoću lasera i svjetlosti), rast na metalima i silicijevom karbidu (SiC) precipitacijom itd. (Bonaccorso i sur., 2012).

Grafen i elektrode modificirane grafenom pokazuju izvrsne performanse u direktnoj elektrokemiji enzima, kemijskoj detekciji malih molekula te veću selektivnost i osjetljivost, zbog čega su od velikog interesa u elektroanalitici (Shao i sur., 2009).

U primjeni grafena u voltametriji, on se najčešće suspendira u etanolnoj otopini Nafiona (sulfoniranog kopolimera perfluoriranog vinileter komonomera i tetrafluoroetilena) te nanosi na elektrodu. Etanol stajanjem ispari te se dobiva modificirana površina elektrode koja se sastoji od grafena i Nafiona u tankom sloju. Nafion osigurava jednoličan raspored nanomaterijala na elektrodi te homogenu površinu elektrode i dobro prianjanje na elektrodu, no ne smije biti u koncentraciji većoj od 0,5% jer visoke koncentracije Nafiona sprječavaju izmjenu elektrona.

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Nepafenak je jedan od rijetkih lijekova u terapiji postoperativne boli nakon operacije katarakte koji se primjenjuje topički, no još je uvijek mali broj razvijenih analitičkih metoda za određivanje samog lijeka. Cilj ovog rada bio je postaviti temelje za razvoj elektroanalitičke metode za određivanje nepafenaka, specifično voltametrijom, kao i ispitati ponašanje lijeka i produkta oksidacije na samoj elektrodi.

Velika prednost elektroanalitičkih metoda je njihova brzina izvođenja, kao i niska cijena, što ih čini veoma prikladnima za rutinske analize, primjerice, farmaceutskih formulacija ili bioloških uzoraka, što bi se postiglo razvojem voltametrijske metode za određivanje ovog lijeka. Voltometrija kao tehnika odabrana je zbog prisutnosti amino skupine na središnjem prstenu nepafenaka koja, uz prijenos elektrona, može prijeći u oksidirane oblike te dati adekvatan signal na voltamogramu.

Upotrebom raznih elektroda poput zlatne elektrode, elektrode od staklastog ugljika i dijamantne elektrode s primjesama bora te raznim nanomaterijalima nanesenim na površinu elektrode poput grafen oksida, grafen nanopločica te ugljikovih nanovlakana u ovom radu ispitivao se voltametrijski odgovor lijeka na različitim radnim površinama te se pokušavao postići što veći intenzitet signala uz što veću selektivnost i manju pozadinsku struju kako bi se pronašli optimalni parametri za daljnji razvoj metode. Također se proučavala adsorpcija lijeka i njegovog produkta oksidacije na modificiranim površinama elektrode s ciljem boljeg razumijevanja prirode lijeka i produkta, kao i adsorpcijske kinetike.



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

### 3.1. KEMIKALIJE

U izradi ovog diplomskog rada korištene su sljedeće kemikalije:

1. Borna kiselina,  $H_3BO_3$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
2. Etanol 96% (Badel, Zagreb, Hrvatska)
3. Fosfatna kiselina,  $H_3PO_4$  (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
4. Grafen oksid (US Research Nanomaterials, Inc., Houston, SAD)
5. Grafen nanopločice (US Research Nanomaterials, Inc., Houston, SAD)
6. Metanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
7. Nafion (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
8. Natrijev hidroksid, NaOH (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
9. Nepafenak (Pliva, Zagreb, Hrvatska)
10. Octena kiselina,  $CH_3COOH$  (Alkaloid Skopje, Skopje, Makedonija)
11. Ugljikova nanovlakna (US Research Nanomaterials, Inc., Houston, SAD)
12. Ultračista voda (pripravljena pomoću Milli-Q sustava, Millipore, Bradford, SAD)

### 3.2. RADNI INSTRUMENTI

Ciklička i pravokutnovalna voltametrijska mjerenja vršena su na uređaju  $\mu$  Autolab potentiostat/galvanostat (Eco Chemie) spojenim sa stolnim računalom te upravljanim programom GPES 4.9. Uređaj je povezan s elektrokemijskim člankom koji se sastoji od radne, referentne i protuelektrode. Kao radna elektroda korištene su dijamantna elektroda s primjesama bora, zlatna elektroda, elektroda od staklastog ugljika te modifikacije elektrode od staklastog ugljika pripremljene nanošenjem suspenzija različitih nanomaterijala u etanolnoj otopini Nafiona, točnije grafen oksida, grafen nanopločica te ugljikovih nanovlakana. Kao referentna elektroda korištena je srebro/srebrov klorid (Ag/AgCl) elektroda, a kao protuelektroda platinska (Pt) žica.

U izradi Britton-Robinson pufera te otopina za analizu za mjerenje pH-vrijednosti korišten je pH-metar s kombiniranom staklenom elektrodom (Mettler Toledo) kalibriran uz standardne otopine pufera  $\text{pH}_1 = 4,00 \pm 0,01$  te  $\text{pH}_2 = 7,00 \pm 0,01$ .

Za vaganje uzorka nepafenaka te nanomaterijala korištena je analitička vaga Mettler Toledo AB-204-S.

Homogeniziranje suspenzija nanomaterijala, ubrzavanje otapanja nepafenaka u otapalu te čišćenje površine elektrode prije modifikacije površine vršeno je na ultrazvučnoj kupelji Elmasonic S 30H Elma.

### 3.3. PRIPREMA OTOPINA I SUSPENZIJA

#### 3.3.1. MATIČNA OTOPINA

Potrebno je pripremiti matičnu otopinu nepafenaka koncentracije  $1 \times 10^{-3}$  M u odmjernoj tikvici od 10,0 mL. Stehiometrijskim izračunom dolazi se do mase nepafenaka od 0,0025 g koja se izvaže na analitičkoj vagi u prašiću te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 10,0 mL. Prašić se ispiri metanolom u tikvicu kako bi se kvantitativno prenio sav nepafenak te se tikvica puni metanolom do otprilike polovice volumena. Tikvica se može staviti u ultrazvučnu kupelj u svrhu ubrzavanja otapanja nepafenaka te se nakon otapanja nadopunjava metanolom do oznake i promućka. Otopina se čuva u hladnjaku pri 4 °C, zatvorena i zaštićena od svjetlosti.

#### 3.3.2. BRITTON-ROBINSON PUFER

Za pripremu Britton-Robinson (BR) pufera potrebne su sljedeće kemikalije: borna kiselina ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), octena kiselina ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), fosfatna kiselina ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) te natrijev hidroksid (NaOH). Pripreme se 0,5 M otopine navedenih kiselina, pipetira se po 20,0 mL otopine svake kiseline u odmjernu tikvicu od 250,0 mL te nadopuni ultračistom vodom do oznake, čime se dobiva pH pufera 1,9. Različite pH vrijednosti puferske otopine dobivaju se dodatkom određene količine 0,2 M otopine NaOH.

### 3.3.3. RADNE OTOPINE

Potrebno je pripremiti radne otopine nepafenaka u koncentracijama  $1 \times 10^{-4}$  M,  $1 \times 10^{-5}$  M i  $5 \times 10^{-6}$  M. Otopine se pripremaju tako da se određeni volumen matične otopine pipetira u odmjernu tikvicu od 20,0 mL te se tikvica nadopuni BR puferom željenog pH do oznake. Koncentracije matične i radnih otopina te potrebni volumeni matične otopine prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Izrada radnih otopina nepafenaka

<b>otopina</b>	<b>koncentracija otopine</b>	<b>volumen matične otopine</b>
matična otopina	$1 \times 10^{-3}$ M	/
radna otopina 1	$1 \times 10^{-4}$ M	2 mL
radna otopina 2	$1 \times 10^{-5}$ M	200 $\mu$ L
radna otopina 3	$5 \times 10^{-6}$ M	100 $\mu$ L

### 3.3.4. SUSPENZIJE NANOMATERIJALA

Na analitičkoj vagi odvojeno se odvažuje 1 mg grafen oksida, 1 mg grafen nanopločica i 1 mg ugljikovih nanovlakana. Svaki od nanomaterijala kvantitativno se prenese u zasebnu tikvicu od 5,0 mL, u svaku tikvicu se pipetira 1,0 mL 0,3%-tne otopine Nafiona u etanolu te se tikvice stavljaju u ultrazvučnu kupelj na kratko vrijeme u svrhu homogeniziranja suspenzija. Suspenzije se čuvaju u hladnjaku pri 4 °C, zatvorene i zaštićene od svjetlosti.

### 3.4. PRIPREMA ELEKTRODA

Nemodificirana elektroda od staklastog ugljika prije primjene se polira na krpici s prahom aluminijevog oksida ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) te ispere vodom, dok zlatna i dijamantna elektroda s primjesama bora nisu zahtijevale pripreme prije mjerenja.

Kod elektrode od staklastog ugljika modificirane nanomaterijalima prije nanošenja nanomaterijala potrebno je polirati površinu elektrode na krpici s prahom aluminijevog oksida ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) kao abrazivom kako bi se osigurala jednolična površina elektrode. Poliranje se vrši kružnim pokretima elektrode na krpici. Nakon poliranja, elektroda se nakratko može uroniti u ultrazvučnu kupelj kako bi se osiguralo uklanjanje nepotrebnih čestica, ispire destiliranom vodom te ostavlja da se osuši. Na osušenu elektrodu nanosi se  $10 \mu\text{L}$  suspenzije grafen oksida u 0,3%-tnoj etanolnoj otopini Nafiona prethodno homogenizirane na ultrazvučnoj kupelji te ponovo ostavlja da se osuši, a kada je potpuno suha, može se koristiti. Nakon željenih mjerenja sloj grafena se skida mehanički, tj. poliranjem elektrode na krpici s  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , uranjanjem u ultrazvučnu kupelj te ispiranjem destiliranom vodom. Cijeli postupak ponovi se za ostale nanomaterijale (grafen nanopločice te ugljikova nanovlakna).

Nakon mjerenja u otopini uzorka bilo je potrebno isprati elektrodu ultračistom vodom te provesti nekoliko mjerenja u BR puferu kako bi se adsorbirani analit desorbirao s površine elektrode. Ukoliko se taj korak ne bi izvršio, rezultati bi pokazivali veću koncentraciju analita u otopini nego što ona zapravo je zbog adsorpcije na samoj elektrodi. Nakon tog koraka elektroda je bila spremna za mjerenje osnovnog elektrolita ili drugih koncentracija analita.

