

Utjecaj modifikacija površine elektrode nanomaterijalom na voltametrijski odgovor lovastatina i nebivolola

Kujundžić, Nuša

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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:163:125257>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-27**



Repository / Repozitorij:

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



Nuša Kujundžić

**Utjecaj modifikacija površine elektrode
nanomaterijalom na voltametrijski odgovor
lovastatina i nebivolola**

DIPLOMSKI RAD

Predan Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Analitika lijekova 2 Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i izrađen na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Biljane Nigović.

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Biljani Nigović na stručnom vodstvu, pomoći, savjetima i utrošenom vremenu pri izradi ovog rada, te svim djelatnicima Zavoda za analitiku i kontrolu lijekova za ugodnu radnu atmosferu tijekom izrade ovog rada.

1. UVOD	1
1.1. LOVASTATIN	2
1.2. NEBIVOLOL	4
1.3. ELEKTROANALITIČKE METODE	6
1.3.1. Ciklička voltometrija	7
1.3.2. Diferencijalna pulsna voltometrija	10
1.4. KRUTE ELEKTRODE	11
1.4.1. Elektroda od staklastog ugljika	11
1.5. MODIFIKACIJE POVRŠINE ELEKTRODE	12
1.5.1. Grafen	13
1.5.2. Ugljikove nanocjevčice	15
1.5.3. Nafion	17
1.5.4. Bizmutove nanočestice	18
2. OBRAZLOŽENJE TEME	20
3. MATERIJALI I METODE	22
3.1. KEMIKALIJE	23
3.2. RADNI INSTRUMENTI	23
3.3. UVJETI MJERENJA	24
3.5. PRIPREMA OTOPINA	25
3.5.1. Otopina lovastatina	25
3.5.2. Otopina neбиволла	25
3.5.3. Otopina Britton-Robinson pufera	25
3.5.4. Suspenzija grafena u 0.1% - tnoj otopini Nafiona u etanolu	25
3.5.5. Suspenzija grafena u etanolu	26
3.5.6. Suspenzija ugljikovih nanocjevčica 0.3% - tnoj otopini Nafiona u etanolu	26
3.5.7. Suspenzija nanočestica bizmuta u 0.1% - tnoj otopini Nafiona u etanolu	26

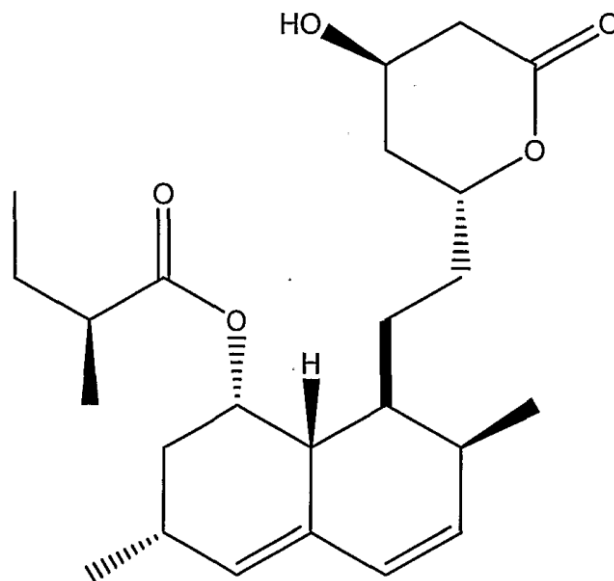
3.5.8. Smjesa ugljikovih nanocjevčica i bizmutovih nanočestica u 0.1% - tnoj otopini	
Nafiona u etanolu	26
4. REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1. LOVASTATIN	28
4.2. NEBIVOLOL	39
5. ZAKLJUČAK	46
6. LITERATURA	47
7. SAŽETAK / SUMMARY	50
7.1. Sažetak	51
7.2. Summary	52
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD	53

1. UVOD

1.1. LOVASTATIN

Lovastatin, [(1S, 3R, 7S, 8S, 8aR)-8-[2-[(2R,4R)-4-hidroksi-6-oksosan-2-il]etil]-3,7-dimetil-1,2,3,7,8,8a-heksahidronaftalen-1-il] (2S)-2-metilbutanoat, je hipolipemik iz skupine kompetitivnih inhibitora HMG-CoA reduktaze, statina (Slika 1.). Empirijska formula je $C_{24}H_{36}O_5$, a molarna masa 404.55 g/mol (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

Lovastatin se koristi za snižavanje „lošeg“ kolesterola (LDL-C) i povišenje „dobrog“ kolesterola (HDL) (<http://www.webmd.com>). Povišene koncentracije LDL-a (lipoproteina niske gustoće) i snižene koncentracije HDL-a (lipoproteina visoke gustoće) uzroci su koronarne bolesti srca. Poznato je da je hiperlipidemija, uz neodgovarajuće životne navike kao što su nezdrava prehrana, pušenje i nedovoljno tjelesne aktivnosti, jedan od glavnih rizičnih čimbenika za razvoj bolesti kardiovaskularnog sustava, ateroskleroze, srčanog udara i moždanog infarkta.



Slika 1. Struktura lovastatina (<http://pubs.acs.org>)

Lovastatin je 1978. izoliran iz plijesni *Aspergillus terreus* (Merck). Danas se koristi kao oralni hipolipemik. Lovastatin je laktonski prolijek koji se u gastrointestinalnom traktu hidrolizira nespecifičnim karboksijesterazama u aktivnu β -hidroksi kiselinu (Nigović i sur., 2007.).

Mehanizam djelovanja lovastatina je dvojak; kao inhibitor HMG-CoA reduktaze (3-hidroksi-3-metil-glutaril koenzim A reduktaze) inhibira rani i limitirajući korak u sintezi kolesterola te

posljedično uzrokuje snižavanje koncentracije VLDL-a te indukcijom visokoafinitetnih receptora za LDL, koji ga unose u stanice, čime je ukupni katabolizam LDL-a pojačan, a koncentracija LDL-a snižena.

Oko 30% primjenjene doze lovastatina se apsorbira, a značajno se metabolizira prvim prolaskom kroz jetru pa se tek 5% doze pojavi u sistemske cirkulaciji u aktivnom obliku. Vršna plazmatska koncentracija je dosegnuta nakon 2 sata. Selektivan je za jetru te tamo postiže više koncentracije nego u ostalim tkivima, što je pozitivna karakteristika jer se glavna sinteza endogenog kolesterola događa u jetri. Snažno se veže za proteine plazme (>95%). Metabolizira se enzimima citokroma P450, i to izoformom 3A4 te je i supstrat različitih transportnih proteina, što znači potencijalne interakcije s drugim ksenobioticima. Eliminira se putem žuči (83% primjenjene doze fecesom, 10% urinom). Preporuka je uzimati lovastatin uz obrok, i to navečer kada je sinteza endogenog kolesterola najintenzivnija.

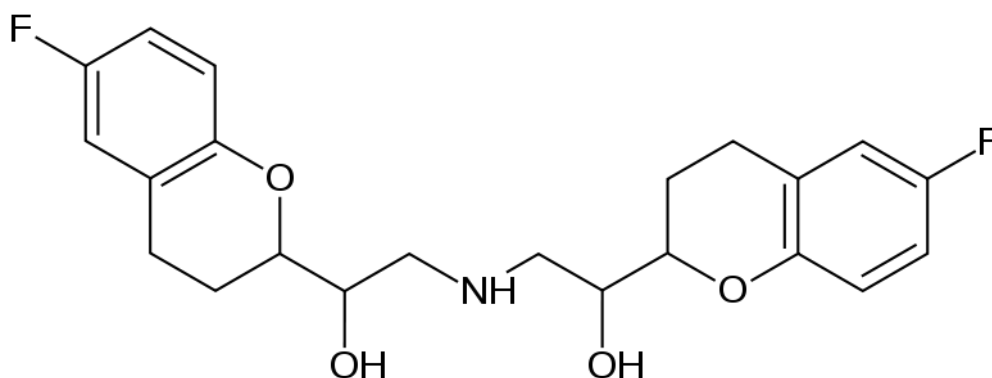
Lovastatin je bio ranije registriran u Republici Hrvatskoj, no povučen je s tržišta. Danas je dostupan u obliku preparata koji spadaju u skupinu dodataka prehrani, a koji sadrže crvenu rižu dobivenu fermentacijom pomoću kvasca *Monascus purpureus*.

1.2. NEBIVOLOL

Nebivolol, 1-(6-fluoro-3,4-dihidro-2H-kromen-2-il)-2-[[2-(6-fluoro-3,4-dihidro-2H-kromen-2-il)-2-hidroksietil]amino]etanol, je najkardioselektivniji antihipertenziv iz skupine antagonista β 1-receptora (treća generacija β -blokatora). Empirijska formula je $C_{22}H_{25}F_2NO_4$, a molarna masa 405.44 g/mol. Nebivolol dolazi u obliku racemata dvaju enantiomera, L-nebivolola i D-nebivolola (Slika 2.), s različitim farmakološkim funkcijama (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

Nebivolol se koristi za liječenje esencijalne hipertenzije, kroničnog zatajenja srca, aritmija i angine pectoris, a za razliku od ostalih β -blokatora ima jedinstven hemodinamski profil. Jedini je β -blokator koji smanjuje volumno opterećenje srca i tlačno opterećenje. Također, ima sposobnost obnove endotelne funkcije (i antiproliferativno djelovanje). Važno je napomenuti da se vazodilatacija ne odvija preko blokade α -receptora; D-nebivolol je visokoselektivan β 1-antagonist, dok njegov L-izomer uzrokuje vazodilataciju (povećanjem sinteze NO u endotelu, indukcijom sintaze dušikovog oksida, NOS) (www.plivamed.net).

Nebivolol se nakon peroralne primjene brzo apsorbira neovisno o hrani. Jako je lipofilan, što je važno zbog samog mjesta djelovanja, lipofilniji spoj ima duže trajanje aktivnosti i sporije se eliminira iz tkiva (zbog ovakvog svojstva primjenjuje se jednom dnevno). Poluvijek života u plazmi je 22 sata. Značajno se metabolizira u jetri (enzimom CYP2D6) i ima aktivne metabolite.



Slika 2. Struktura nebivolola (<http://www.chemicalbook.com>)

Liječenje bolesnika nebivololom dovodi do poboljšanja kvalitete života, smanjenja kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta. U Republici Hrvatskoj je registriran pod imenima Nebilet 5 mg tablete, Nebilet Plus 5 mg/ 12.5 mg filmom obložene tablete (kombinacija s hidroklorotiazidom), Nebilet Plus 5 mg/ 25 mg filmom obložene tablete (kombinacija s hidroklorotiazidom), Nebivolol Pliva 5 mg tablete, Nebyol 5 mg tablete, Nibel 5 mg tablete, Vibolol 5 mg tablete i Volone 5 mg tablete (www.halmed.hr).

1.3. ELEKTROANALITIČKE METODE

Elektroanalitičke metode u međudnos dovode električnu struju i kemiju te se široko primjenjuje u industriji i znanosti, a između ostalog i u farmaciji. Upravo zbog jedne od glavnih prednosti elektroanalitičkih metoda, a to je izravno određivanje bez prethodno provedenog odjeljivanja, u farmaciji se koriste u ranim fazama istraživanja i razvoja lijekova, ali i za identifikaciju i određivanje u različitim uzorcima (ljekoviti oblici, farmaceutske sirovine, biološke tekućine).

Elektroanalitičke metode 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. Visoke su osjetljivosti, točnosti i preciznosti (Nigović i Behetić, 2007.).

Istraživačima je dostupan veliki broj različitih tehnika za proučavanje elektrokemijskih svojstava elektroaktivnih specija u otopini. To su naprimjer ciklička voltametrija, diferencijalna pulsna voltametrija, pravokutnovalna voltametrija, kronoamperometrija, linearna sweep voltametrija i stripping voltametrija.

Sve navedene tehnike moguće je posebno optimirati kako bi se dobili najbolji mogući elektrokemijski odgovori. Utjecaj imaju različiti faktori, poput prirode analita, izbora elektrode i elektrolita. Također jak utjecaj imaju veličina i morfologija elektrode, kao i sam proces njihove proizvodnje.

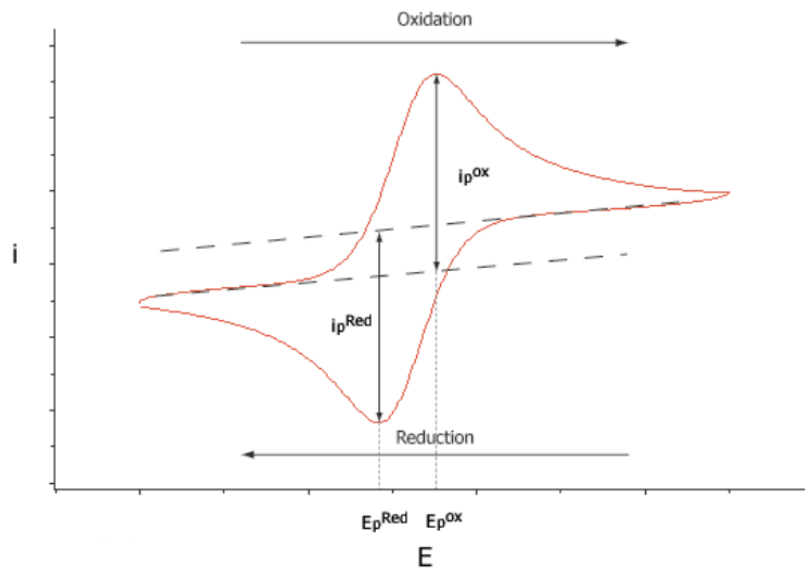
U odnosu na druge metode detekcije kao što su kromatografija, luminescencija i spektroskopija, elektroanalitičke tehnike su znatno jeftinije, lakše za korištenje, visoke točnosti i pouzdanosti (Campbell i Compton, 2010.).