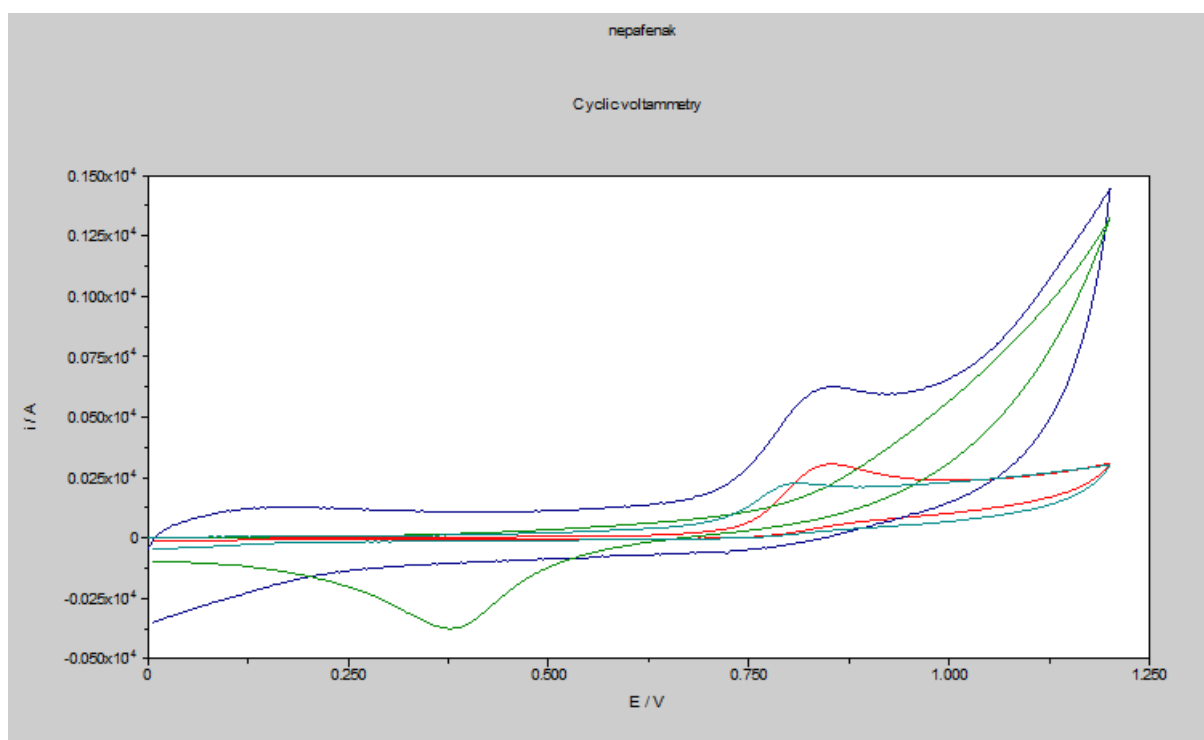
### 3.5. UVJETI MJERENJA

Ciklički voltamogrami snimljeni su na zlatnoj elektrodi, dijamantnoj elektrodi s primjesama bora, elektrodi od staklastog ugljika te elektrodi od staklastog ugljika modificiranoj grafen oksidom, grafen nanopločicama ili ugljikovim nanovlaknima suspendiranim u 0,3%-tnoj otopini Nafiona u etanolu uz brzinu promjene potencijala od 25 do  $500 \frac{\text{mV}}{\text{s}}$ , rasponu potencijala od 0 do 1,2 V te vremena akumulacije od 0 do 180 s.

Pravokutnovalni voltamogrami snimljeni su na istim elektrodama u rasponu potencijala od 0 do 1,2 V, frekvencije od 25 do 100 Hz, amplitude od 15 do 50 mV te promjene porasta potencijala od 2 do 8 mV.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

Svrha prvog mjerenja otopine nepafenaka cikličkom voltametrijom bila je odabir najprikladnije elektrode. Izvršena su mjerenja otopine analita koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M upotrebom elektrode od staklastog ugljika promjera 2 i 3 mm, zlatne elektrode te dijamantne elektrode s primjesama bora. Najprije se mjerio osnovni elektrolit, tj. BR pufer odgovarajućeg pH te zatim radna otopina analita. Dobiveni ciklički voltamogrami prikazani su na slici 12.



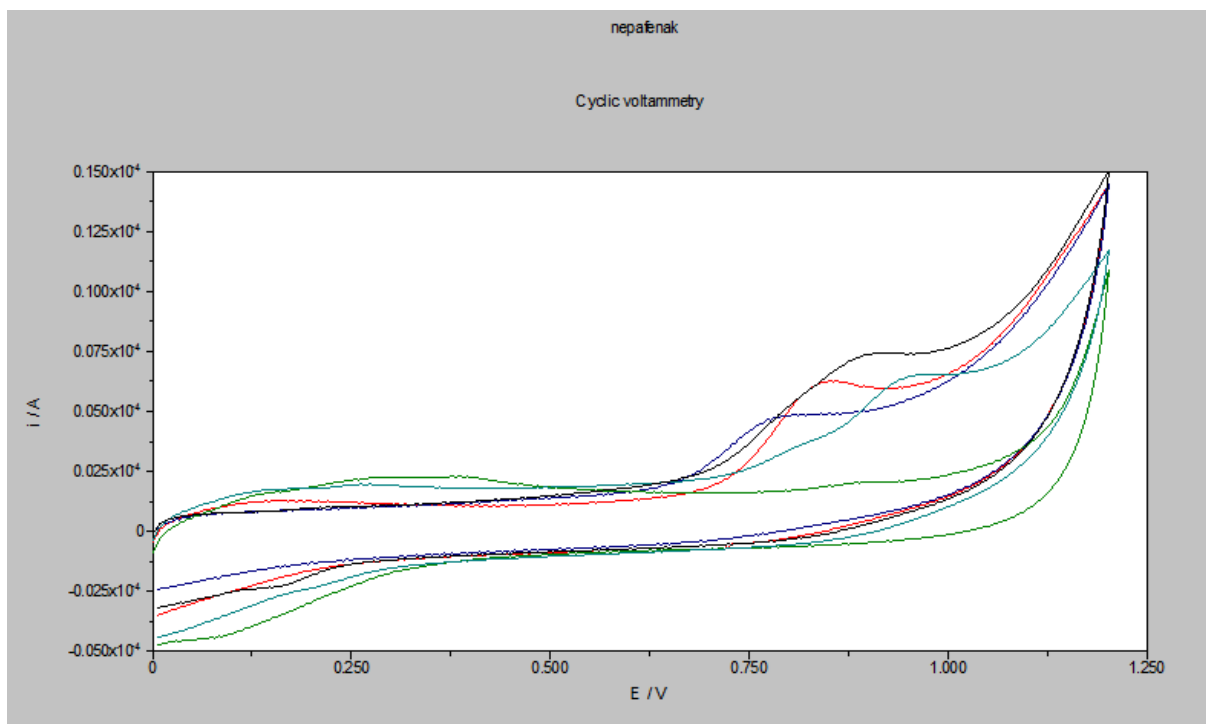
Slika 12. Ciklički voltamogrami otopine nepafenaka koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M u BR puferu pH 6 mjereni na elektrodi od staklastog ugljika promjera 2 mm (tirkizno), elektrodi od staklastog ugljika promjera 3 mm (plavo), zlatnoj elektrodi (zeleno) i dijamantnoj elektrodi s primjesama

bora (crveno) pri brzini promjene potencijala  $100 \frac{\text{mV}}{\text{s}}$

Strujni vrh na potencijalu oko 0,80 V posljedica je oksidacije nepafenaka, tj. njegove amino skupine. Jakost struje je najveća na elektrodi od staklastog ugljika promjera 3 mm (engl. *glassy carbon electrode*, dalje u tekstu GCE), pa je ta elektroda korištena u daljnjim ispitivanjima, uzimajući u obzir da metoda treba moći odrediti koncentracije analita dva do tri reda niže od trenutne.

Sljedeći korak bio je utvrditi optimalni pH za daljnja ispitivanja kako bi se osigurala što bolja osjetljivost metode, kao i odrediti sudjeluje li prijenos protona u oksidaciji spoja.

Ioniziranost amino skupine nepafenaka ovisi o pH. Pri nižem pH amino skupina biti će protonirana, tj. ionizirana, dok će pri višim pH biti u svom deprotoniranom, tj. neioniziranom stanju, što sve utječe na visinu pika. Na slici 13 prikazani su ciklički voltamogrami otopina nepafenaka u rasponu pH od 2 do 8.

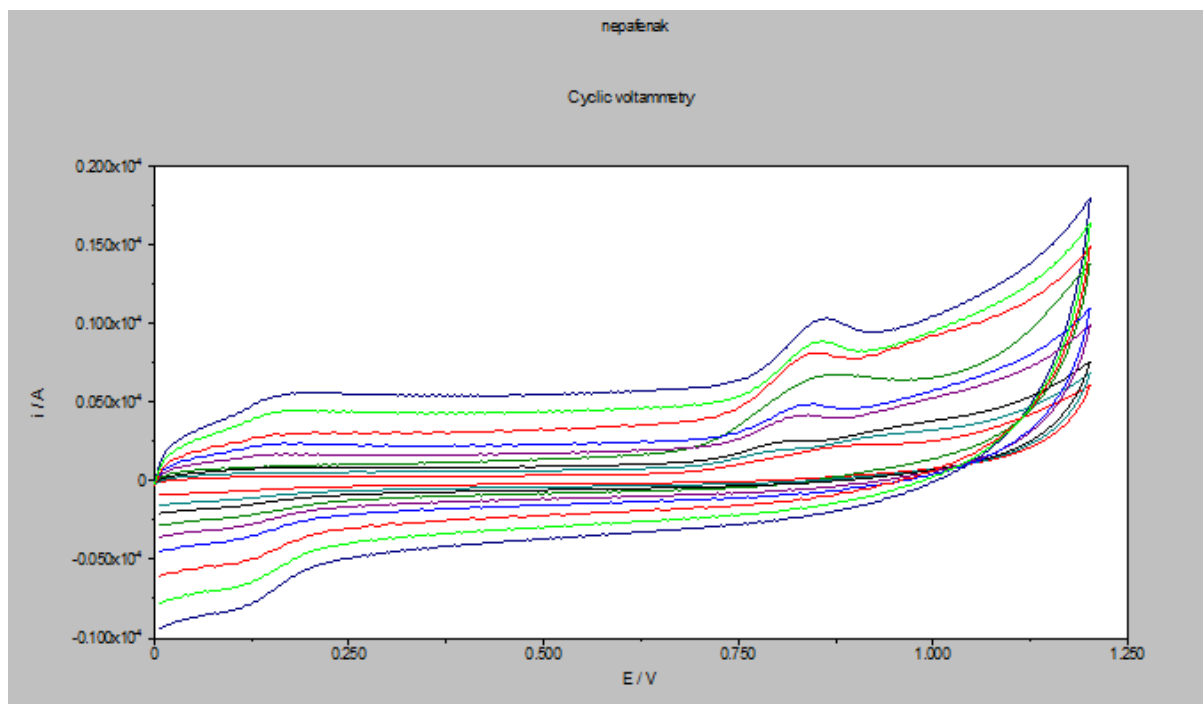


Slika 13. Ciklički voltamogrami otopina nepafenaka koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M u BR puferu pH 2 (zeleno), pH 4 (tirkizno), pH 5 (crno), pH 6 (crveno) te pH 8 (plavo) pri promjeni brzine potencijala  $100 \frac{\text{mV}}{\text{s}}$

Iz voltamograma je vidljivo kako je strujni vrh najviši i najdefiniraniji pri pH 6 pa je za daljnja mjerenja primjenjivan upravo taj pH BR pufera. Također, porastom pH pufera strujni vrh pomiče se prema negativnijim vrijednostima potencijala, što upućuje da je u proces oksidacije uključen i prijenos protona (tzv. *proton-coupled electron transfer*).