1.3.1. Ciklička voltametrija

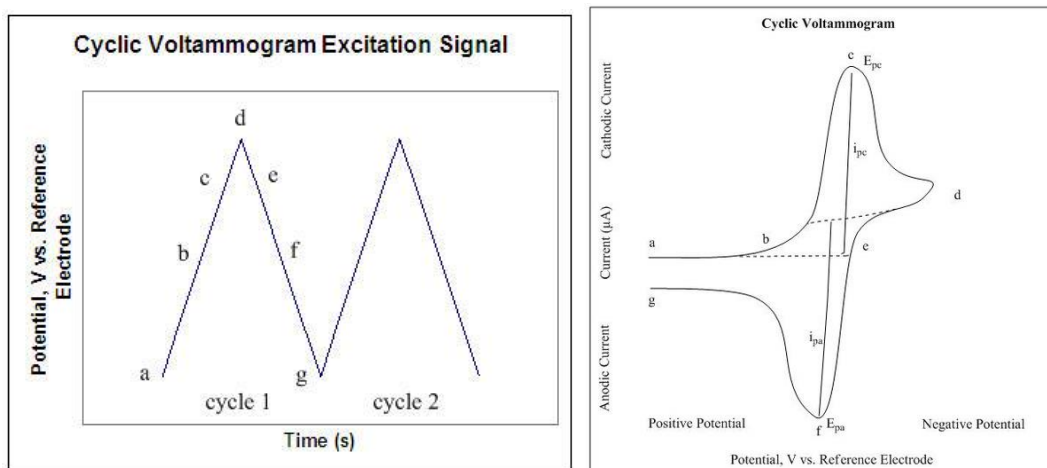
Ciklička voltametrija (engl. Cyclic voltammetry, CV) je najšire korištena elektroanalitička metoda za dobivanje kvalitativnih informacija o redoks procesu, također, to je često i prvi eksperiment koji se provodi u elektroanalitičkoj studiji (Wang, 2010.).

Koristi se za istraživanje kinetike i mehanizma redoks reakcija, određivanje redoks potencijala i broja izmijenjenih elektrona, istraživanje adsorpcijskih procesa i kemijskih reakcija koje prethode ili slijede prijenos elektrona (Nigović i Behetić, 2007.).

Potencijal radne elektrode mijenja se linearno, a kada dosegne određenu vrijednost, mijenja se smjer promjene potencijala, do povratka potencijala na početnu vrijednost (Slika 3. i Slika 4.). Pritom se mjeri struja koja protječe kroz članak (radnu elektrodu). Jakost struje raste kako se potencijal približava redoks potencijalu analita – promjenom potencijala preko karakterističnog potencijala redoks procesa nastaje strujni vrh, a nakon toga dolazi do pada jakosti struje zbog smanjenja koncentracije analita u blizini elektrode. Povratkom potencijala na početnu vrijednost dolazi do oksidacije ili redukcije produkata koji su nastali u prvoj polovici ciklusa.



Slika 3. Općeniti prikaz cikličkog voltamograma (<http://wiki.edaq.com>)



Slika 4. Promjena potencijala u cikličkoj voltametriji

(<http://chemwiki.ucdavis.edu/>)

Važni parametri u cikličkoj voltametriji su vršni potencijali (E_{pc} – vrh redukcije, E_{pa} – vrh oksidacije) te vršne jakosti struje (i_{pc} (katoda), i_{pa} (anoda)). Ako je proces prijenosa elektrona brz u odnosu na druge procese (npr. difuziju), reakcija se smatra elektrokemijski reverzibilnom, a razlika pikova je :

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

ΔE_p je razlika između potencijala vrha redukcije i vrha oksidacije, R je opća plinska konstanta ($R = 8.314\ 472\ \text{J K}^{-1}\ \text{mol}^{-1}$), T je apsolutna temperatura, n je broj izmijenjenih elektrona, dok je F Faradayeva konstanta $F = 96485.3365(21)\ \text{C mol}^{-1}$.

Za reverzibilnu redoks reakciju pri 25°C s n elektrona, ΔE_p je $0.0592/n$ V, odnosno oko 60 mV po pojedinom elektronu (Slika 5.). U praksi je teško postići ovu vrijednost zbog nekih čimbenika kao što je otpor ćelije. Kod reverzibilne reakcije, koncentracija je povezana s vršnom jakosti struje preko Randles-Ševčikove jednadžbe:

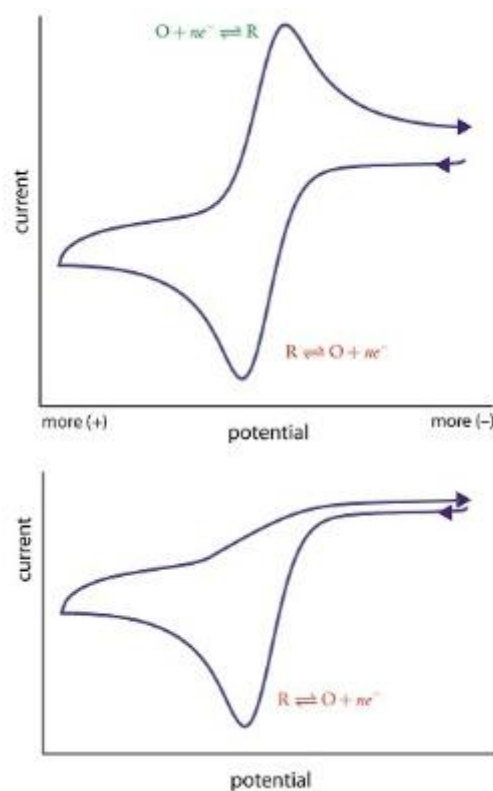
$$i_p = (2,69 \times 10^5) n^{\frac{3}{2}} A c_0 D^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}}$$

gdje je i_p vršna jaskost struje u amperima, A je površina elektrode u cm^2 , D difuzijski koeficijent u cm^2/s , c_0 koncentracija otopine u mol/cm^3 , v brzina promjene potencijala V/s, a n broj elektrona. (Wang, 2000.)

Ukoliko je proces prijenosa elektrona ireverzibilan (karakteriziran je sporom izmjenom elektrona) pikovi su manje veličine i razdvojeniji (Slika 5.). Vršna jakost struje definirana je sljedećom jednačbom:

$$i_p = (2.99 \times 10^5) n(\alpha n_a)^{\frac{1}{2}} A C D^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}}$$

gdje je n_a broj elektrona u koraku prijenosa naboja, a α koeficijent prijenosa. Vršna jakost struje je i dalje proporcionalna koncentraciji ali je visina pika niža.



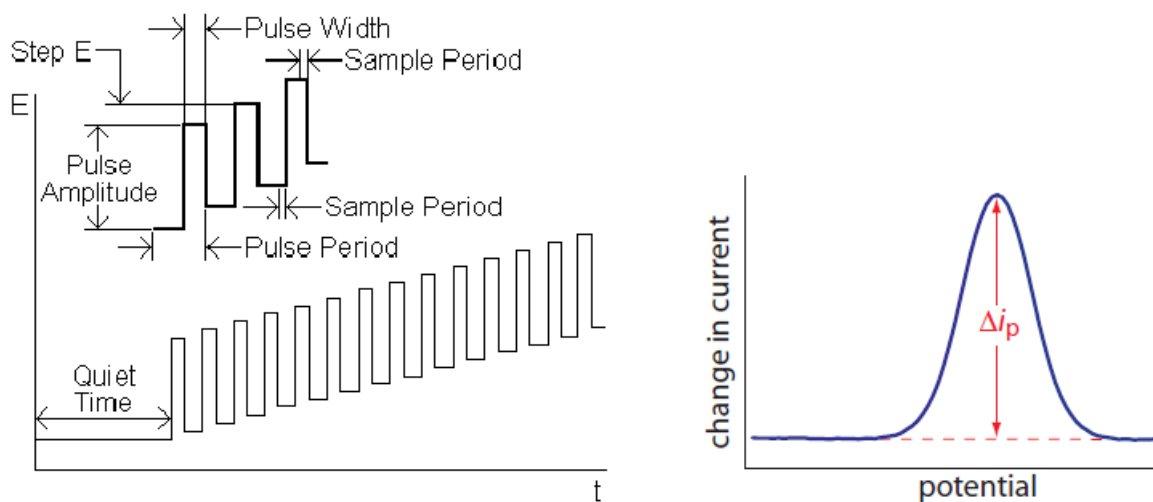
Slika 5. Općeniti prikaz reverzibilnog i ireverzibilnog elektrokemijskog procesa

Ciklička voltometrija se rijetko koristi za kvantitativne analize lijekova zbog niskih granica detekcije 10^{-5} do 10^{-6} M (Nigović i Behetić, 2007.).

1.3.2. Diferencijalna pulsna voltometrija

Diferencijalna pulsna voltometrija (Differential Pulse Voltammetry, DPV) je vrlo osjetljiva tehnika (granica detekcije 10^{-8} M) pogodna za određivanje vrlo niskih koncentracija elektroaktivnih komponenata u različitim biološkim uzorcima (Nigović i Behetić, 2007.).

Tijekom analize, primjenjuje se serija pulseva definirane amplitude (10 do 100 mV) na bazni potencijal koji se linearno mijenja (Slika 6.). Struja se mjeri za svaki puls dva puta; prvi puta netom prije primjene pulsa i drugi put na kraju pulsa (Wang, 2000.). Razlika vrijednosti izmjerenih struja je funkcija primjenjenih potencijala. Voltamogrami koji se dobiju nakon ovakvih mjerenja imaju jasne pikove čija je visina izravno proporcionalna koncentraciji mjenjenog analita (Slika 6.).



Slika 6. Promjena potencijala i izgled voltamograma u diferencijalnoj pulsnoj voltometriji (<http://chemwiki.ucdavis.edu>)

1.4. KRUTE ELEKTRODE

1.4.1. Elektroda od staklastog ugljika

Elektroda od staklastog ugljika (engl. Glassy Carbon Electrode, GCE) je vrlo popularna upravo zbog svojih izvanrednih mehaničkih i električnih svojstava, širokog raspona potencijala, kemijske inertnosti (otpornost na otapala) i relativno reproducibilnih rezultata. Osim navedenog, staklasti ugljik odlikuje niska brzina oksidacije i niska permeabilnost za plinove i tekućine. (Dekanski i sur., 2001.)

Staklasti ugljik se priprema pažljivo kontroliranim zagrijavanjem fenol-formaldehid polimera u internoj atmosferi. Takav proces karbonizacije se izvodi vrlo polagano u temperaturnom rasponu od 300° do 1200° C osiguravajući na taj način potpunu eliminaciju kisika, dušika i vodika. No, valja napomenuti da odabir početnog polimera i temperature karbonizacije ima veliku ulogu u krajnjim svojstvima staklastog ugljika (Dekanski i sur., 2001.). Samu strukturu staklastog ugljika čine tanke zamršene vrpce poprečno povezanih pločica poput grafita. Zbog visoke gustoće i malih pora materijala nije potrebno vršiti impregnaciju, međutim, najčešće se vrši predobrada površine da bi se osigurala aktivirana i reproducibilna GCE te da bi se uvećala analitička učinkovitost. Takva predobrada se vrši poliranjem elektrode aluminijskim česticama (veličine manje od 0.05 μm) na tkanini za poliranje. Također, elektroda se može aktivirati elektrokemijski, kemijski, laserski ili toplinski. Poboljšana elektron prenoseća reaktivnost dolazi od uklanjanja površinskih onečišćenja, izlaganja novih ugljikovih rubova i povećanje gustoće površinskih kisikovih grupa (Wang, 2010.). Pokazano je da u usporedbi s mehanički predobrađenom površinom, ona koja je elektrokemijski predobrađena ima višu aktivnost. (Dekanski i sur., 2001.)

Danas se GCE široko primjenjuje u biomedicinskim istraživanjima, a površina se vrlo lako modificira. Elektroda od staklastog ugljika bez ili s obrađenom površinom najčešće se koristi pri voltametrijskim i potenciometrijskim mjerenjima.