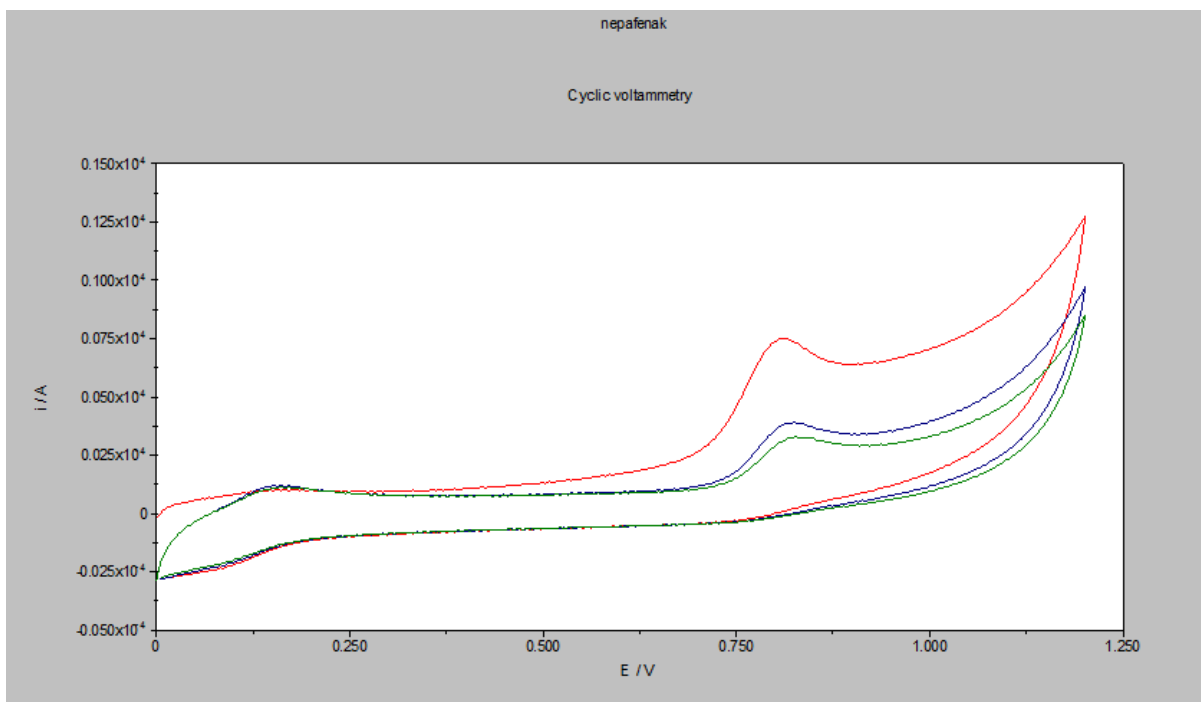
Nadalje, ispitivana je različita brzina promjene potencijala s prethodno utvrđenim optimalnim parametrima, tj. BR puferu pH 6, na elektrodi od staklastog ugljika promjera 3 mm. Brzina promjene potencijala protezala se od 25 do 500  $\frac{\text{mV}}{\text{s}}$ . Ciklički voltamogrami su prikazani na slici 14, gdje najmanju promjenu brzine potencijala prikazuje najdonji voltamogram s trendom porasta promjene brzine prema višim voltamogramima.



Slika 14. Ciklički voltamogrami otopine nepafenaka koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M u BR puferu pH=6 mjereni na GCE promjera 3 mm s promjenama brzine potencijala 25 (najdonji voltamogram, ružičasto), 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400 i 500  $\frac{\text{mV}}{\text{s}}$  (najgornji voltamogram, tamnoplavo)

Vidljivo je da porastom brzine promjene potencijala oksidacijski strujni vrh raste te se pomiče prema pozitivnijim vrijednostima potencijala, čime možemo zaključiti da je oksidacija nepafenaka ireverzibilan proces. Ovisnost struje o brzini promjene potencijala ukazuje da je elektrokemijski proces difuzijski kontroliran na toj elektrodi. Za sva daljnja ispitivanja odabrana je promjena brzine potencijala 100  $\frac{\text{mV}}{\text{s}}$ .

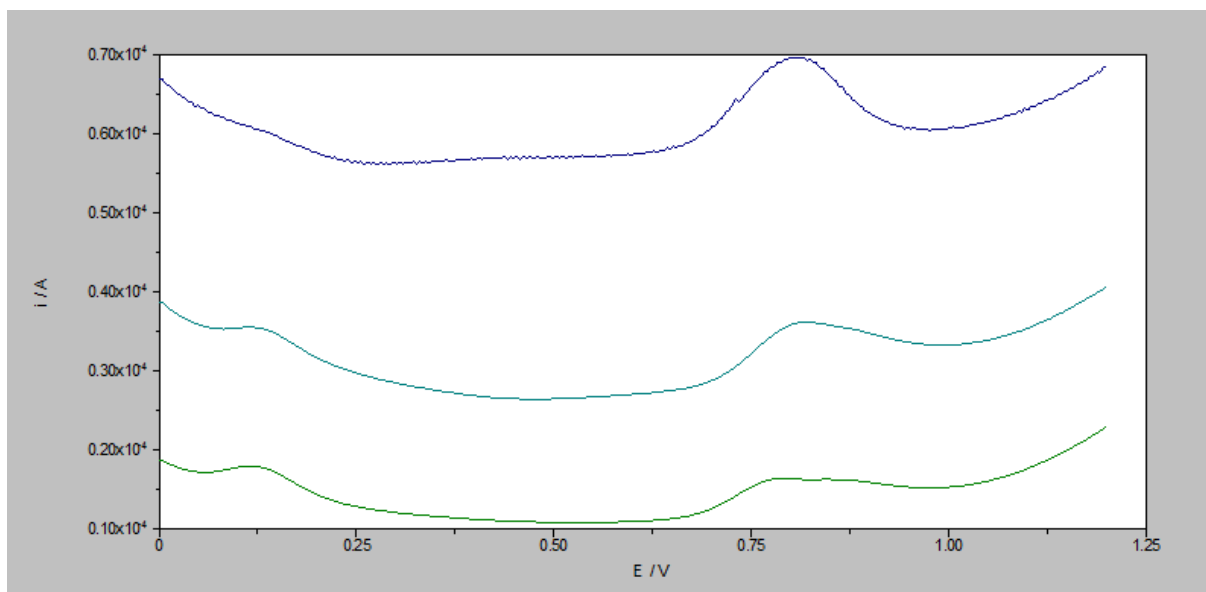
Sljedeća 3 snimanja provedena su uzastopno, s razmakom 30 sekundi između mjerenja, u otopini nepafenaka u elektrolitu na GCE. Voltamogrami su prikazani na slici 15.



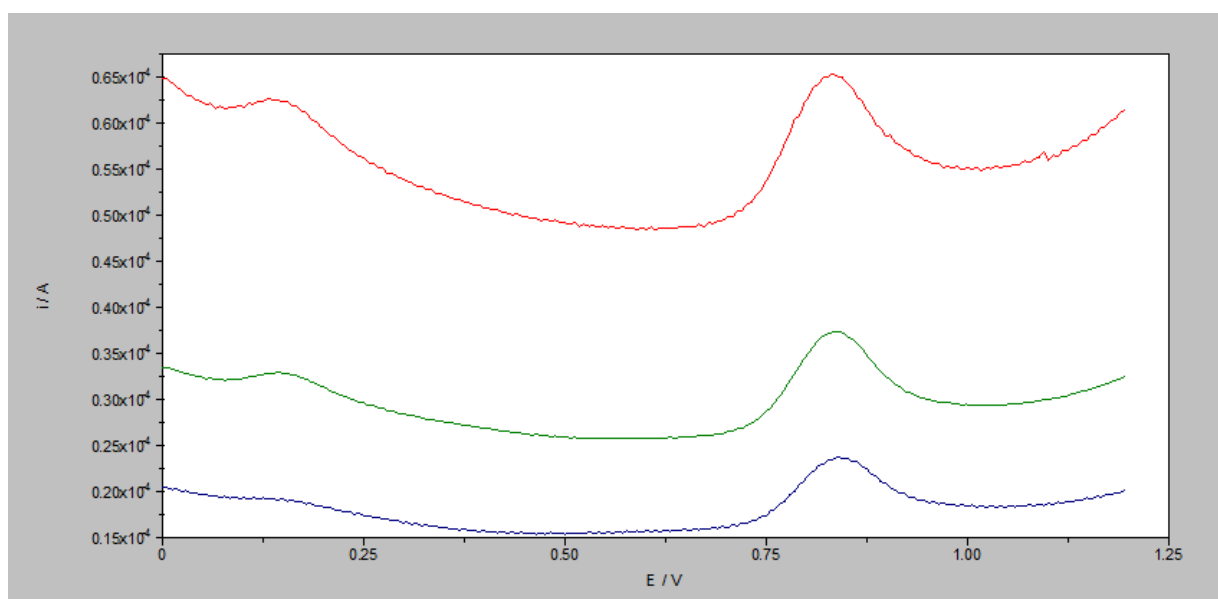
Slika 15. Ciklički voltamogrami otopine nepafenaka koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M u BR puferu pH 6 na GCE. Prvo snimanje (crveno), drugo snimanje (plavo), treće snimanje (zeleno)

Strujni vrh uzastopnim snimanjima pada, što vodi do zaključka kako se događa promjena na površini elektrode. Elektrodu bi trebalo nakon svakog mjerenja polirati kako bi se osigurala reproducibilnost, no to dovodi do trošenja elektrode i skraćivanja njenog vijeka.

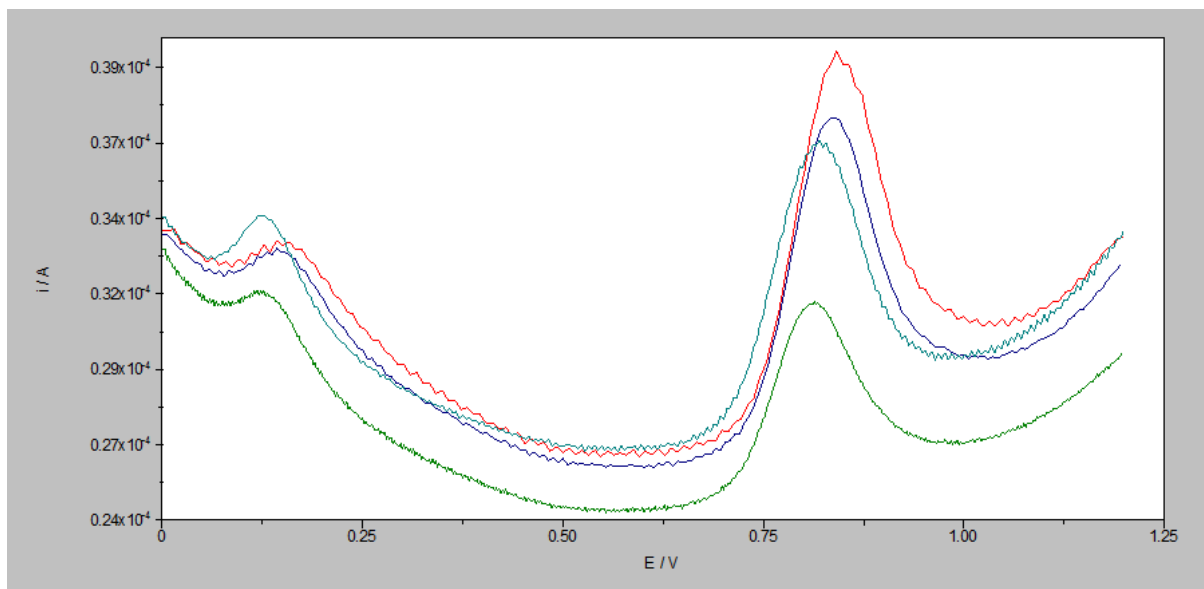
Budući da je tijekom razvoja metode potrebno pouzdano detektirati i kvantificirati niže količine analita od reda koncentracije  $10^{-4}$  M, upotrijebljena je i druga vrsta voltametrije, pravokutnovalna voltametrija koja je dovoljno osjetljiva da detektira i analite reda do  $10^{-8}$  M. Kako je prvenstveno trebalo pronaći optimalne parametre metode, nastavilo se raditi s koncentracijom  $1 \times 10^{-4}$  M, koja će se daljnjim razvojem snižavati. Provedene su analize otopine nepafenaka navedene koncentracije u BR puferu pH 6 na GCE. Pravokutnovalni voltamogrami promjena frekvencije, amplitude i promjene porasta potencijala prikazani su na slikama 16, 17 i 18 iznad navedenim redom.