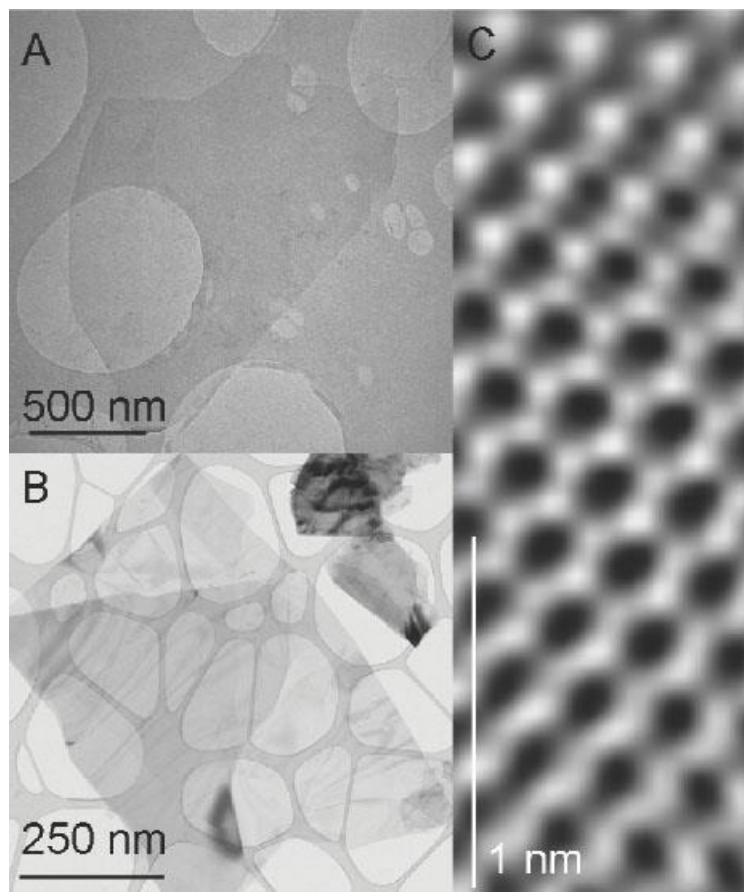
1.5. MODIFIKACIJE POVRŠINE ELEKTRODE

1.5.1. Grafen

Posljednih godina grafen je pobudio interes industrije, ali i znanstvene zajednice. Širok potencijal za primjenu pokazuje se na mnogim područjima; u elektronici, pohrani energije i pretvorbi te u bioznanosti/biotehnologiji. Značajna pozornost je usmjerena na grafen koji se smatra novom generacijom ugljikovih nanonanomaterijala zbog izvanrednih fizičko-kemijskih karakteristika. Odlikuje se velikom ploštinom površine (teoretski 2630 m²/g za monosloj grafena), odličnom termalnom i električnom vodljivošću te jakom mehaničkom čvrstoćom (Shao i sur., 2010.).

Grafen je 2D ploha ugljikovih atoma u heksagonalnoj konfiguraciji koji su međusobno povezani sp² vezama, dakle monosloj grafita (Slika 7.). Najtanji je poznati materijal, kao i najčvršći izmjereni. Grafen se smatra osnovnim građevnom jedinicom za ostale ugljikove nanočestice svih dimenzionalnosti (grafit, nanocjevčice, fulereni). Pokazuje izvanrednu sposobnost prijenosa elektrona, koji se mogu slobodno kretati u kristalu grafena zbog postojanja π -orbitala. Također, svaki je atom ugljika povezan sa susjednim atomom ugljika snažnom σ -vezom, kao i slabom π -vezom zbog čega pokazuje odlična mehanička svojstva (Yang i sur., 2013.).

Do danas je predloženo nekoliko metoda za proizvodnju grafena. Prvotni način proizvodnje (2004., Geim i suradnici) ploha grafena je bio mehaničkom eksfolijacijom (ponavljanim struganjem) visoko usmjerenog pirolitičkog grafita, a ova metoda se još uvijek koristi u laboratorijima za dobivanje savršeno strukturiranih slojeva grafena koji se koriste za znanstvena istraživanja. Ova metoda nije prikladna za masovnu proizvodnju. Drugi način dobivanja grafena bez nedostataka je blaga eksfolijacija grafita, no prinos ove metode je još uvijek nizak. Grafen je također moguće prirediti termalnim raspadanjem tanke pločice SiC pod ultravisokim vakuumom ili CVD rastom na metalnoj podlozi (Ru, Ni, Cu) ili bez metalne podloge (potencijalna metoda za masovnu proizvodnju). Druga metoda masovne proizvodnje grafena je i kemijskom ili termalnom redukcijom oksida grafita koja se ujedno smatra i najekonomičnijom. Obično tako proizveden grafen ima mnogo strukturnih manjkavosti i funkcionalnih skupina što se smatra prednošću u elektrokemijskoj primjeni (Shao i sur., 2010.).



Slika 7. Monosloj grafena (A), preklopljeni monoslojevi grafena (B) i atomska rezolucija dijela monosloja grafena, slikano transmisijskom elektronskom mikroskopijom (C) (<http://spie.org>)

Danas je grafen jedan od najraširenijih materijala koji se koristi u elektroanalitičkim tehnikama. Osobita svojstva grafena zbog kojih je u prednosti nad ostalim materijalima koji se koriste kao elektrokemijski i biosenzori se mogu podijeliti u dva aspekta. Prvo, specifična elektronska struktura grafena koja doprinosi visokoj električnoj vodljivosti i jednolikoj raspodjeli elektroaktivnog mjesta, kao i gustoći, uzrokuje izvanredno katalitičko djelovanje i povisuje elektrokemijski odgovor prema malim biomolekulama. Drugo, velika površina, biokompatibilnost i visoka vodljivost pomažu prijenos elektrona između elektrode i elektroaktivne molekule (Yang i sur., 2013.).

1.5.2. Ugljikove nanocjevčice

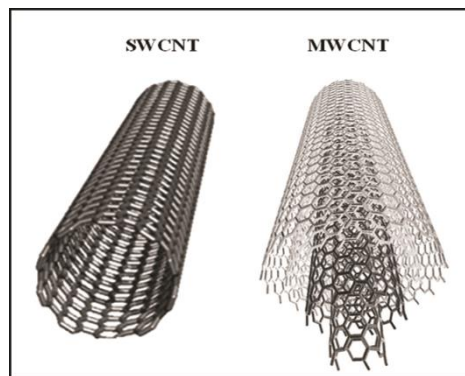
Nakon otkrića 1991. godine, istraživanja na ugljikovim nanocjevčicama (Carbon nanotubes, CNT) su uznapredovala i postala jedno od najatraktivnijih područja nanotehnologije (Tsai i sur., 2004.).

Ugljikove nanočestice se mogu podijeliti prema strukturi u dvije grupe:

- jednoslojne (Single walled carbon nanotubes, SWCNT)
- višeslojne (Multi walled carbon nanotubes , MWCNT)

SWCNT se sastoje od jedne nanocjevčice grafita (Slika 8.). Ugljikovi atomi su sp^2 hibridizirani, a orijentirani su u heksagonalnoj strukturi nalik saćama meda, koji je uvijen u šuplju cjevčicu mofološki. Promjer nanocjevčica je nekoliko nanometara, a duljina u mikrometarskom mjerilu.

MWCNT se sastoje od nekoliko koncentričnih cjevčica grafita, jednih smještenih unutar drugih (Slika 8.). Složene su strukture, a svaki sloj ugljika ima drugačiju kiralnost i elektronska svojstva. Promjer MWCNT je nekoliko desetaka nanometara, duljine slične kao i kod SWCNT, mikrometarske.



Slika 8. Jednoslojna i višeslojna ugljikova nanocjevčica

Ugljikove nanočestice sintetiziraju se trima glavnim tehnikama: arc - discharge, laserskim isparavanjem i CVD-om (chemical vapor deposition). Glavnina CNT-a na tržištu pripravljena je CVD metodom. Neovisno o metodi sinteze, metalna onečišćenja ostaju i utječu na svojstva CNT-a, čak i nakon određenih postupaka pročišćavanja.

Elektrokatalitička svojstva CNT-a nisu u potpunosti jasna i na neki način su kontroverzna. Banks i sur. smatraju da se elektrokataliza odvija na otvorenim krajevima nanocjevčica i da su rubna mjesta uzrok takvog svojstva. Međutim, novija istraživanja pokazuju da bi metalna

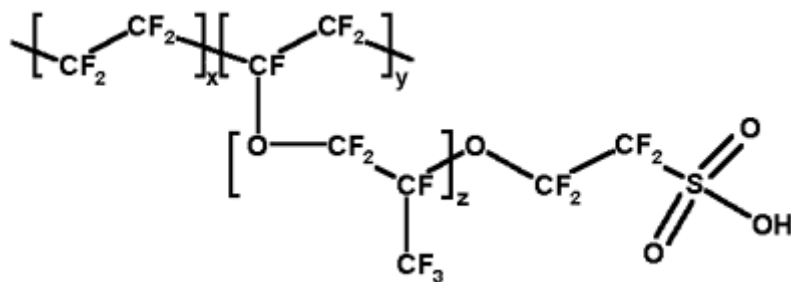
onečišćenja koja nastaju proizvodnim procesom mogla igrati važnu ulogu upravo u elektrokatalitičkim svojstvima CNT-a.

Zbog velike površine, dobre vodljivosti, izvanredne elektrokatalitičke sposobnosti, visoke površinske aktivnosti i dobre biokompatibilnosti, ugljikove nanocjevčice često nalaze primjenu kao senzori. Senzori na bazi CNT-a su osjetljiviji, imaju nižu granicu određivanja (Limit of detection, LOD) i bržu kinetiku prijenosa elektrona. Sva navedena svojstva moguće je modificirati dodatkom funkcionalnih skupina što znači i širu primjenu u elektroanalitici. Općenito funkcionalne skupine mogu biti vezane kovalentnim i ne-kovalentnim vezama. Kovalentne funkcionalne skupine uključuju dodavanje karboksilnih grupa nakon oksidacije, na koje se mogu potom vezati različite skupine poput amidne, tiolne ili drugih.

Nekovalentne modifikacije CNT-a odnose se na modifikaciju postranih zidova aromatskim strukturama, surfaktantima, polimerima ili hidrofobnim interakcijama. Takve modifikacije također utječu na elektrokemijske osobine materijala.

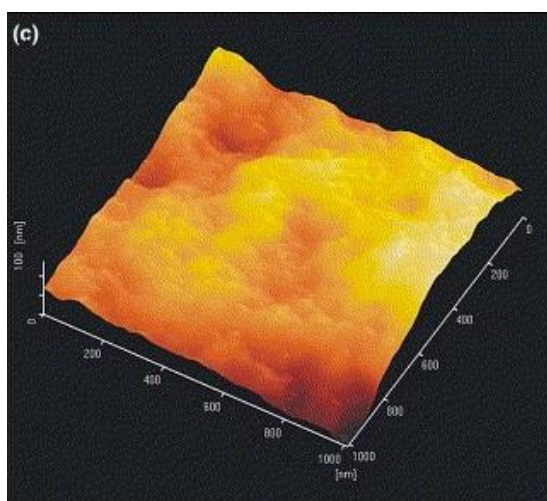
1.5.3. Nafion

Nafion je ionsko-izmjenjivački polimer razvijen u tvrtki E. I. Dupont (Slika 9.). Ti materijali se pripremaju kopolimerizacijom perfluoriranog vinil eter komonomera s tetrafluoroetilenom (Teflon). Pokrajnji lanci završavaju sulfonnom kiselinom ($-\text{SO}_3\text{H}$), a upravo zbog te skupine adsorbira i bubi u vodi. (Mauritz i Moore, 2004.)



Slika 9. Struktura Nafiona (<https://www.polymersolutions.com>)

Nafion je kationski izmjenjivač koji se široko koristi za modifikaciju elektroda upravo zbog svojih specifičnih karakteristika. Termički je stabilan, kemijski inertan, mehanički čvrst te sprečava onečišćenja površine elektrode od staklastog ugljika (Slika 10.). Kombinacija Nafiona s odgovarajućim ugljikovim nanomaterijalima u elektroanalitički složenu tanku film elektrodu ima vrlo zanimljive značajke i široko područje iskoristivosti. (Tsai i sur., 2004.)



Slika 10. Površina GCE elektrode prekrivena Nafionom

1.5.4. Bizmutove nanočestice

Dugi niz godina živine elektrode bile su glavni izbor za stripping voltametriju zbog njihove visoke osjetljivosti, reproducibilnosti i jednostavne obnovljivosti površine. Zbog hlapljivosti žive te njenog nakupljanja u organizmu, kao i štetnosti za okoliš, a sve veće popularnosti elektrokemijskih tehnika, traže se alternativne elektrode bez sadržaja žive (tzv. zelene elektrode ili „mercury-free“ elektrode) sa sličnim karakteristikama živinoj elektrodi. Ispitivani su mnogi drugi materijali za izradu elektroda kao što su primjerice različite modifikacije ugljika, zlata, platine, srebra, iridija, različite legure i amalgami, ali niti jedan od njih nije pokazao tako dobre elektrokemijske karakteristike žive.

Korištenje bizmuta u području dizajna senzora i razvoja elektroanalitičkih metoda počelo je 2000. godine uporabom bizmut film elektrode kao moguća zamjena za živinu te je široko prihvaćena u laboratorijima diljem svijeta (Wang, 2004.). Ovakve elektrode pokazuju dobro definirani, pravilan i visoko reproducibilan analitički odgovor, izvrsno razlučivanje susjednih pikova, širok linearan dinamički raspon s karakteristikama signala koje se mogu usporediti s onim na živinoj elektrodi. Filmovi bizmuta mogu se pripremiti na dva načina *ex situ* ili *in situ*. *Ex situ* priprava podrazumijeva pripremu filma prije pokusa prethodnim taloženjem dok ona *in situ* uključuje dodavanje bizmut (III) iona direktno u otopinu s uzorkom te istodobnim taloženjem bizmuta i metala koji se analizira. Bizmutove elektrode mogu se dalje modificirati oblaganjem polimernim slojevima, npr. polupropusna membrana može zaštititi površinu bizmuta od adsorbiranja velikih makromolekula. Bizmut-film elektroda ima široki raspon katodnog potencijala (oko -1.25 V vs. Ag/AgCl, pH 4.5), dok je raspon anodnog potencijala ograničen zbog oksidacije bizmuta. Katodni raspon bizmut-film elektrode ovisi o debljini bizmutovog filma, stoga se ona može primijeniti za mjerenje elemenata sa standardnim potencijalom negativnijim od bizmutovog (Zn, Ga, Cd, In, Tl, Sn, Pb). Bizmut-film elektroda našla je široku primjenu te se pokazala vrlo korisnom u analitičkoj upotrebi što dokazuju brojni radovi i istraživanja provedena na ovoj elektrodi.

Posljednjih su godina elektrode modificirane bizmutovim nanočesticama uspješno primijenjene u stripping voltametriji. Uz pozitivnu karakteristiku poput netoksičnosti, pokazano je da osjetljivost senzora i granica detekcije cinka, olova i kadmija može biti značajno poboljšana smanjenjem čestica bizmuta kao modifikatora. Veća osjetljivost senzora i niža granica detekcije navedenih metala su povezani s povećanjem elektrokemijski aktivne površine elektrode modificirane bizmutom (Sudakova i sur., 2014.).

Osim za određivanje metala, elektrode modificirane bizmutom su se pokazale uspješnima i u detekciji organskih spojeva, farmaceutskih supstancija, pesticida i ostalih biološki važnih spojeva. Danas se bizmut smatra obećavajućim kandidatom za razvijanje pouzdanih elektroda bez žive.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Hiperlipidemija je danas vrlo često stanje uzrokovano neurednim načinom života. Sve više ljudi zbog loše ishrane i nedovoljno kretanja ima povišene lipide u krvi, što je jedan od glavnih rizičnih čimbenika za bolesti kardiovaskularnog sustava.

Lovastatin je jedan od prvih i najpoznatijih hipolipemika, spada u skupinu statina koji su danas najpropisivaniji lijekovi kod hiperkolesterolemije.

Globalni trendovi pokazuju da se sve veći broj pacijenata odlučuje za fitopreparate, a jedan od najpoznatijih je dodatak prehrani s crvenom rižom koja sadrži lovastatin. Problemi vezani uz fitopreparat crvene riže je neutvrđena količina lovastatina u njemu (iako su doze niže od onih u registriranim lijekovima), (Skvrce i sur., 2012.) a kako takvi preparati prema RH regulativi ne podliježu provjeri sastava, moguće je da preparat niti ne sadrži deklarirani sastojak. Uz to, nekontrolirano uzimanje takvih pripravaka može prouzročiti nuspojave kao kod ostalih statina. Poznate nuspojave statina su miopatija, rabdomioliza te hepatotoksičnost. Iz navedenih razloga važno je razviti jednostavnu, jeftinu i pouzdanu metodu određivanja lovastatina iz različitih pripravaka.

Nebivolol spada u skupinu beta blokatora, lijekova koji su danas vrlo često propisivani za liječenje esencijalne hipertenzije i zatajenja srca. Veliki je broj ljudi pod terapijom antihipertenzivima iz navedene skupine, a nebiolol se izdvaja zbog specifičnih hemodinamskih karakteristika te značajno poboljšane kvalitete života pacijenata. Poželjno je i potrebno razvijati pouzdane i osjetljive metode za određivanje lijekova u biološkim tekućinama i dozirnima oblicima.

Elektroanalitičke metode su jeftine, brze i lake za izvođenje. Cilj ovog rada bio je ispitati mogućnost primjene različitih modifikacija elektrode od staklastog ugljika za određivanje lovastatina i nebiolola.

3.MATERIJALI I METODE

3.1. KEMIKALIJE

Tijekom izrade ovog rada, korištene su navedene kemikalije:

- Lovastatin (Pliva, Hrvatska)
- Acetonitril (Merck)
- Etanol.(Badel)
- Octena kiselina, CH_3COOH (Alkaloid Skopje)
- Fosfatna kiselina, H_3PO_4 (Lach – Ner)
- Borna kiselina, H_3BO_3 (Sigma – Aldrich)
- Ultra čista voda
- Nafion (Sigma - Aldrich)
- Grafen (US Research Nanomaterials, Inc., Houston, USA)
- Natrijev hidroksid, NaOH (Sigma – Aldrich)
- Nebivolol (Agencija za lijekove i medicinske proizvode, Hrvatska)

3.2. RADNI INSTRUMENTI

Elektroanalitička mjerenja provedena tijekom izrade ovog rada, ciklička i diferencijalno pulsna voltometrijska mjerenja, izvršena su na uređaju μ – Autolab (Eco Chemie) spojenim na računalo. Program koji kontrolira mjerenja je GPES ver. 4.9.

Kao radna elektroda korištena je elektroda od staklastog ugljika (Methrom, promjera 3 mm), a površina elektrode modificirana je grafenom suspendiranim u 0.1% Nafionu, grafenom suspendiranim u etanolu, ugljikovim nanocjevčicama suspendiranim u 0.3% Nafionu, bizmutovim nanočesticama suspendiranim u 0.1% Nafionu te suspenzijom ugljikovih nanocjevčica i bizmutovih nanočestica u 0.1% Nafionu. Referentna elektroda je srebro/srebrov klorid (Ag/AgCl) elektroda, dok je protuelektroda platinska žica.

Tijekom izrade pufera i mjerenja pH vrijednosti otopina, korišten je digitalni pH- metar Mettler s kombiniranom staklenom elektrodom. Kalibracija je izvršena pomoću standardne otopine pufera poznatih pH vrijednosti: $\text{pH}_1 = 7.00 \pm 0.01$ i $\text{pH}_2 = 4.00 \pm 0.01$.

Kemijske supstance vagane su na analitičkoj vagi Mettler Toledo AB-204-S. Ultrazvučna kupelj Transsonic T570 (Elma) korištena je za poboljšavanje topljivosti supstancija pri izradi otopina kao i za čišćenje površine elektrode.

3.3. UVJETI MJERENJA

Ciklički i diferencijalno pulsni voltamogrami snimani su na elektrodi od staklastog ugljika, prije i nakon modifikacije površine grafenom suspendiranim u 0.1% Nafionu, grafenom suspendiranim u etanolu, ugljikovim nanocjevčicama suspendiranim u 0.3% Nafionu, bizmutovim nanočesticama suspendiranim u 0.1% Nafionu te suspenzijom ugljikovih nanocjevčica i bizmutovih nanočestica u 0.1% Nafionu.

Primjenjeni raspon potencijala bio je od 0 do 1.4 V uz primjenjene brzine promjene potencijala od 100 mV za cikličku voltametriju, dok je kod diferencijalno pulsne voltametrije primjenjena širina pulsa 50 ms, amplituda pulsa 25mV te brzina promjene potencijala 20mV/s, a u stripping postupcima potencijal akumulacije 0.5 V i vrijeme akumulacija 120 i 240 s.

3.4. PRIPREMA ELEKTRODE

Elektrodu od staklastog ugljika potrebno je pripremiti prije nanošenja modificirajućih slojeva. Elektroda se prvo ispolira vrlo sitnim abrazivnim česticama aluminijevog oksida (Al_2O_3) na krpici za poliranje kružnim pokretima, nakon čega slijedi ispiranje destiliranom vodom i uranjanje u ultrazvučnu kupelj na 15 sekundi za uklanjanje zaostalih čestica Al_2O_3 . Elektroda se potom osuši te slijedi nanošenje suspenzija na površinu elektrode.

Nanosi se 10 μL odgovarajuće suspenzije Hamilton mikropipetom te ravnomjerno rasporedi po površini elektrode. Potom je potrebno osušiti sloj modifikatora na zraku ili po potrebi sušilom.

3.5. PRIPREMA OTOPINA

3.5.1. Otopina lovastatina

Matična otopina

Za pripremu matične otopine koncentracije 1×10^{-3} M, na analitičkoj vagi odvagane se 0.0041 g lovastatina, kvantitativno prenese u tikvicu od 10,0 mL, otopi u 5 mL acetonitrila uz pomoć ultrazvučne kupelji te nadopuni ultračistom vodom do oznake. Otopina se čuva u hladnjaku.

Radna otopina

Radna otopina koncentracije 5×10^{-5} M pripremljena je pipetiranjem 1,0 mL matične otopine pomoću mikropipete u tikvicu od 20.0 mL te nadopunjavanje puferom različitog pH do oznake.

3.5.2. Otopina nebivolola

Matična otopina

Za pripremu matične otopine nebivolola koncentracije 5×10^{-5} M na analitičkoj vagi odvagane se 0.0044 g nebivolola, kvantitativno prenese u tikvicu od 10.0 mL, otopi u ultračistoj vodi uz pomoć ultrazvučne kupelji te istom nadopuni do oznake. Otopina se čuva u hladnjaku.

Radna otopina

Radna otopina pripremljena je pipetiranjem 1,0 mL matične otopine i prenošenjem u tikvicu od 20.0 ml te nadopunjavanjem do oznake odgovarajućim puferom.

3.5.3. Otopina Britton-Robinson pufera

Otopina Britton-Robinson pufera pripremljena je u tikvici od 250,0 mL pipetirajući po 20,0 mL borne, fosforne i octene kiseline (H_3BO_3 , H_3PO_4 , CH_3COOH) koncentracija 0.5 M te nadopunjeno ultračistom vodom do oznake.

Različite pH vrijednosti puferske otopine dobivaju se dodavanjem odgovarajućg volumena 0.2 M otopine NaOH.

3.5.4. Suspenzija grafena u 0.1% - tnoj otopini Nafiona u etanolu

Na analitičkoj vagi odvagane se 1.0 mg grafena i kvantitativno prenese u tikvicu te suspendira uz pomoć ultrazvučne kupelji u 1.0 mL 0.1% - tne otopine Nafiona u etanolu. Tako

pripremljen grafen koncentracije 1 mg/mL potrebno je čuvati na hladnom, a otvor tikvice obložiti parafilmom.

3.5.5. Suspenzija grafena u etanolu

Na analitičkoj vagi odvagane se 1.0 mg grafena i kvantitativno prenese u tikvicu te suspendira uz pomoć ultrazvučne kupelji u 1.0 mL etanola. Tako pripremljen grafen koncentracije 1.0 mg /mL čuva se na hladnom.

3.5.6. Suspenzija ugljikovih nanocjevčica 0.3% - tnoj otopini Nafiona u etanolu

Na analitičkoj vagi odvagane se 1 mg ugljikovih nanočestica, kvantitativno se prenese u tikvicu te u ultrazvučnoj kupelji suspendira u 1 mL 0.3% - tne otopine Nafiona. Suspenzija se čuva na hladnom.

3.5.7. Suspenzija nanočestica bizmuta u 0.1% - tnoj otopini Nafiona u etanolu

Na analitičkoj vagi odvagane se 1 mg bizmutovih nanočestica, kvantitativno se prenese u tikvicu te na ultrazvučnoj kupelji suspendira u 1 mL 0.1% - tne etanolne otopine Nafiona. Suspenzija se čuva na hladnom.

3.5.8. Smjesa ugljikovih nanocjevčica i bizmutovih nanočestica u 0.1% - tnoj otopini Nafiona u etanolu

Odvagane se po 1 mg ugljikovih nanocjevčica i 1 mg bizmutovih nanočestica, kvantitativno se prenese u tikvicu, te na ultrazvučnoj kupelji suspendira u 1 mL 0.1% - tne etanolne otopine Nafiona.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Sva mjerenja provedena su snimanjem cikličkog ili diferencijalno pulsnog voltamograma, u otopinama lovastatina i neбиволола pri različitim uvjetima i modifikacijama staklaste ugljikove elektrode (engl. Glassy Carbon Electrode, dalje GC).

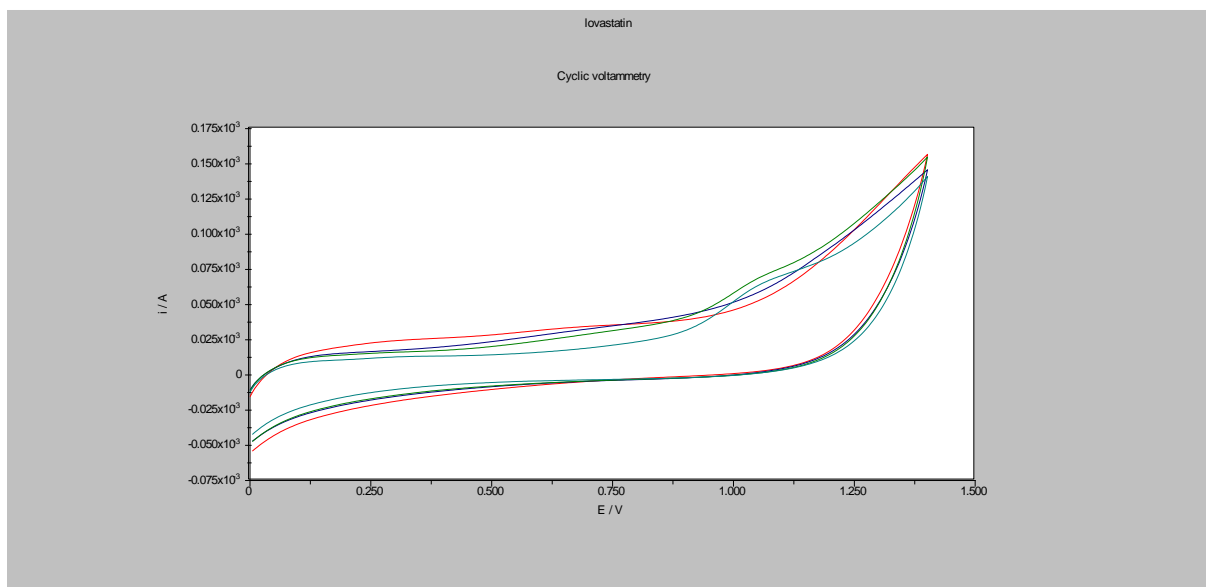
4.1. LOVASTATIN

Prva preliminarna mjerenja cikličkom voltametrijom izvršena su u otopini lovastatina koncentracije $c = 5 \times 10^{-5}$ M u Britton-Robinson puferu pH vrijednosti 4, pri rasponu potencijala od 0 do 1.4 V i brzini promjene potencijala od 100 mV/s. Uspoređeni su voltamogrami (Slika 11.) dobiveni mjerenjem spomenute otopine GC elektrodom uz različite modifikacije njezine površine.