Slika 16. Pravokutnovalni voltamogrami otopine nepafenaka koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M u BR puferu pH 6 na GCE, frekvencije 25 Hz (zeleno), 50 Hz (tirkizno) i 100 Hz (plavo)



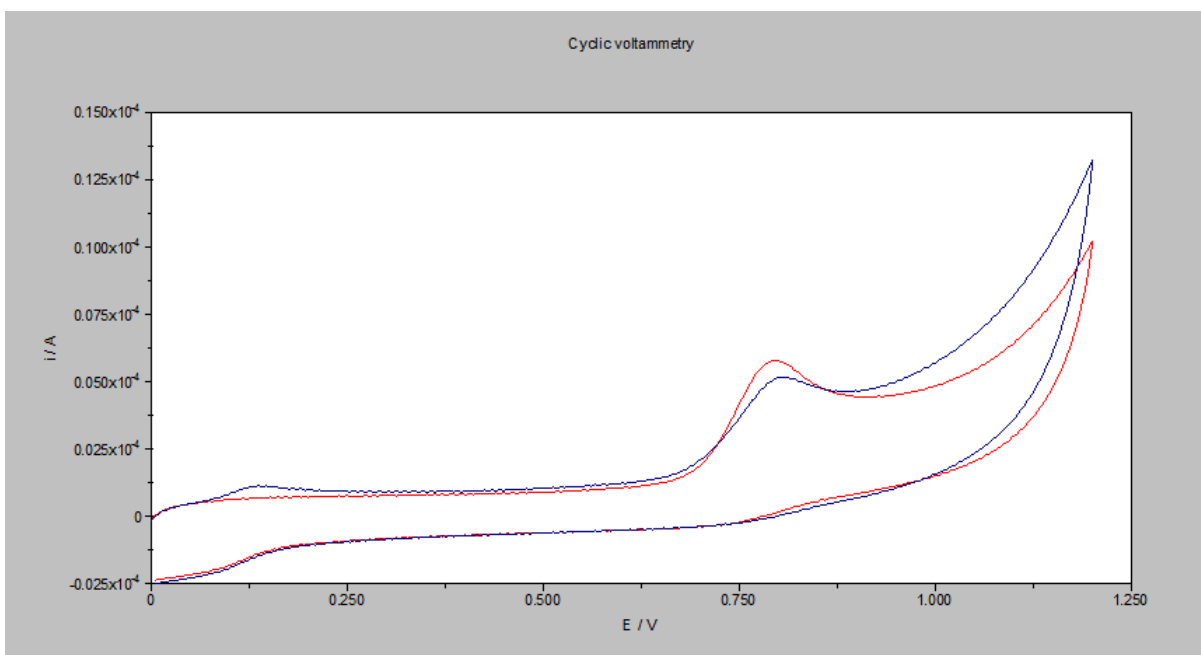
Slika 17. Pravokutnovalni voltamogrami otopine nepafenaka koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M u BR puferu pH 6 na GCE, amplitude 15 mV (plavo), 25 mV (zeleno) i 50 mV (crveno)



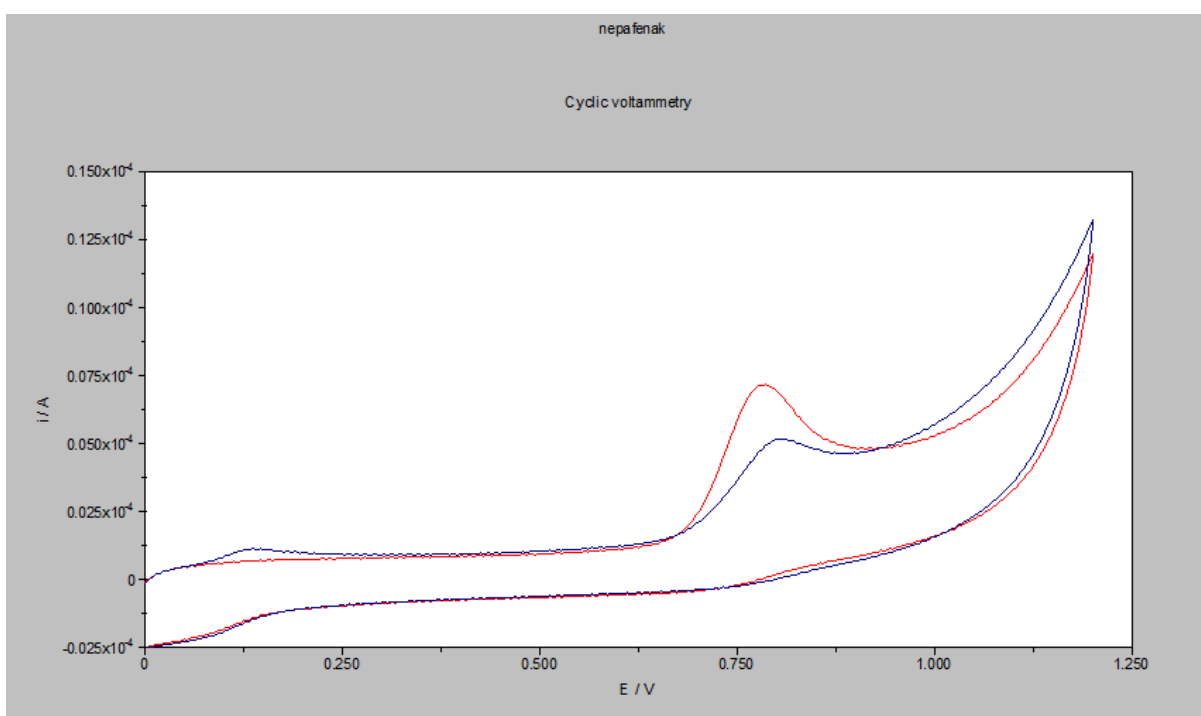
Slika 18. Pravokutnovalni voltamogrami otopine nepafenaka koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M u BR puferu pH 6 na GCE, promjene porasta potencijala 2 mV (zeleno), 4 mV (tirkizno), 6 mV (plavo) i 8 mV (crveno)

Na prikazanim voltamogramima vidljivo je kako je strujni vrh, tj. oksidacijski pik nepafenaka najbolje definiran na frekvenciji od 100 Hz, amplitudi 25 mV te promjeni porasta potencijala od 6 mV te su navedeni parametri korišteni u daljnjim ispitivanjima pravokutnovalnom voltametrijom.

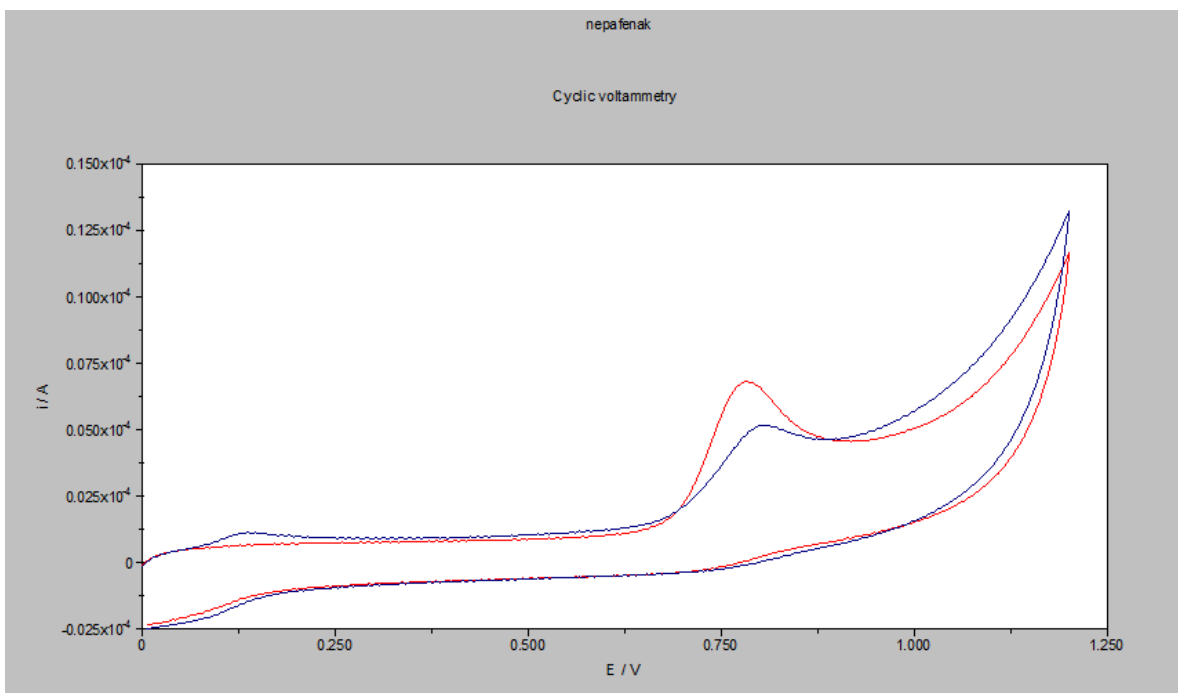
Nakon ispitivanja na nemodificiranoj GCE, provedena su ispitivanja cikličkom i pravokutnovalnom voltametrijom na GCE čija je površina modificirana nanomaterijalima grafen oksidom (engl. *graphene oxide*, dalje u tekstu GRO), grafen nanopločicama (engl. *graphene nanoplatelets*, dalje u tekstu GRP) i ugljikovim nanovlaknima (engl. *carbon nanofibers*, dalje u tekstu CNF) suspendiranim u 0,3%-tnoj etanolnoj otopini Nafiona. Površina elektrode se modificira prema postupku opisanom u poglavlju Materijali i metode, potpoglavlju Priprema elektroda. Snimljeni su ciklički voltamogrami na GCE modificiranoj svakim od materijala te su uspoređeni s cikličkim voltamogramima snimljenim na nemodificiranoj GCE. Rezultati su prikazani na slikama 19 (GRO), 20 (GRP), 21 (CNF) i 22 (usporedba svih navedenih površina).



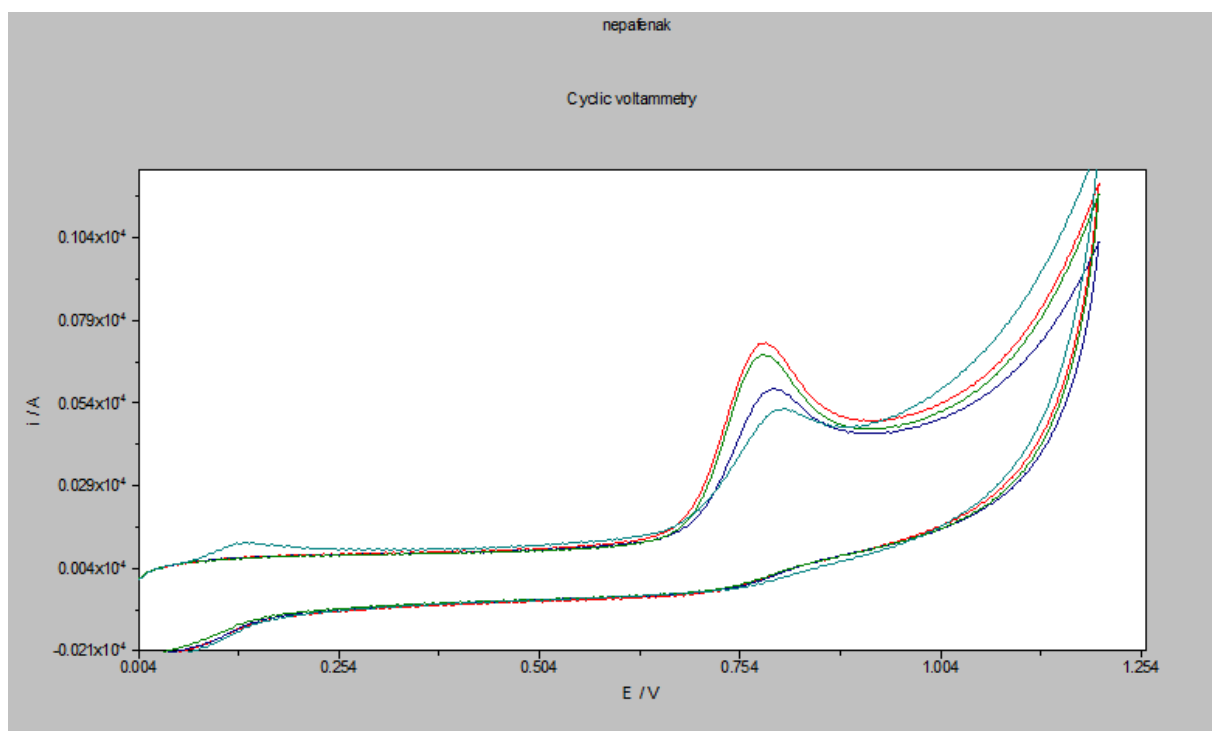
Slika 19. Ciklički voltamogrami otopine nepafenaka koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M u BR puferu pH 6 snimljeni na nemodificiranoj GCE (plavo) i GCE čija je površina modificirana GRO u 0,3%-tnoj etanolnoj otopini Nafiona (crveno)