Mjerenje izvršeno elektrodom od staklastog ugljika bez modificirane površine ne pokazuje voltametrijski odgovor, kao ni modifikacijom elektrode otopinom grafena u etanolu (na površinu elektrode dodano je 10 μ L). Nešto izraženiji odgovor dobiven je modifikacijom elektrode suspenzijom grafena u 0.1% - tnoj etanolnoj otopini Nafiona.

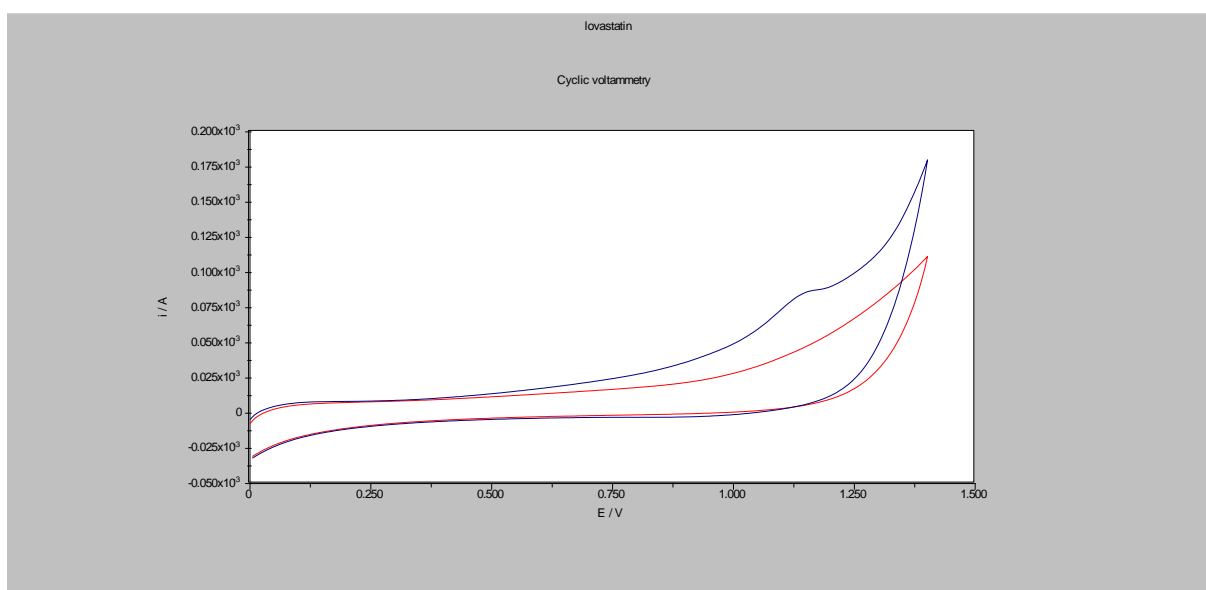
Od svih izvršenih mjerenja obećavajućom se pokazala kombinacija grafena u 0.1% Nafionu (10 μ L) uz jednaku količinu bizmutovih nanočestica u 0.1% Nafionu (10 μ L).

Navedenim mjerenjima pokazano je da postoji mogućnost, uz bolje optimirane parametre, razvoja metode za određivanje lovastatina s modificiranim elektrodama.



Slika 11. Ciklički voltamogrami lovastatina koncentracije 5×10^{-5} u Britton – Robinson puferu pH 4, snimljeni na GC elektrodi bez modifikacije (crveno), modificiranoj grafenom u etanolu (tamno plavo), grafenom u 0.1% - tnom Nafionu (zeleno) i grafenom u 0.1% - tnom Nafionu uz dodatak bizmutovih nanočestica u 0.1% - tnom Nafionu (tirkizno)

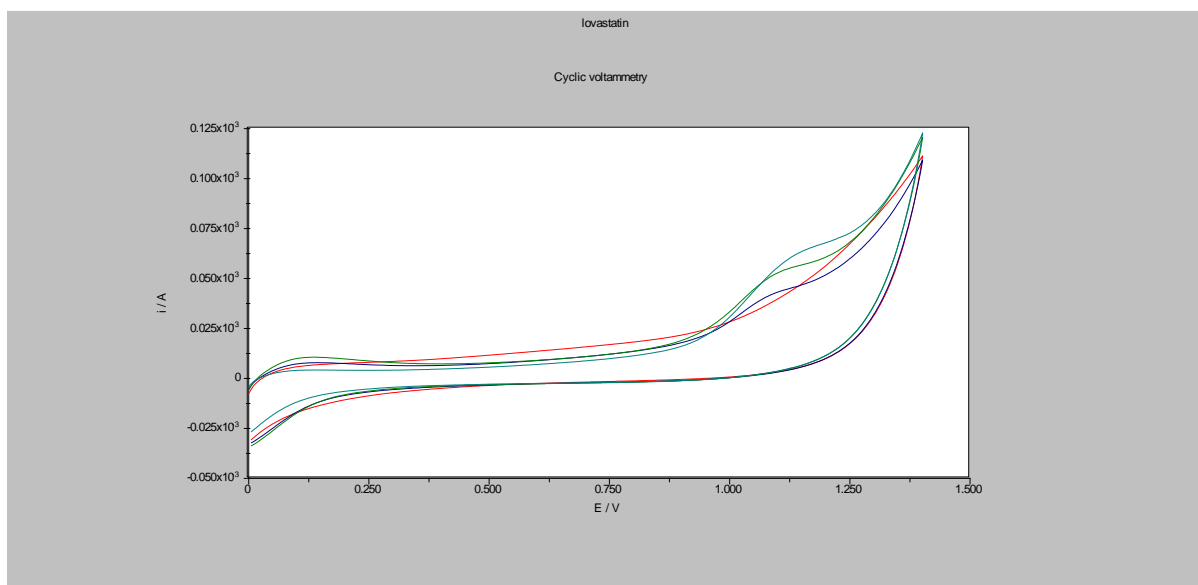
Ciklički voltamogram otopine lovastatina dobiven mjerenjem na elektrodi modificiranoj grafenom u etanolu nije pokazao zadovoljavajući odgovor, pa je bilo potrebno promijeniti jedan od parametara. Promijenjen je pH pufera otopine lovastatina iste koncentracije (5×10^{-5} M) te je ponovljeno mjerenje pri istim uvjetima – raspon potencijala 0 – 1.4 V, brzina promjene potencijala 100 mV/ s, dok je na površinu elektrode od staklastog ugljika naneseo 10 μ L suspenzije grafena u etanolu.



Slika 12. Ciklički voltamogrami lovastatina koncentracije 5×10^{-5} M, snimljeni u Britton – Robinson puferu pH 5 na čistoj GC elektrodi (crveno) i GC elektrodi modificiranoj otopinom grafena u etanolu (tamno plavo)

Uspoređeni su dobiveni voltamogrami (Slika 12.) iz kojih se vidi da je Britton – Robinson pufer pH 5 bolji odabir od pufera nižeg pH jer je voltametrijski odgovor lovastatina bolje definiran.

Uz promjenu pH osnovnog elektrolita (mjerjenja izvršena u Britton- Robinson puferu pH 5), u otopinu lovastatina ($c = 5 \times 10^{-5}$ M) dodan je i acetonitril u različitim postotcima u svrhu poboljšanja topljivosti lijeka. Lovastatin je teško topljiv i pri koncentraciji 5×10^{-5} M nakon određenog vremena primijećena je kristalizacija. Ponovljeno je mjerenje s različitim modifikacijama elektroda, pri rasponu potencijala 0 – 1.4 V te brzini promjene potencijala od 100 mV/s.



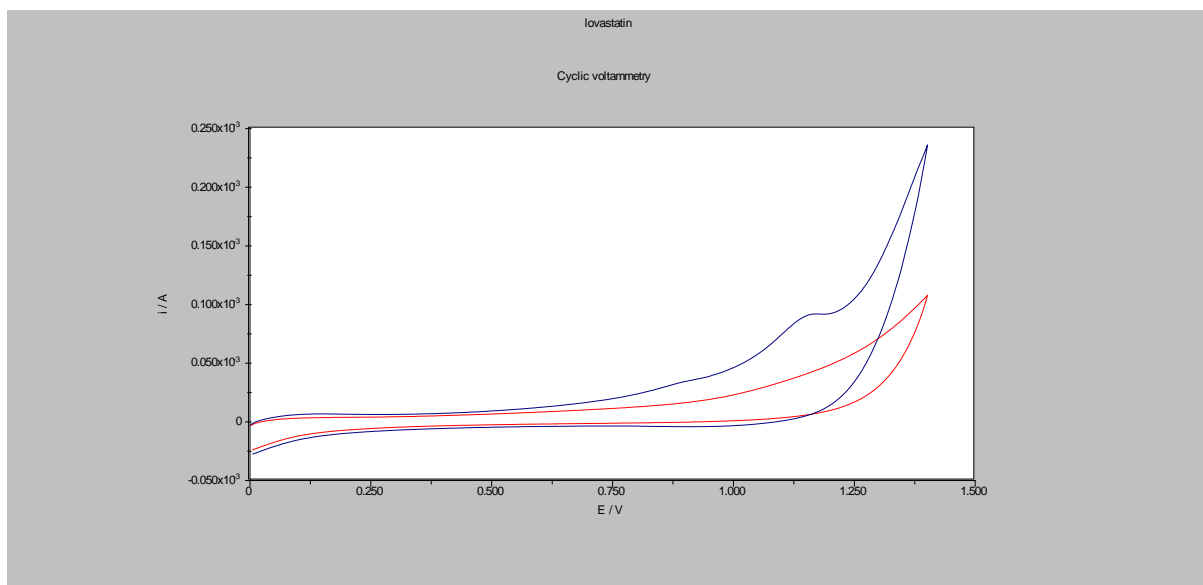
Slika 13. Ciklički voltamogrami lovastatina koncentracije 5×10^{-5} M, snimljeni na GC elektrodi u otopini bez dodatka acetonitrila (crveno), GC elektrodi modificiranoj grafenom u 0.1% - tnom Nafionu uz 10% acetonitrila (plavo), GC elektrodom modificiranom grafenom u 0.1% Nafionu uz dodatak bizmutovih nanočestica u 0.1% Nafionu uz 10% acetonitrila (zeleno) i GC elektrodom modificiranom grafenom u 0.1% Nafionu uz dodatak bizmutovih nanočestica u 0.1% Nafionu uz 5% acetonitrila (tirkizno)

Dobiveni voltamogrami (Slika 13.) pokazuju poboljšanja voltametrijskih odgovora jer je uz dodani acetonitril poboljšana topljivost lovastatina, iako dobiveno poboljšanje nije značajno. Oksidacijski vrhovi lovastatina su i dalje razvučeni i slabo definirani. Voltamogram dobiven mjerenjem na nemodificiranoj GC elektrodi ne pokazuje voltametrijski odgovor.

Modifikacijom elektrode grafenom u 0.1% - tnom Nafionu i uz dodatak 10% acetonitrila u osnovni elektrolit voltametrijski odgovor je vidljiv, ali još uvijek loše definiran.

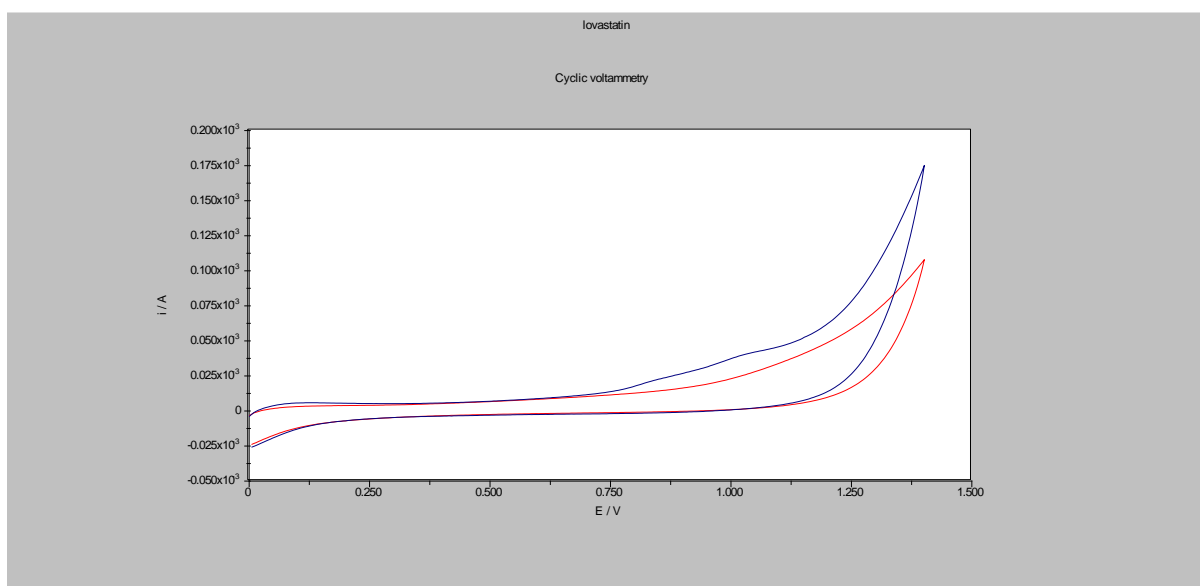
Dodatak 10 μ L bizmutovih nanočestica u 0.1% - tnom Nafionu uz grafen u Nafionu i 10% acetonitrila u osnovnom elektrolitu pokazuje bolje definirani oksidacijski vrh, koji je ujedno i

pomaknut u lijevo. Pomak pika prema nižim vrijednostima potencijala oksidacije označava katalitički učinak bizmutovih nanočestica i poboljšanje oksidacije lovastatina. Napravljeno je još jedno mjerenje s istom modifikacijom površine elektrode kao prethodno, uz dodatak 5% acetonitrila. Dobiveni oksidacijski vrh je razvučeniji.



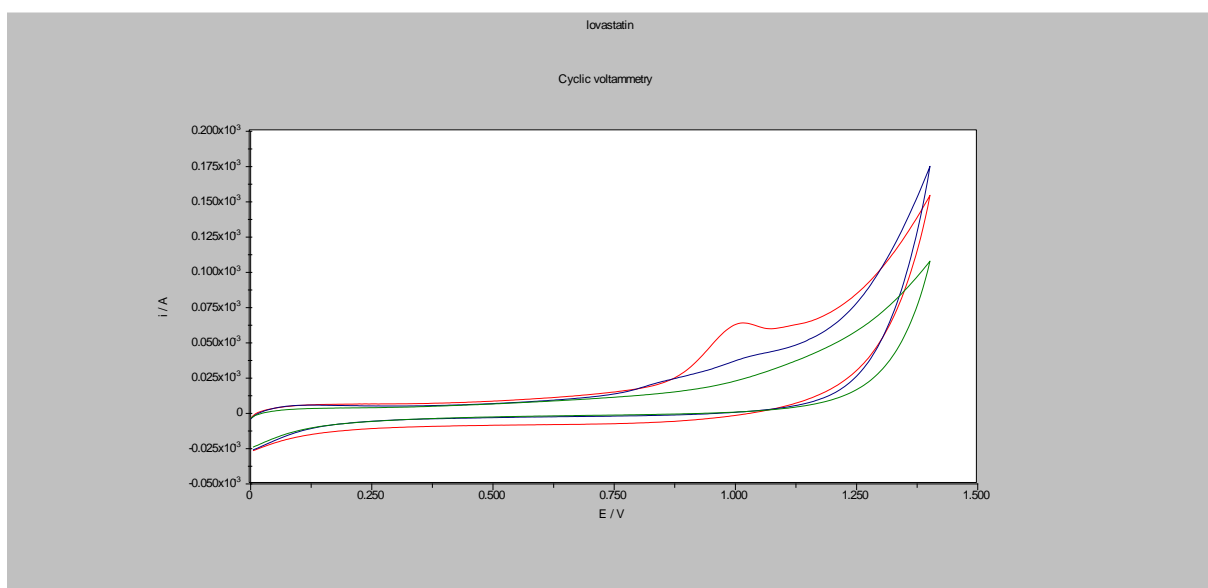
Slika 14. Ciklički voltamogrami lovastatina koncentracije 5×10^{-5} M, u otopini Britton – Robinson pufera pH 6 uz dodatak 2.5% acetonitrila mjereno na GC elektrodi (crveno), GC elektrodi modificiranoj grafenom u etanolu (plavo)

Uspoređeni su voltametrijski odgovori nakon mjerenja otopine lovastatina ($c = 5 \times 10^{-5}$ M) GC elektrodom bez modifikacije i sa suspenzijom grafena u etanolu (raspon potencijala 0 – 1.4 V, brzina promjene potencijala 100 mV/s) uz ponovnu promjenu pH Britton – Robinson pufera s 5 na 6 i dodatak 2.5% acetonitrila (Slika 14.). Dodana količina acetonitrila bila je preniska za poboljšanje topljivosti lovastatina te je nakon nekog vremena ponovo primjećena kristalizacija u otopini. Nemodificirana GC elektroda nije pokazala zadovoljavajući voltametrijski odgovor, dok je vidljiv i definiraniji na elektrodi modificiranoj s 10 μ L suspenzije grafena u etanolu.



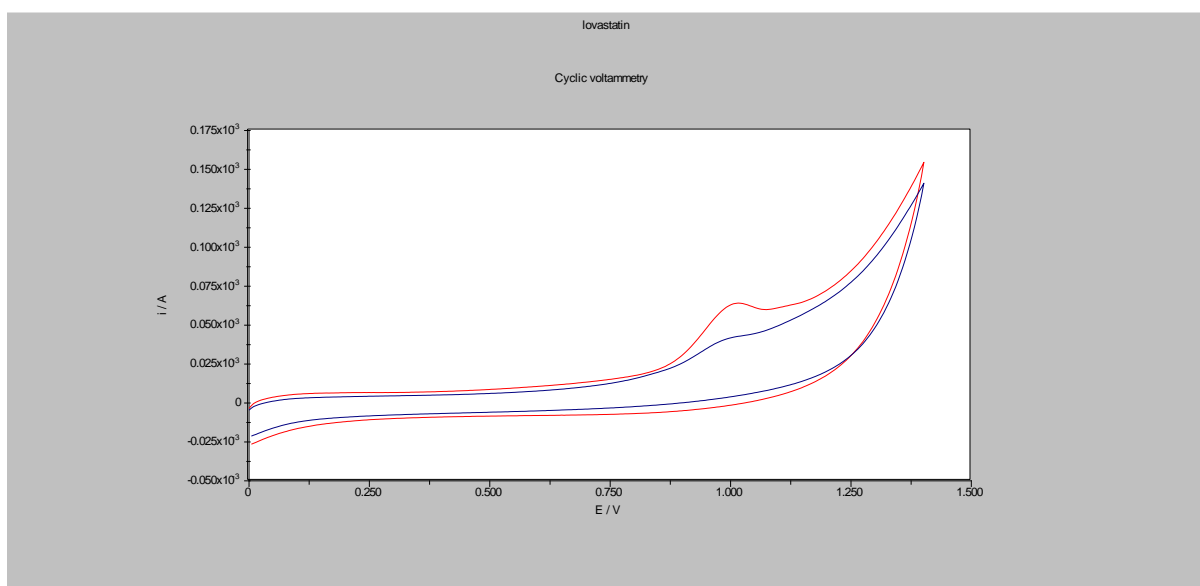
Slika 15. Ciklički voltamogrami lovastatina koncentracije 5×10^{-5} M, u otopini Britton – Robinson pufera pH 6 uz dodatak 5% acetonitrila, mjereno na GC elektrodi bez modifikacije (crveno) i modificiranoj grafenom u 0.1% - tnom Nafionu (10 μ L) (tamno plavo)

Mjerenje je ponovljeno uz dodatak 5% acetonitrila u osnovni elektrolit u istim uvjetima (raspon potencijala 0 – 1.4 V, brzina promjene potencijala 100 mV/s). Iako je strujni vrh dobiven na GC elektrodi s grafenom znatno lošiji nego u prethodnom mjerenju s manjom koncentracijom acetonitrila, koncentracija od 5% acetonitrila odabrana je kao optimalna jer sprječava taloženje lovastatina, dok udio organskog otapala u elektrolitu nije dovoljno visok da značajno ometa mjerenja (Slika 15.).



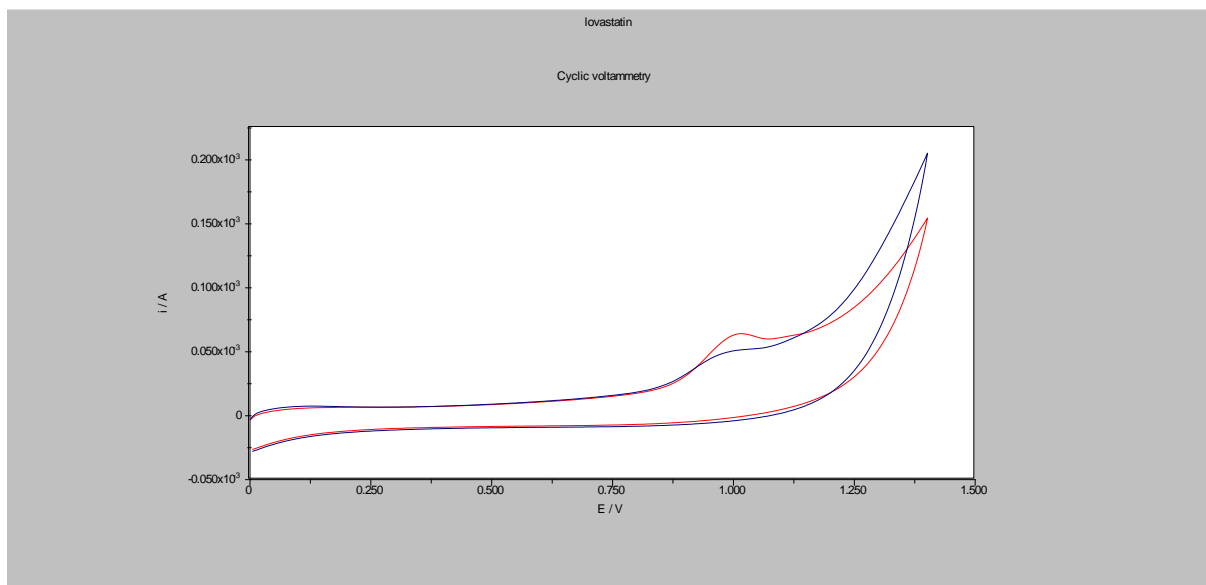
Slika 16. Ciklički voltamogrami otopine lovastatina koncentracije 5×10^{-5} M, u Britton – Robinson puferu pH 6 uz dodatak 5% acetonitrila, mjerenje na nemodificiranoj GC elektrodi (zeleno), GC elektrodi modificiranoj grafenom u 0.1% Nafionu (tamno plavo), i GC elektrodi modificiranoj ugljikovim nanocjevčicama u 0.3% Nafionu (crveno)

U otopini lovastatina koncentracije 5×10^{-5} M, u Britton- Robinson puferu pH 6 uz dodatak 5% acetonitrila izvršena su mjerenja pod istim uvjetima kao i prethodna, raspon napona 0 – 1.4 V i brzina promjene napona 100 mV/s. Voltamogram lovastatina dobiven na elektrodi od staklastog ugljika bez modifikacija nije pokazao pik. Dodatak 10 μ L suspenzije grafena u 0.1% - tnom Nafionu također nije pokazao značajno poboljšanje pika. Međutim, modifikacija GC elektrode dodatkom 5 μ L ugljikovih nanocjevčica u 0.3 % - tnom Nafionu dala je voltamogram s definiranim pikom, a vrijednosti koje ga karakteriziraju su $E_p = 1.0$ V, $i_p = 1.3$ μ A (Slika 16.)



Slika 17. Ciklički voltamogrami otopine lovastatina koncentracije 5×10^{-5} M, u Britton – Robinson puferu pH 6 uz dodatak 5% acetonitrila, mjerenje na GC elektrodi modificiranoj ugljikovim nanocjevčicama u 0.3% Nafionu (crveno) i GC elektrodi modificiranoj ugljikovim nanocjevčicama uz dodatak bizutovih nanočestica u 0.1% Nafionu (plavo)

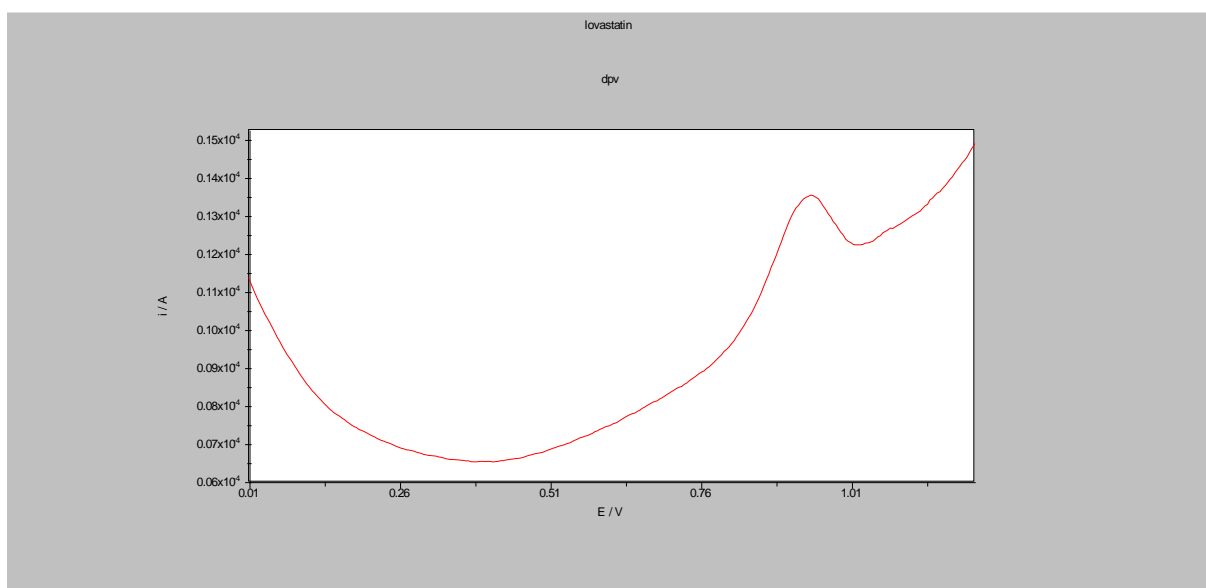
Otopina lovastatina u Britton – Robinson puferu pH 6 uz 5% acetonitrila pokazala se najboljom, te su uspoređena mjerenja (Slika 17.) na GC elektrodi modificiranoj s ugljikovim nanocjevčicama u 0.3% Nafionu (5 μ L) i modifikacijom kombinacije ugljikovih nanocjevčica i bizmutovih nanočestica u 0.1% Nafionu (10 μ L). Same ugljikove nanocjevčice pokazale su bolji pik od kombinacije ugljikovih nanocjevčica i bizmutovih nanočestica, iako je pik pomaknutiji u desno zbog katalitičkog učinka bizmutovih nanočestica. Uvjeti mjerenja nisu promijenjeni, raspon napona 0 - 1.4 V, a brzina promjene napona 100 mV/s.