Slika 20. Ciklički voltamogrami otopine nepafenaka koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M u BR puferu pH 6 snimljeni na nemodificiranoj GCE (plavo) i GCE čija je površina modificirana GRP u 0,3%-tnoj etanolnoj otopini Nafiona (crveno)



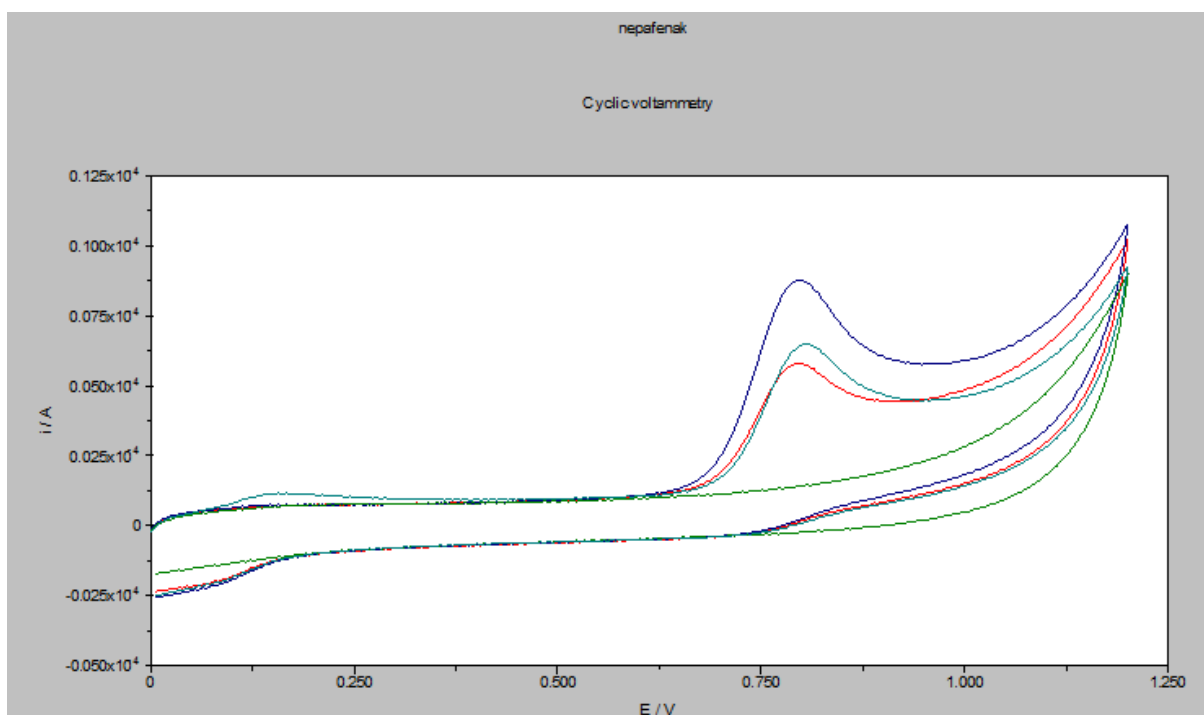
Slika 21. Ciklički voltamogrami otopine nepafenaka koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M u BR puferu pH 6 snimljeni na nemodificiranoj GCE (plavo) i GCE čija je površina modificirana CNF u 0,3%-tnoj etanolnoj otopini Nafiona (crveno)



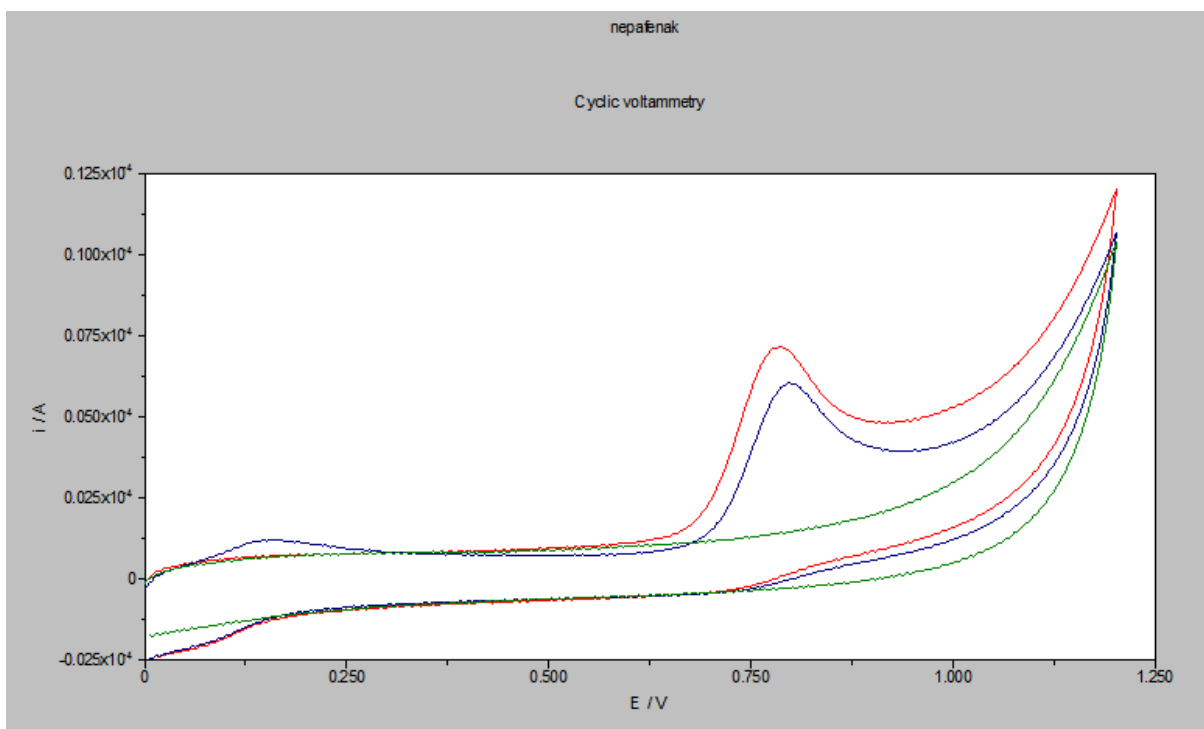
Slika 22. Ciklički voltamogrami otopine nepafenaka koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M u BR puferu pH 6 snimljeni na nemodificiranoj GCE (tirkizno) i GCE čija je površina modificirana GRO (plavo), CNF (zeleno) i GRP (crveno) u 0,3%-tnoj etanolnoj otopini Nafiona

Već na prvi pogled je vidljivo kako su oksidacijski pikovi snimljeni na GCE modificiranih površina veći i definiraniji u odnosu na nemodificiranu GCE. Ako se usporede vršne struje i vrijednosti potencijala oksidacijskih pikova mjerenja na nemodificiranoj i modificiranim GCE, može se uočiti kako su vršne struje na GCE modificiranoj nanomaterijalima više nego na nemodificiranoj (3,06  $\mu\text{A}$  za GRO, 4,29  $\mu\text{A}$  za GRP i 4,18  $\mu\text{A}$  za CNF u odnosu na 1,96  $\mu\text{A}$  za nemodificiranu GCE), što znači veću osjetljivost metode, a vrijednosti potencijala pomaknute prema manje pozitivnim vrijednostima (0,79 V za GRO, 0,78 V za GRP i 0,78 V za CNF u odnosu na 0,80 V za nemodificiranu GCE), što znači lakšu oksidaciju analita, tj. nanomaterijali imaju elektrokatalitičko djelovanje.

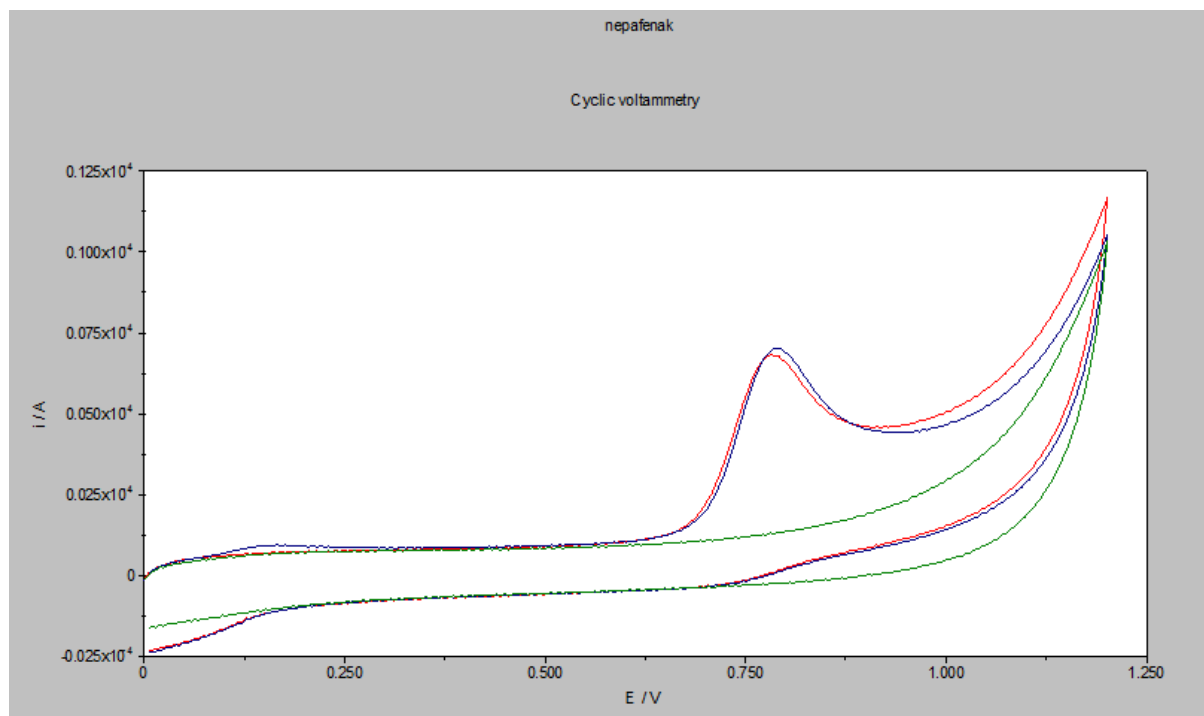
Uočeno je da se ponovljenim snimanjima cikličkih voltamograma otopine nepafenaka oksidacijski pik smanjuje, a na potencijalu 0,15 V pojavljuje novi pik. Voltamogrami koji prikazuju navedene procese prikazani su na slikama 23 (GRO), 24 (GRP) i 25 (CNF).



Slika 23. Ciklički voltamogrami otopine nepafenaka koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M snimljeni na GCE modificiranoj GRO: prvo snimanje (crveno), drugo snimanje 3 minute nakon prvog (plavo), treće snimanje odmah nakon drugog (tirkizno) i sam osnovni elektrolit (zeleno)



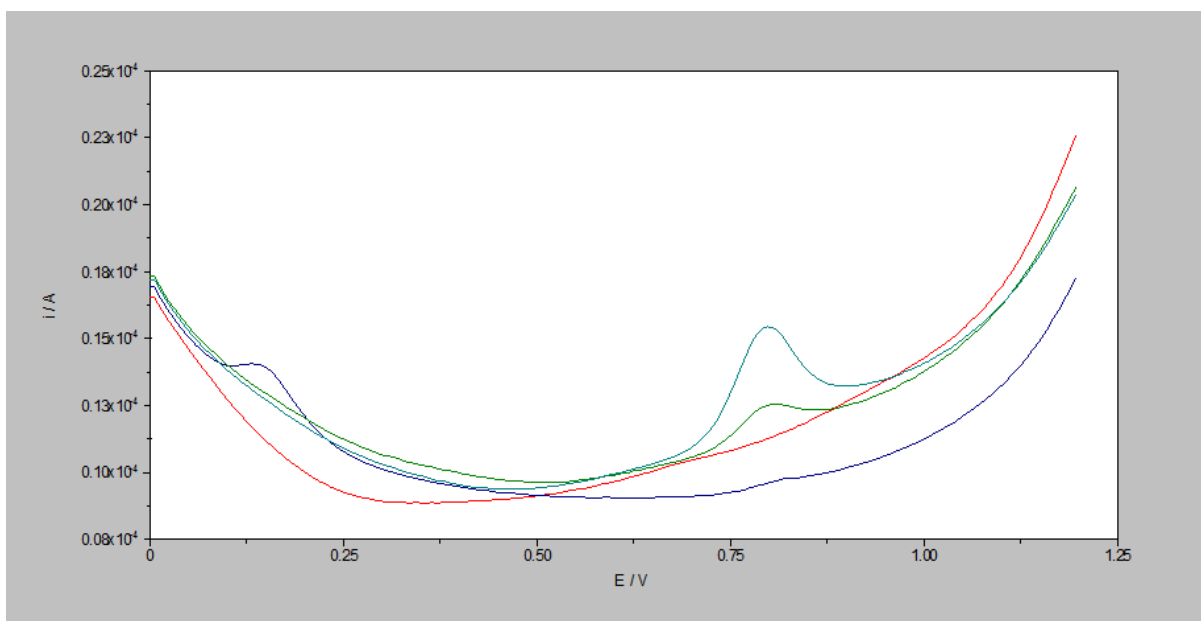
Slika 24. Ciklički voltamogrami otopine nepafenaka koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M snimljeni na GCE modificiranoj GRP: prvo snimanje (crveno), drugo snimanje odmah nakon prvog (plavo) i sam osnovni elektrolit (zeleno)



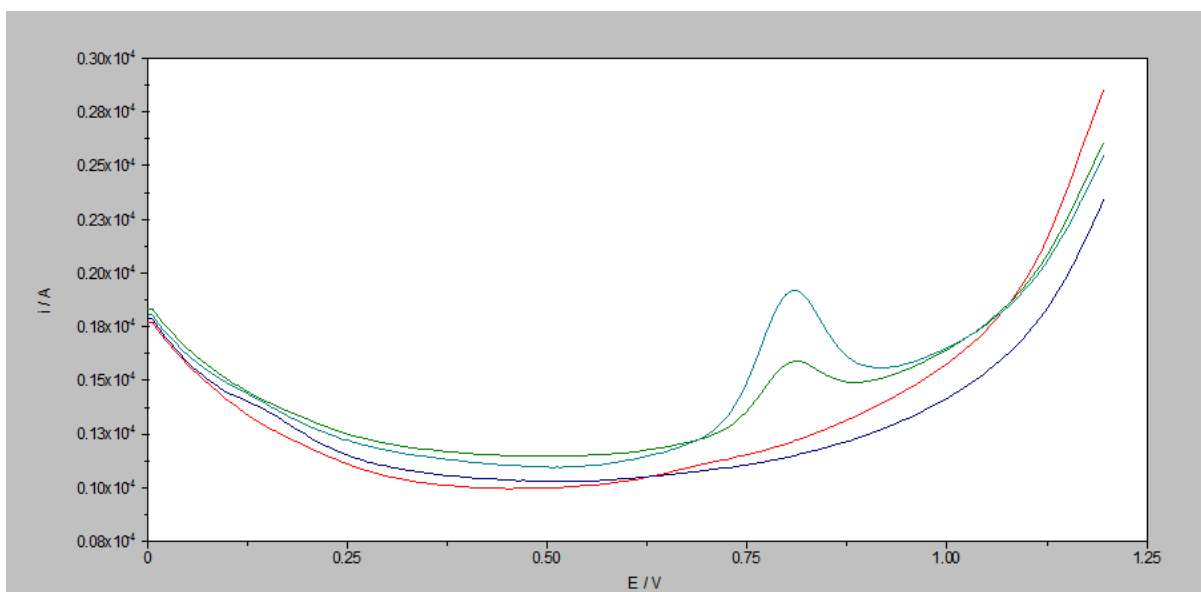
Slika 25. Ciklički voltamogrami otopine nepafenaka koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M snimljeni na GCE modificiranoj CNF: prvo snimanje (crveno), drugo snimanje odmah nakon prvog (plavo) i sam osnovni elektrolit (zeleno)



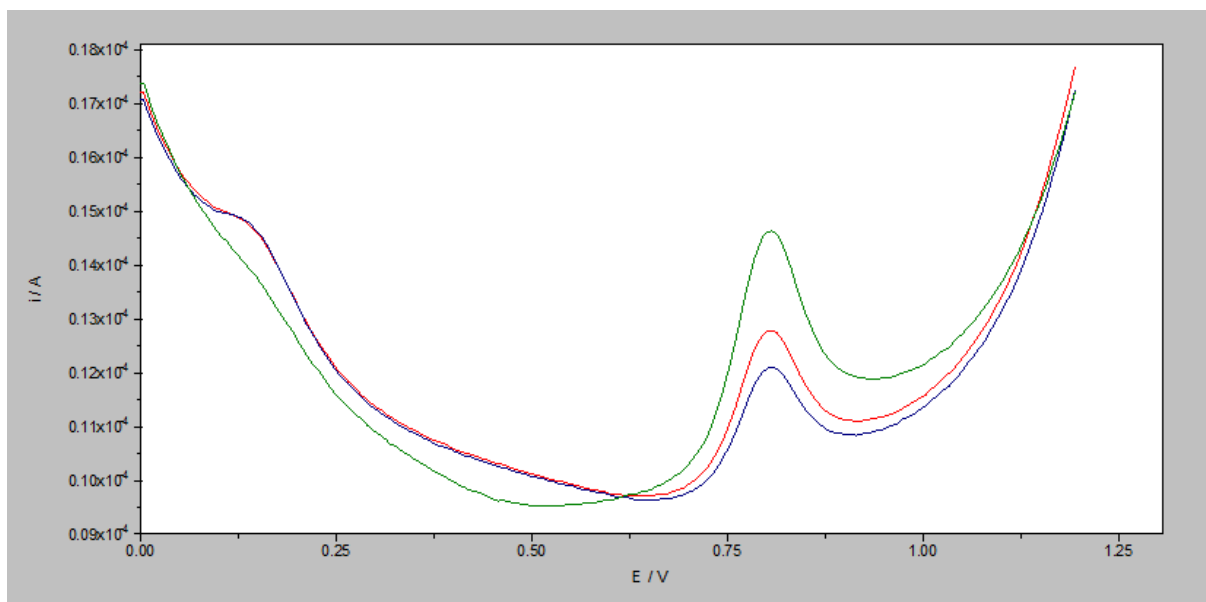
Također, pik se pojavio snimanjem u samoj otopini osnovnog elektrolita nakon što je na površini elektrode mjereno analit. Kako bi se utvrdilo dolazi li do gore navedenih procesa i pri nižim koncentracijama analita, ispitivanja su ponovljena pravokutnovalnom voltametrijom u svrhu bolje osjetljivosti u otopini nepafenaka koncentracije  $1 \times 10^{-5}$  M i frekvencijom od 50 Hz zbog bolje definiranosti pika pri toj koncentraciji. Rezultati su prikazani na slikama 26 (GRO), 27 (GRP) i 28 (CNF).



Slika 26. Pravokutnovalni voltamogrami otopine nepafenaka koncentracije  $1 \times 10^{-5}$  M snimljeni na GCE modificiranoj GRO u 0,3%-tnoj etanolnoj otopini Nafiona: sam osnovni elektrolit (crveno), prvo snimanje (zeleno), drugo snimanje 5 minuta nakon prvog (tirkizno), ponovljeno snimanje osnovnog elektrolita nakon snimanja otopine lijeka i opetovanog snimanja osnovnog elektrolita (plavo)



Slika 27. Pravokutnovalni voltamogrami otopine nepafenaka koncentracije  $1 \times 10^{-5}$  M snimljeni na GCE modificiranoj GRP u 0,3%-tnoj etanolnoj otopini Nafiona: sam osnovni elektrolit (crveno), prvo snimanje (zeleno), drugo snimanje 5 minuta nakon prvog (tirkizno), ponovljeno snimanje osnovnog elektrolita nakon snimanja otopine lijeka i opetovanog snimanja osnovnog elektrolita (plavo)

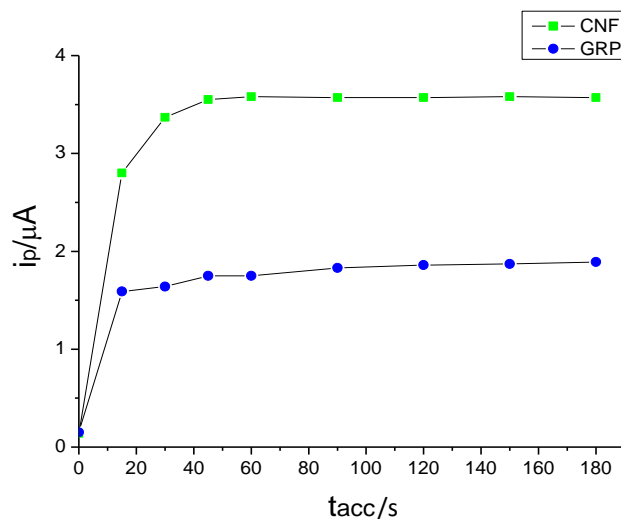


Slika 28. Pravokutnovalni voltamogrami otopine nepafenaka koncentracije  $10^{-5}$  M snimljeni na GCE modificiranoj CNF u 0,3%-tnoj etanolnoj otopini Nafiona: prvo snimanje (crveno), drugo snimanje odmah nakon prvog (plavo), treće snimanje 5 minuta nakon prvog (zeleno)

Iz priloženih cikličkih i pravokutnovalnih voltamograma se može zaključiti kako se lijek adsorbira na površinu elektrode, moguće i utjecajem elektrostatskih interakcija s Nafionom, ukazujući kako se stajanjem u otopini lijeka strujni pik povećava u slučaju svih nanomaterijala. Također, usporedbom dva uzastopna mjerenja strujni pik se smanjuje, što vodi do zaključka kako se lijek s površine elektrode snimanjem „skida“, tj. smanjuje se njegova koncentracija na elektrodi, što potvrđuje tvrdnju o adsorpciji.