Slika 18. Ciklički voltamogrami otopine lovastatina koncentracije 5×10^{-5} M, u Britton – Robinson puferu pH 6 uz dodatak 5% acetonitrila, ugljikove nanocjevčice u 0.3% Nafionu (crveno) i ugljikove nanocjevčice u 0.3% Nafionu uz dodatak bizmutovih nanočestica u 0.1% Nafionu (10 μ L) (plavo)

Ciklički voltamogrami dobiveni su mjerenjem otopine lovastatina koncentracije 5×10^{-5} M u Britton – Robinson puferu pH 6 uz dodatak 5% acetonitrila i prikazani na slici 18. GC elektroda modificirana je s 5 μ L ugljikovih nanocjevčica u 0.3 % Nafionu. Dobiveni pik je slabo izražen.

Drugo mjerenje izvršeno je na GC elektrodi modificiranoj ugljikovim nanocjevčicama u 0.3 % - tnom Nafionu (5 μ L), ali uz dodatak 10 μ L bizmutovih nanočestica u 0.1 %- tnom Nafionu. Zbog povećanja koncentracije Nafiona na površini GC elektrode, voltametrijski odgovor je slabiji.



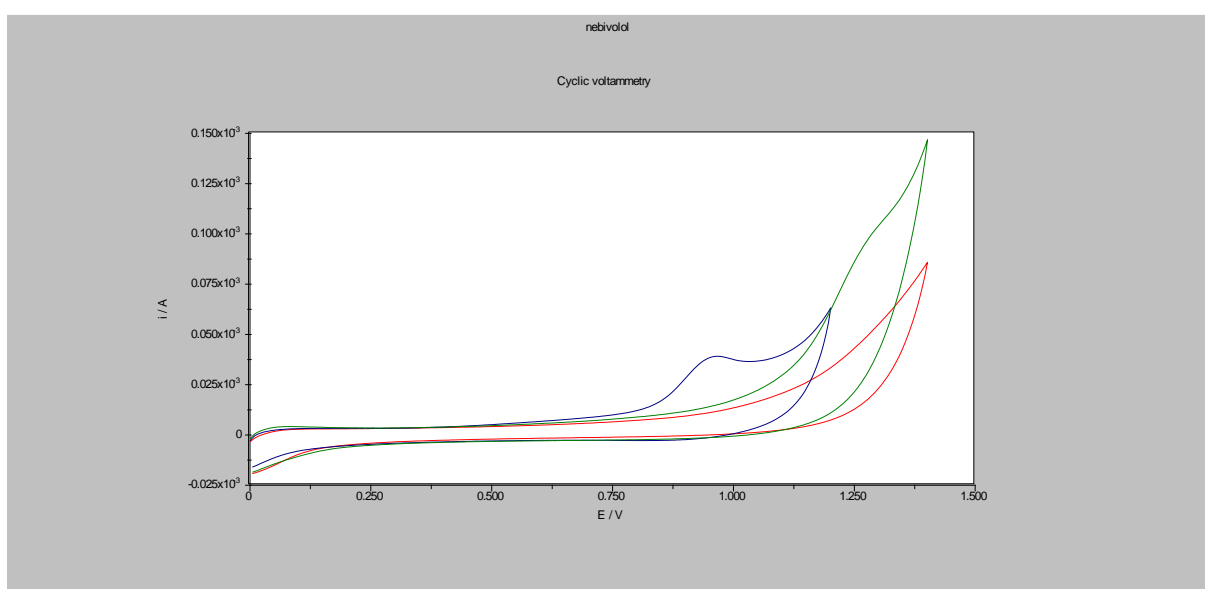
Slika 19. Diferencijalno pulsni voltamogram otopine lovastatina koncentracije 5×10^{-5} M, u Britton – Robinson puferu pH 6 uz dodatak 5% acetonitrila, mjereno na GC elektrodi modificiranoj ugljikovim nanocjevčicama u 0.3% Nafionu (crveno)

Diferencijalno pulsna voltometrija, tehnika osjetljivija od cikličke voltetrije, primijenjena je u otopini lovastatina ($c = 5 \times 10^{-5}$ M) u Britton – Robinson puferu pH 6 uz dodatak 5% acetonitrila. GC elektroda modificirana je s 5 μ L suspenzije ugljikovih nanocjevčica u 0.3% -tnom Nafionu. Primjenjena je širina pulsa 50 ms, amplituda pulsa 25 mV, brzina promjene potencijala 20 mV/s. Dobiven je voltamogram s dobro definiranim strujnim vrhom karakteriziran veličinama $E_p = 0.93$ V, $i_p = 2.6$ μ A (Slika 19.).

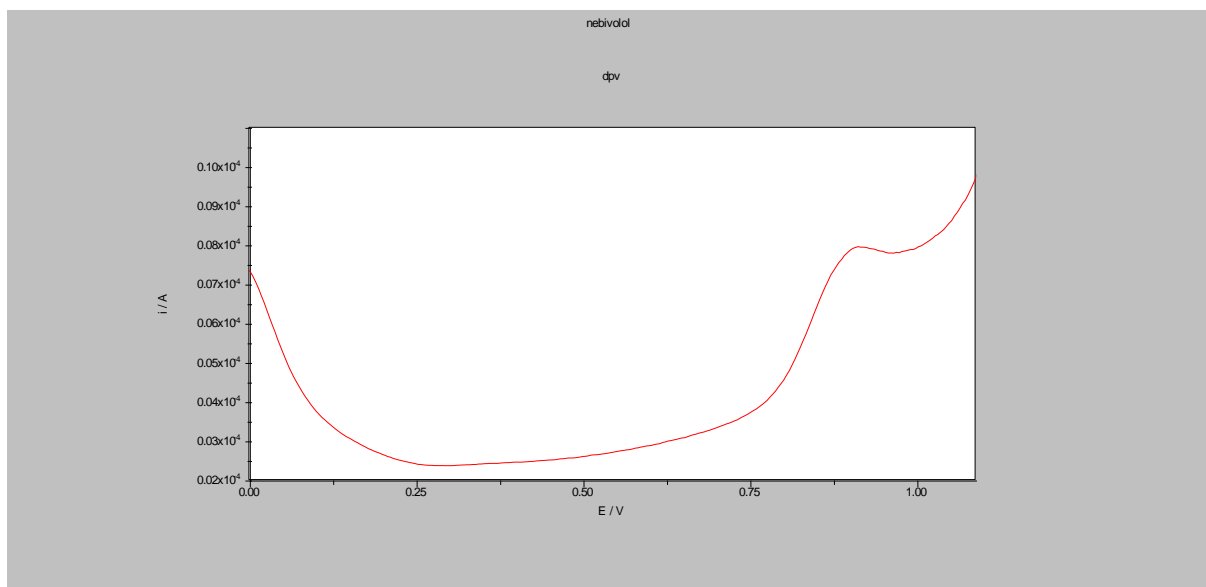
4.2. NEBIVOLOL

Mjerenja u otopini nebivolola koncentracije 5×10^{-5} M izvršena su u Britton – Robinson puferu pH 6 cikličkom voltametrijom. Korištena je elektroda od staklastog ugljika prekrivena različitim modifikacijama površine.

Kao što je prikazano na slici 20., GC elektroda bez modifikacija nije dala voltametrijski odgovor, dok je pik dobiven GC elektrodom modificiranom s 10 μ L grafena u 0.1 % - tnom Nafionu vrlo slabo vidljiv. Najbolje izražen oksidacijski vrh nebivolola dobiven je modifikacijom GC elektrode grafenom u etanolu (10 μ L), a veličine koje ga karakteriziraju iznose $E_p = 0.97$ V i $i_p = 12.5$ μ A. Mjerenje je izvršeno pod uvjetima raspona napona 0 – 1.4 V i brzini promjene napona od 100 mV/s.

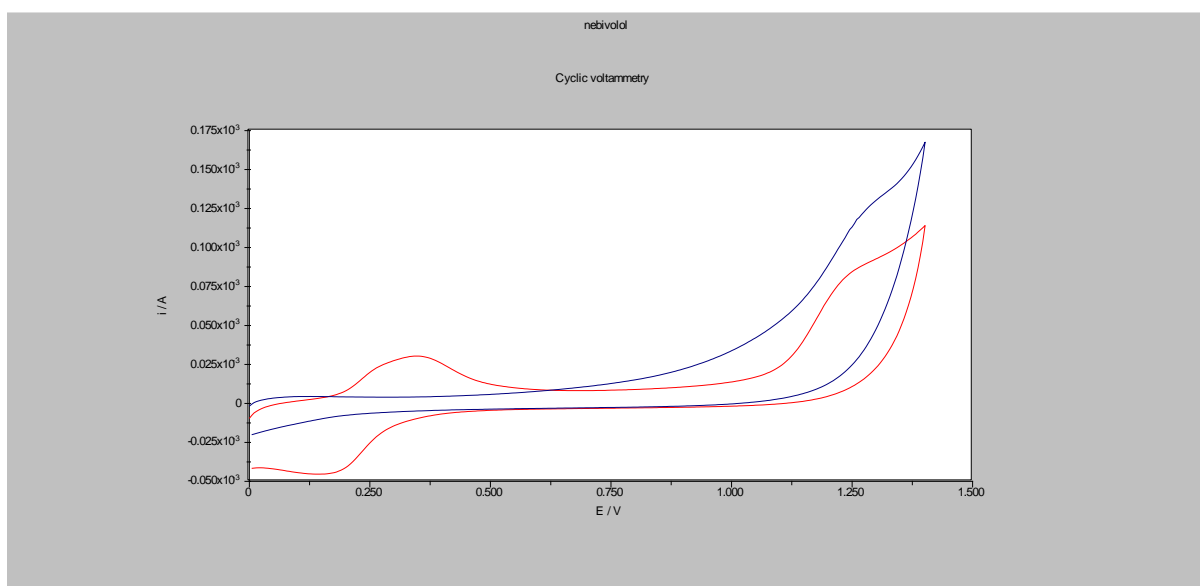


Slika 20. Ciklički voltamogrami nebivolola koncentracije 5×10^{-5} M, u Britton – Robinson puferu pH 6, mjereni s GC elektrodom bez modifikacije (crveno), GC elektrodom modificiranoj grafenom u etanolu (plavo) i GC elektrodom modificiranoj grafenom u 0.1% - tnom Nafionu (zeleno)



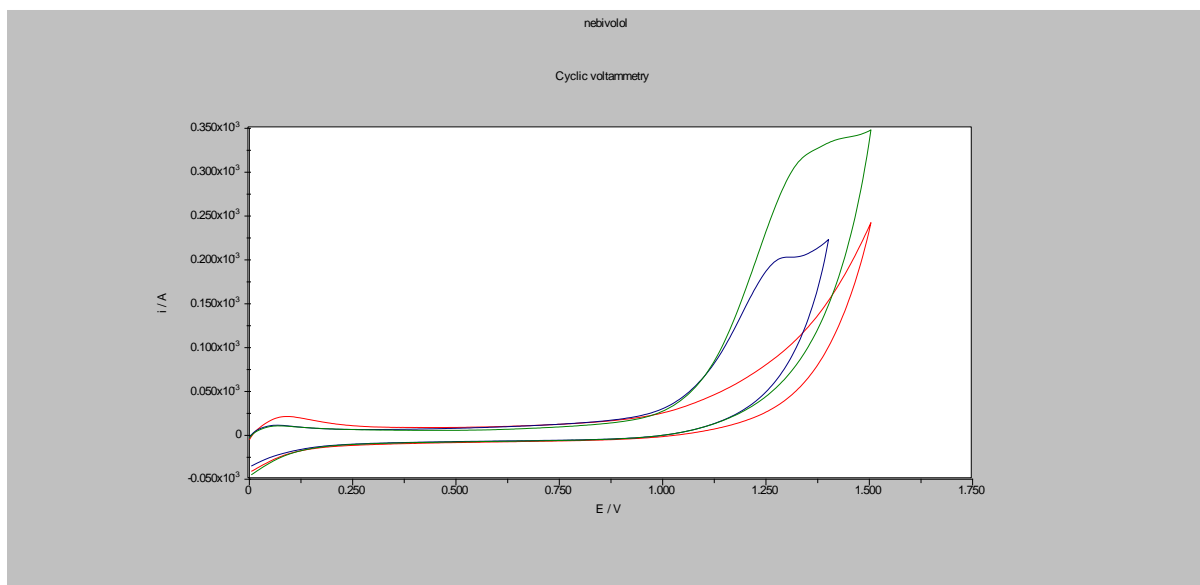
Slika 21. Diferencijalno pulsni voltamogram nebulolola koncentracije 5×10^{-5} M, snimljen u Britton – Robinson puferu pH 6 na GC elektrodi modificiranoj suspenzijom grafena u etanolu

Ponovljeno je mjerenje u istoj otopini nebulolola diferencijalno pulsnom voltametrijom s GC elektrodom modificiranom s 10 μ L suspenzije grafena u etanolu. Primjenjena je širina pulsa od 50 ms, amplituda pulsa 25 mV te brzina promjene potencijala 20 mV/s. Na slici 21. prikazan je dobiveni pik, koji je karakteriziran veličinama $E_p = 0.91$ V i $i_p = 18.5$ μ A.