Strujni vrh uočen na cikličkim voltamogramima na potencijalu 0,15 V uočen je i na pravokutnovalnim voltamogramima. Strujni vrh je najveći u slučaju snimanja na GCE modificiranoj GRO, zatim CNF, a na GRP je slabo primjetan, što upućuje na najslabiju adsorpciju tvari na GRP. Pretpostavlja se kako je ovaj strujni vrh odgovara oksidacijskom produktu nepafenaka koji se adsorbira na površini modificirane elektrode ili ulazi u moguću kemijsku reakciju s površinom elektrode, sa sulfonskim skupinama Nafiona, a u slučaju grafen oksida i karboksilnim ili epoksidnim skupinama. Nakon opetovanih snimanja u elektrolitu pik se zanemarivo smanjuje što ukazuje na njegovu postojanost na površini elektrode.

Kinetika adsorpcije nepafenaka se proučavala na GCE modificiranoj GRP i CNF tako da se elektroda ostavila u otopini nepafenaka određeno vrijeme, snimio pravokutnovalni voltamogram te se bilježila jakost struje strujnog pika. Grafička ovisnost jakosti struje ( $i_p$ ) o vremenu akumulacije ( $t_{acc}$ ) prikazana je na slici 29.



Slika 29. Prikaz ovisnosti jakosti struje mjerene na GCE modificiranoj GRP i CNF o vremenu akumulacije

Na prikazu je vidljivo kako elektroda modificirana GRP pokazuje ustaljene vrijednosti jakosti struje već nakon 15 sekundi akumulacije, za razliku od elektrode modificirane CNF gdje se vrijednosti jakosti struje ustaljuju nakon 45 sekundi akumulacije. Jakost struje ovisi o adsorbiranom lijeku na površini elektrode, pa se može zaključiti kako se ravnoteža između adsorpcije i desorpcije lijeka s elektrode na GCE modificiranoj GRP uspostavlja brže nego na GCE modificiranoj CNF.

## **5.ZAKLJUČCI**

Rezultati ispitivanja pokazali su kako je elektroda od staklastog ugljika promjera 3 mm dala viši i definiraniji strujni pik oksidacije nepafenaka od ostalih primijenjenih nemodificiranih elektroda. Također, pH 6 osnovnog elektrolita, tj. Britton-Robinson pufera te brzina promjene potencijala od  $100 \frac{\text{mV}}{\text{s}}$  pokazali su se optimalnima za voltametrijska ispitivanja ovog spoja.

Za daljnji razvoj metode je, osim cikličke voltametrije, odabrana i pravokutnovalna voltametrija. Promatralo se ponašanje nepafenaka i analitički odziv promjenom različitih uvjeta metode poput amplitude pulsa, frekvencije i porasta potencijala pulsa. Najprihvatljiviji pik dala su ispitivanja pri postavkama amplitude pulsa od 25 mV, porasta potencijala pulsa od 6 mV te frekvencije od 100 Hz za otopinu analita koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M i 50 Hz za koncentraciju  $1 \times 10^{-5}$  M.

Modifikacijom elektrode s nanomaterijalima u 0,3%-tnoj etanolnoj otopini Nafiona povećava se efektivna površina elektrode i olakšava oksidacija lijeka, što je vidljivo višom jakosti struje i većim pikom uz malu pozadinsku struju, što znači i bolju osjetljivost metode. Od korištenih nanomaterijala, GRP i CNF pokazali su zamjetno veći strujni vrh od GRO, što ih čini boljim kandidatima za daljnja ispitivanja.

Također je uočena pojava adsorpcije samog lijeka i njegovog mogućeg produkta oksidacije na elektrodi modificiranoj nanomaterijalima u Nafionu. Adsorpcija lijeka je usporediva za sva tri nanomaterijala, no veću adsorpciju produkta oksidacije nepafenaka pokazuju GRO i CNF, dok je kod GRP adsorpcija produkta zanemariva, što bi mogao biti kriterij za odabir nanomaterijala u određenim ispitivanjima. Moguće je da produkt oksidacije i reagira s površinom elektrode, vjerojatno sa sulfonskim skupinama Nafiona, jer se nakon opetovanih snimanja elektrode u osnovnom elektrolitu nakon snimanja u otopini nepafenaka pik zanemarivo smanjivao, no trebalo bi provesti daljnja ispitivanja usmjerena na taj problem kako bi se točno utvrdila priroda vezanja.

Uspoređena je i kinetika adsorpcije lijeka na elektrodu modificiranu GRP i CNF u Nafionu. Uočeno je da se na elektrodi s GRP brže uspostavlja ravnoteža između adsorpcije i desorpcije lijeka u usporedbi s elektrodom s CNF.

Dobiveni rezultati pokazali su se zadovoljavajućima te će se razvoj metode nastaviti.

## **6. LITERATURA**

1. 203491Orig1s000CrossR.pdf, URL:  
[https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2012/203491Orig1s000CrossR.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2012/203491Orig1s000CrossR.pdf), pristupljeno 3.1.2018.
2. BASi® | Cyclic Voltammetry – Data Analysis,  
URL:[https://www.basinc.com/manuals/EC\\_epsilon/Techniques/CycVolt/cv\\_analysis](https://www.basinc.com/manuals/EC_epsilon/Techniques/CycVolt/cv_analysis), pristupljeno 17.12.2017.
3. Bonaccorso F, Lombardo A, Hasan Z, Sun Z, Colombo L, Ferrari AC. Production and processing of graphene and 2d crystals. *Mater Today*, 2012, 15(12), 564-589.
4. Buzea C, Pacheco II, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, 2007, 2(4), MR17-MR71.
5. de Oliveira MF, Oiyee EN, Muzetti Ribeiro MF, Toya Katayama JM. A simple and Fast Analysis of LSD By Cyclic Voltammetry in Aqueous Medium. *ECS Meet Abstr*, 2017, 48, 2089
6. Deroco PB, Vicentini FC, Oliveira GG, Rocha-Filho RC, Fatibello-Filho O. Square-wave voltammetric determination of hydroxychloroquine in pharmaceutical and synthetic urine samples using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode. *J Electroanal Chem*, 2014, 718, 19-23.
7. European Pharmacopoeia. 9<sup>th</sup> Ed. Strasbourg, Council of Europe, 2017, str. 2646 i 2791.
8. Fitzer E, Kochling KH, Boehm HP, Marsh H. Recommended terminology for the description of carbon as a solid (IUPAC Recommendations). *Pure Appl Chem*, 1995, 67(3), 473-506.
9. Geim AK. Graphene: Status and Prospects. *Science*, 2009, 324(5934), 1530-1534.
10. GNs KNG-150 | Knano Graphene Technology, URL:  
<http://www.knano.com.cn/En/product.aspx?IntroCateID=1667>, pristupljeno 15. 1. 2018.
11. Graphene, URL: <https://cnx.org/contents/eQus82US@4/Graphene>, pristupljeno 5.1.2018.
12. Guadagno L, Raimondo M, Vittoria V, Vertuccio L, Lafdi K, De Vivo B, Lamberti P, Spinelli G, Tucci V. The role of carbon nanofiber defects on the electrical and mechanical properties of CNF-based resins. *Nanotechnology*, 2013, 24(30), 1-10.
13. Hoffman AF, Spivak CE, Lupica CR. Enhanced Dopamine Release by Dopamine Transport Inhibitors Described by a Restricted Diffusion Model and Fast-Scan Cyclic Voltammetry. *ACS Chem Neurosci*, 2016, 7(6), 700-709.



14. Hübler AW, Osuagwu O. Digital quantum batteries: Energy and information storage in nanovacuum tube arrays. *Complexity*, 2010, 15(5), 48-55.
15. Hussam A. Voltammetry: Dynamic electrochemical techniques. U: Modern Instrumental Analysis, Volume 47, 1<sup>st</sup> Ed. Ahuja S, Jespersen N, urednici, Amsterdam, Elsevier Science, 2006, 661-689
16. Jenkins GM, Kawamura K. Structure of Glassy Carbon. *Nature*, 1971, 231, 175-176.
17. Jiang K, Xin S, Lee JS, Kim J, Xiao X, Guo YG. Improved kinetics of LiNi<sub>1/3</sub>Mn<sub>1/3</sub>Co<sub>1/3</sub>O<sub>2</sub> cathode material through reduced graphene oxide networks. *Phys Chem Chem Phys*, 2012, 14, 2934-2939.
18. Kounaves S. Voltammetric techniques. U: Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry. Settle F, urednik, Upper Saddle River, New Jersey, Prentice Hall PTR, 1997, str. 709-725.
19. Lourenção BC, Medeiros RA, Rocha-Filho RC, Mazo LH, Fatibello-Filho O. Simultaneous voltammetric determination of paracetamol and caffeine in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode. *Talanta*, 2009, 78(3), 748-752.
20. Microsoft Word – Cyclic Voltammetry.docx, URL:  
[http://courses.chem.indiana.edu/a315/documents/CVhandout\\_000.pdf](http://courses.chem.indiana.edu/a315/documents/CVhandout_000.pdf), pristupljeno 9.10.2017.
21. Microsoft Word – Nepafenac monograph 7-06-Final \_posted 08-30-06\_.doc. URL:  
<https://www.pbm.va.gov/PBM/clinicalguidance/drugmonographs/Nepafenac.pdf>, pristupljeno 24.9.2017.
22. Nevanac – Baza lijekova | Lijekovi .: HALMED. URL:  
<http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Nevanac/9799/>, pristupljeno 28.9.2017.
23. Nevanac – FDA prescribing information, side effects and uses. URL:  
<https://www.drugs.com/pro/nevanac.html>, pristupljeno 24.9.2017.
24. Nevanac, INN-Nepafenac. URL:  
[http://www.ema.europa.eu/docs/hr\\_HR/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000818/WC500027158.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/hr_HR/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000818/WC500027158.pdf), pristupljeno 23.9.2017.
25. Newair EF, Abdel-Hamid R, Kilmartin PA. Electrochemical Determination of the Antioxidant Activity in *Echinacea Purpurea* Roots Using Square Wave Voltammetry. *Electroanalysis*, 2017, 29(4), 1131-1140.
26. Nigović B, Behetić S. Elektroanalitika u farmaciji. *Farm Glas*, 2007, 63, 163-175.

27. Nigović B, Marušić M, Jurić S. A highly sensitive method for determination of b-blocker drugs using a Nafion-coated glassy carbon electrode. *J Electroanal Chem*, 2011, 663, 72-78.
28. Nigović B. Application of electrochemistry to the analysis of pharmaceuticals and biological samples. U: *The Analysis of Pharmacologically Active Compounds and Biomolecules in Real Samples*. Injac R, urednik, Kerala, Transworld Research Network, 2009, str. 1-45
29. Norouzi P, Qomi M, Nemati A, Ganjali MR. Determination of Anti Colon Cancer Drug, Irinotecan by Fast Fourier Transforms Continuous Cyclic Voltammetry. *Int J Electrochem Sci*, 2009, 4, 1248-1261.
30. Novoselov KS, Geim AK, Morozov SV, Jiang D, Zhang Y, Dubonos SV, Grigorieva IV, Firsov AA. Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films. *Science*, 2004, 306(5696), 666-669.
31. Petrovic SC. Cyclic Voltammetry of Hexachloroiridate(IV): An Alternative to the Electrochemical Study of the Ferricyanide Ion. *Chem Educ*, 2000, 5, 231-235.
32. Piljac I. Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, 2010, str. 391-436.
33. Poveda RL, Gupta N. Carbon nanofiber reinforced polymer composites. New York City, Springer, 2016, str. 12.
34. Qin DA, Cai XQ, Miao Q, Wang ZH, Hu ML. Cyclic Voltammetry and Molecular Docking Study of the Interactions of Two Derivatives of 5-fluorouracil with DNA. *Int J Electrochem Sci*, 2014, 9, 1608-1620.
35. Rodrigues Filho G, Almeida F, Ribeiro SD, Thiago FT, Muñoz RAA, Assunção RMN, Barud H. Controlled release of drugs from cellulose acetate matrices produced from sugarcane bagasse: monitoring by square-wave voltammetry. *Drug Dev Ind Pharm*, 2016, 42(7), 1066-1072.
36. Shao Y, Wang J, Wu H, Liu J, Aksay IA, Lin Y. Graphene based electrochemical sensors and biosensors: A review. *Electroanalysis*, 2010, 22(10), 1027-1036.
37. Souza CD, Braga OC, Vieira IC, Spinelli A. Electroanalytical determination of sulfadiazine and sulfamethoxazole in pharmaceuticals using a boron-doped diamond electrode. *Sens Actuator B-Chem*, 2008, 135(1), str. 66-73.
38. Types of Graphene | The Home of Graphene | The University of Manchester, URL:<http://www.graphene.manchester.ac.uk/collaborate/types-of-graphene/>, pristupljeno 28.12.2017.

39. Uslu B, Ozkan SA. Electroanalytical Methods for the Determination of Pharmaceuticals: A Review of Recent Trends and Developments. *Anal Lett*, 2011, 44(16), 2644-2702.
40. Wang J. Analytical electrochemistry. 3. Izdanje. Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons, Inc., 2006, str. 29-82.
41. Yoo EH, Lee SY. Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice. *Sensors*, 2010, 10(5), 4558-4576.

## **7. SAŽETAK/SUMMARY**

## 7.1. SAŽETAK

Nepafenak je noviji nesteroidni protuupalni analgetik, inhibitor ciklooksigenaze. Indikacije za ovaj lijek su prevencija i liječenje postoperativne boli i upale povezane s operacijom katarakte te smanjenje rizika od postoperativnog makularnog edema povezanog s operacijom katarakte kod bolesnika s dijabetesom.

U ovom radu ispitivana su elektrokemijska svojstva nepafenaka uporabom tehnika cikličke i pravokutnovalne voltometrije u elektrolitima različitih pH te na različitim elektrodama uz modifikaciju površina elektroda nanomaterijalima. Cilj rada bio je proučiti elektrokemijsko ponašanje nepafenaka na različitim elektrodama i utvrditi mogu li dobiveni rezultati poslužiti za razvoj analitičke metode za određivanje spoja.

Snimanjem cikličkih voltagrama utvrđeno je kako je pH 6 osnovnog elektrolita, tj. BR pufera najpovoljniji za intenzitet oksidacijskog pika nepafenaka, koji se javlja na potencijalu oko 0,80 V. Također je utvrđeno kako je proces oksidacije ireverzibilan. Od različitih elektroda, najveću osjetljivost uz najmanji utjecaj pozadinske struje pokazala je elektroda od staklastog ugljika promjera 3 mm. Modifikacijom površine elektrode od staklastog ugljika suspenzijama različitih nanomaterijala u 0,3%-tnoj etanolnoj otopini Nafiona postiže se veći intenzitet pika lijeka, što znači veću osjetljivost metode. Pik oksidacije nepafenaka porastao je 3 puta u odnosu na nemođificiranu elektrodu u slučaju ugljikovih nanovlakana i grafen nanopločica, dok je kod grafen oksida porast bio nešto manji.

Snimanjem pravokutnovalnih voltagrama zamijećena je adsorpcija lijeka te njegovog produkta oksidacije na elektrodi modificiranoj nanomaterijalima. Pik oksidacijskog produkta javlja se na potencijalu od 0,15 V i nakon snimanja u puferu, što upućuje na jaku adsorpciju ili potencijalnu kemijsku reakciju s površinom elektrode. Adsorpcija lijeka se javlja u slučaju sva tri nanomaterijala, no adsorpcija oksidacijskog produkta značajno je manja u slučaju grafen nanopločica. Ispitivanjem kinetike adsorpcije utvrđeno je kako se adsorpcijsko-desorpcijska ravnoteža brže uspostavlja na elektrodi modificiranoj grafen nanopločicama nego onoj modificiranoj ugljikovim nanovlaknima.

## 7.1. SUMMARY

Nepafenac is a novel non-steroidal anti-inflammatory analgesic, cyclooxygenase inhibitor. Its therapeutic indications are prevention and treatment of postoperative pain and inflammation associated with cataract surgery and reduction in the risk of postoperative macular oedema associated with cataract surgery in diabetic patients.

In this thesis, the electrochemical properties of nepafenac in electrolytes of various pH and on various electrodes with nanomaterial-modified surfaces were investigated by the use of cyclic and square-wave voltammetry. The goal of this thesis was to look into the electrochemical behaviour of nepafenac on various electrodes and to ascertain if the gathered results might prove useful in the development of an analytical method for the identification and quantification of the drug.

Cyclic voltammetry measurements have established that the pH of 6 of the supporting electrolyte, that is, BR buffer, is the most efficient for the nepafenac oxidation peak intensity, which is seen at the potential of 0,80 V. Moreover, it has been proven that the oxidation process is irreversible. Out of various electrodes, a 3 mm-diameter glassy carbon electrode has shown the highest sensitivity with the least impact of the background current. By modifying the surface of the glassy carbon electrode with suspensions of various nanomaterials in 0,3% ethanolic solution of Nafion, higher drug peak intensity is achieved, which leads to higher sensitivity of the method. By using carbon nanofibers and graphene nanoplatelets, the nepafenac oxidation peak increases threefold compared to the nonmodified electrode, whereas by using graphene oxide there is less increase compared to the other two nanomaterials.

Square-wave voltammetry scans have shown adsorption of the drug and its oxidation product on the surface of the nanomaterial-modified electrodes. The peak of the oxidation product is observed on the potential of 0,15 V even after scanning the electrode in the buffer, which implies strong adsorption or a possible chemical reaction with the surface of the electrode. Adsorption of the drug occurs in all three nanomaterials, but the adsorption of the oxidation product is significantly lesser on graphene nanoplatelets. In regard to adsorption kinetics, the adsorption-desorption equilibrium is established more rapidly on the electrode modified with graphene nanoplatelets than on the one modified with carbon nanofibers.

# 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

## Oksidacija i adsorpcija nepafenaka na površini elektrode modificirane različitim nanomaterijalima

Edvin Brusač

### SAŽETAK

Nepafenak je noviji nesteroidni protuupalni analgetik, inhibitor ciklooksigenaze. Indikacije za ovaj lijek su prevencija i liječenje postoperativne boli i upale povezane s operacijom katarakte te smanjenje rizika od postoperativnog makularnog edema povezanog s operacijom katarakte kod bolesnika s dijabetesom.

U ovom radu ispitivana su elektrokemijska svojstva nepafenaka uporabom tehnika cikličke i pravokutnovalne voltametrije u elektrolitima različitih pH te na različitim elektrodama uz modifikaciju površina elektroda nanomaterijalima. Cilj rada bio je proučiti elektrokemijsko ponašanje nepafenaka na različitim elektrodama i utvrditi mogu li dobiveni rezultati poslužiti za razvoj analitičke metode za određivanje spoja.

Snimanjem cikličkih voltamograma utvrđeno je kako je pH 6 osnovnog elektrolita, tj. BR pufera najpovoljniji za intenzitet oksidacijskog pika nepafenaka, koji se javlja na potencijalu oko 0,80 V. Također je utvrđeno kako je proces oksidacije ireverzibilan. Od različitih elektroda, najveću osjetljivost uz najmanji utjecaj pozadinske struje pokazala je elektroda od staklastog ugljika promjera 3 mm. Modifikacijom površine elektrode od staklastog ugljika suspenzijama različitih nanomaterijala u 0,3%-tnoj etanolnoj otopini Nafiona postiže se veći intenzitet pika lijeka, što znači veću osjetljivost metode. Pik oksidacije nepafenaka porastao je 3 puta u odnosu na nemođificiranu elektrodu u slučaju ugljikovih nanovlakana i grafen nanopločica, dok je kod grafen oksida porast bio nešto manji.

Snimanjem pravokutnovalnih voltamograma zamijećena je adsorpcija lijeka te njegovog produkta oksidacije na elektrodi modificiranoj nanomaterijalima. Pik oksidacijskog produkta javlja se na potencijalu od 0,15 V i nakon snimanja u puferu, što upućuje na jaku adsorpciju ili potencijalnu kemijsku reakciju s površinom elektrode. Adsorpcija lijeka se javlja u slučaju sva tri nanomaterijala, no adsorpcija oksidacijskog produkta značajno je manja u slučaju grafen nanopločica. Ispitivanjem kinetike adsorpcije utvrđeno je kako se adsorpcijsko-desorpcijska ravnoteža brže uspostavlja na elektrodi modificiranoj grafen nanopločicama nego onoj modificiranoj ugljikovim nanovlaknima.

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

Rad sadrži: 48 stranica, 29 grafičkih prikaza, 1 tablicu i 41 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: nepafenak, ciklička voltametrija, pravokutnovalna voltametrija, elektroda modificirana nanomaterijalima

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Biljana Nigović**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Ana Mornar Turk**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Sandra Jurić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: svibanj 2018.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### Oxidation and adsorption of nepafenac on nanomaterial-modified electrode surfaces

Edvin Brusač

#### SUMMARY

Nepafenac is a novel non-steroidal anti-inflammatory analgesic, cyclooxygenase inhibitor. Its therapeutic indications are prevention and treatment of postoperative pain and inflammation associated with cataract surgery and reduction in the risk of postoperative macular oedema associated with cataract surgery in diabetic patients.

In this thesis, the electrochemical properties of nepafenac in electrolytes of various pH and on various electrodes with nanomaterial-modified surfaces were investigated by the use of cyclic and square-wave voltammetry. The goal of this thesis was to look into the electrochemical behaviour of nepafenac on various electrodes and to ascertain if the gathered results might prove useful in the development of an analytical method for the identification and quantification of the drug.

Cyclic voltammetry measurements have established that the pH of 6 of the supporting electrolyte, that is, BR buffer, is the most efficient for the nepafenac oxidation peak intensity, which is seen at the potential of 0,80 V. Moreover, it has been proven that the oxidation process is irreversible. Out of various electrodes, a 3 mm-diameter glassy carbon electrode has shown the highest sensitivity with the least impact of the background current. By modifying the surface of the glassy carbon electrode with suspensions of various nanomaterials in 0,3% ethanolic solution of Nafion, higher drug peak intensity is achieved, which leads to higher sensitivity of the method. By using carbon nanofibers and graphene nanoplatelets, the nepafenac oxidation peak increases threefold compared to the nonmodified electrode, whereas by using graphene oxide there is less increase compared to the other two nanomaterials.

Square-wave voltammetry scans have shown adsorption of the drug and its oxidation product on the surface of the nanomaterial-modified electrodes. The peak of the oxidation product is observed on the potential of 0,15 V even after scanning the electrode in the buffer, which implies strong adsorption or a possible chemical reaction with the surface of the electrode. Adsorption of the drug occurs in all three nanomaterials, but the adsorption of the oxidation product is significantly lesser on graphene nanoplatelets. In regard to adsorption kinetics, the adsorption-desorption equilibrium is established more rapidly on the electrode modified with graphene nanoplatelets than on the one modified with carbon nanofibers.

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

Thesis includes: 48 pages, 29 figures, 1 table and 41 references. Original is in Croatian language.

Keywords: nepafenac, cyclic voltammetry, square-wave voltammetry, nanomaterial-modified electrode

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  
**Ana Mornar Turk, Ph.D.** *Associate 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: May 2018.