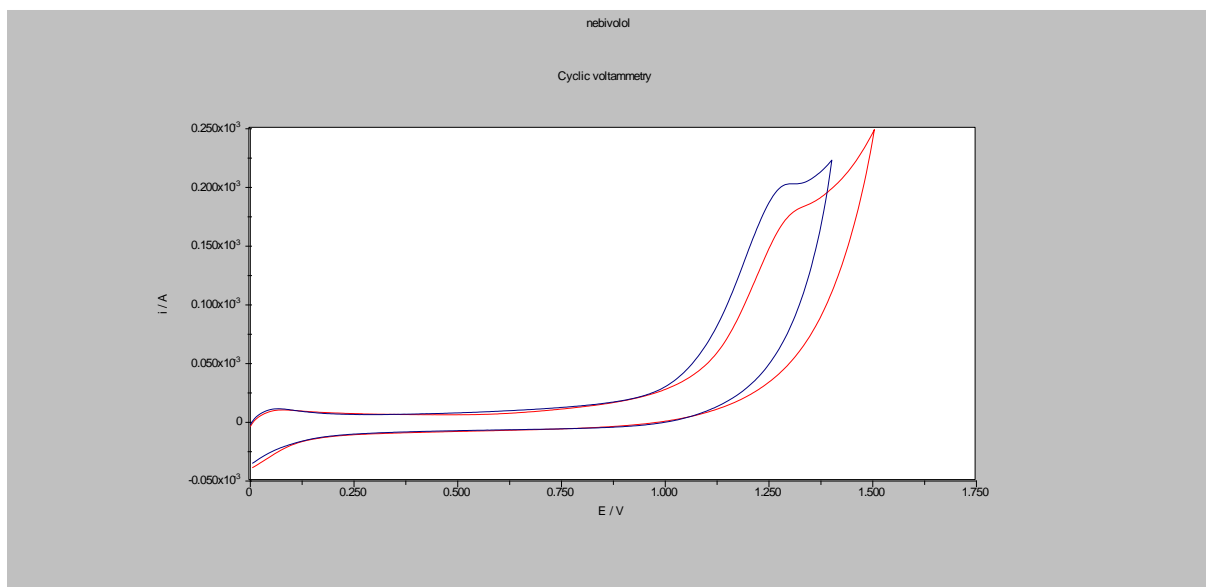
Slika 22. Ciklički voltamogrami nebigolola koncentracije 5×10^{-5} M, snimljeni GC elektrodom modificiranom suspenzijom grafena u 0.1% - tnom Nafionu, u Britton – Robinson puferu pH 1.8 (crveno) i Britton – Robinson puferu pH 6 (plavo)

Na slici 22. uspoređeni su ciklički voltamogrami otopine nebigolola ($c = 5 \times 10^{-5}$ M) koji su snimljeni GC elektrodom modificiranom suspenzijom grafena u 0.1 % - tnom Nafionu (10 μ L). Uvjeti mjerenja (raspon potencijala 0 – 1.4 V i brzina promjene potencijala 100 mV/s) su bili isti, dok je pH Britton – Robinson pufera znatno različit. Pri pH pufera od 1.8 nazire se oksidacijski pik nebigolola, no primjetni su i redoks vrhovi osnovnog elektrolita. Pri pH 6 pik oksidacije nebigolola je vrlo slabo primjetan, no vrhovi redukcije i oksidacije osnovnog elektrolita nisu vidljivi. Britton – Robinson pufer pH 6 odabran je kao optimalan za daljnja mjerenja.



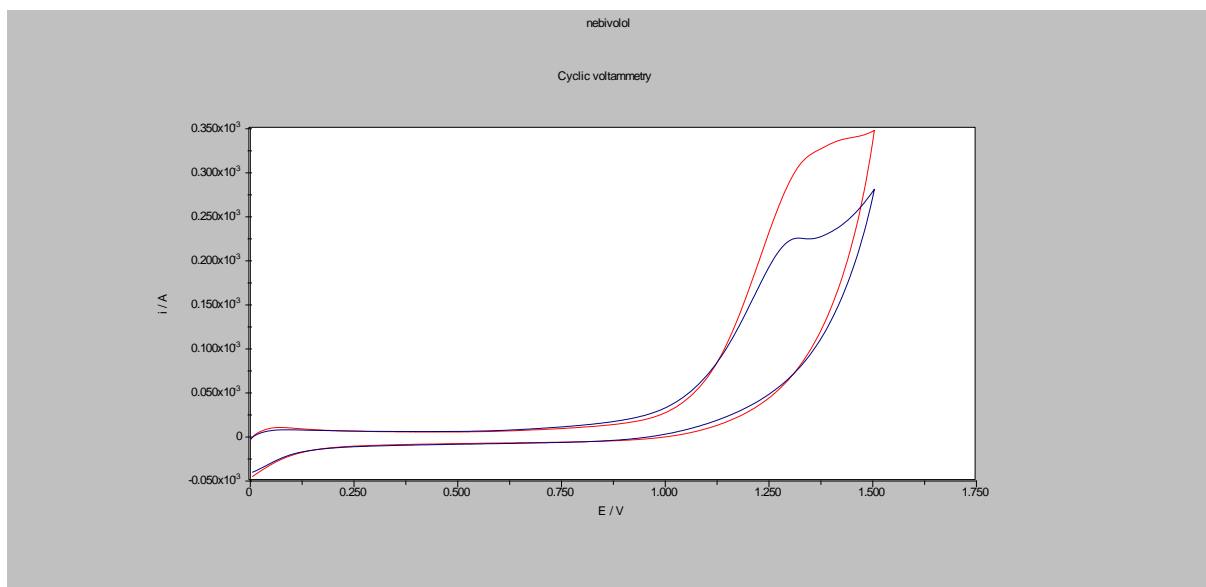
Slika 23. Ciklički voltamogrami nebulolola koncentracije 5×10^{-5} M, osnovni elektrolit; Britton – Robinson pufer pH 6 (crveno), snimljeno GC elektrodom modificiranom ugljikovim nanocjevčicama u 0.3% - tnom Nafionu (plavo) i GC elektrodom modificiranom ugljikovim nanocjevčicama u 0.3% - tnom Nafionu nakon akumulacije (zeleno)

Osjetljivost voltametrijske tehnike moguće je povećati akumulacijom analita na površinu stacionarne elektrode. (Mirčeski, 2007.). Kako bi se ispitalo dolazi li do adsorpcije nebulolola na površinu elektrode izvršena su tri mjerenja. Prvo mjerenje provedeno je na samom osnovnom elektrolitu, Britton – Robinson puferu pH 6. Rezultati nisu pokazali pik, prema očekivanjima. Drugo mjerenje izvršeno je u otopini nebulolola, koncentracije 5×10^{-5} M, GC elektrodom modificiranom suspenzijom ugljikovih nanocjevčica u 0.3% - tnom Nafionu (5 μ L). Dobiveni pik karakteriziraju vrijednosti $E_p = 1.29$ V, $i_p = 18.6$ μ A. Treće mjerenje, provedeno je u istoj otopini pri istim uvjetima mjerenja kao i kod prethodna dva (raspon napona 0 – 1.4 V, brzina promjene napona 100 mV/s) uz akumulaciju lijeka. Kao što je vidljivo na slici 23., pik dobiven nakon 120 s akumulacije, pri potencijalu 0.5 V, značajno je više struje nego pik dobiven bez akumulacije, no nije dobro definiran te nije bilo moguće očitati karakteristične vrijednosti.



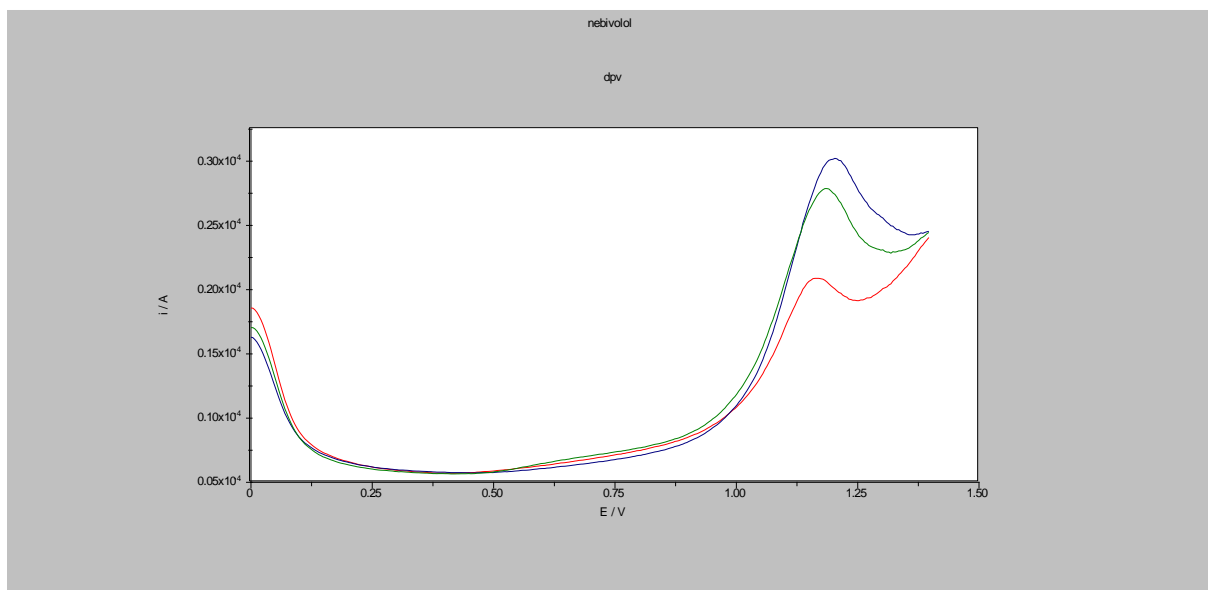
Slika 24. Ciklički voltamogrami nebulolola koncentracije 5×10^{-5} M, snimljeni GC elektrodom modificiranom ugljikovim nanocjevčicama u 0.3% - tnom Nafionu (5 μ L) (plavo) i ugljikove nanocjevčice u 0.3% Nafionu (5 μ L) uz dodatak bizmutovih nanočestica u 0.1% Nafionu (10 μ L) (crveno)

Na slici 24. su prikazani voltamogrami nakon mjerenja otopine nebulolola kako bi se ispitalo utjecaj ugljikovih nanocjevčica i nanočestica bizmuta na voltametrijski odgovor nebulolola. Dok ugljikove nanocjevčice povećavaju struju vrha, dodatak nanočestica metala nema značajniji utjecaj na struju oksidacije nebulolola.



Slika 25. Ciklički voltamogram nebulola koncentracije 5×10^{-5} M, snimljeno GC elektrodom modificiranom ugljikovim nanocjevčicama u 0.3% - tnom Nafionu ($5 \mu\text{L}$) nakon 120 s akumulacije (crveno) i GC elektroda modificirana ugljikovim nanocjevčicama uz dodatak bizmutovih nanočestica u 0.1% - tnom Nafionu ($10 \mu\text{L}$) nakon 120 s akumulacije (plavo)

Prethodnim mjerenjima (Slika 23.) pokazano je da se nebulol akumulira na površinu elektrode, pa su iduće uspoređeni ciklički voltamogramu dobiveni nakon mjerenja otopine nebulola nakon jednakog vremena akumulacije, ali na različito modificiranim elektrodama primjenom nanomaterijala. Uvjeti mjerenja nisu bili mjenjani u odnosu na ranija mjerenja. Modifikacija GC elektrode suspenzijom ugljikovih nanocjevčica u 0.3% - tnom Nafionu uz 120 s akumulacije pokazala je pik veće struje, ali slabije definicije od pika dobivenog korištenjem GC elektrode modificirane kombinacijom ugljikovih nanocjevčica i bizmutovih nanočestica, također nakon 120 s akumulacije (Slika 25.). Osim toga voltametrijski vrh nebulola pomaknut je prema manje pozitivnim vrijednostima potencijala zbog katalitičkog učinka bizmutovih nanočestica.



Slika 26. Ciklički voltamogrami otopine nebulolola koncentracije 5×10^{-5} M, snimljeno GC elektrodom modificiranom kombinacijom ugljikovih nanocjevčica i bizmutovih nanočestica u 0.1% - tnom Nafionu bez akumulacije (crveno), nakon 120 s (zeleno) te nakon 240 s (plavo) akumulacije

Diferencijalno pulsni voltamogrami uspoređeni (Slika 26.) su nakon različitog vremena akumulacije kako bi se provjerilo znači li dulje vrijeme akumulacije proporcionalno povećanu osjetljivost. GC elektroda modificirana je ugljikovim nanocjevčicama i bizmutovim nanočesticama u 0.1% - tnom Nafionu ($10 \mu\text{L}$), pri uvjetima širine pulsa 50 ms, amplitude pulsa 25 mV i brzini promjene potencijala 20 mV/s.

Potencijal akumulacije bio je 0.5 V, a akumulacija 0, 120 i 240 s. Rezultati pokazuju da se nebulolol akumulira na ugljikovim nanocjevčicama, najveća akumulacija primjećuje se nakon 120 sekundi, dok nakon idućih 120 sekundi također dolazi do akumulacije, ali u manjem obimu. Strujni vrh očitani nakon 120 s akumulacije ima karakteristične vrijednosti $E_p = 1.17$ V i $i_p = 10.4 \mu\text{A}$.

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu ispitivane su mogućnosti primjene različitih modifikacija površine elektrode od staklastog ugljika nanomaterijalima za određivanje lovastatina i neбиволола.

Rezultati mjerenja u otopini lovastatina dobiveni primjenom GC elektrode s različito modificiranom površinom pokazuju da je najizraženiji voltametrijski odgovor dobiven primjenom ugljikovih nanocjevčica kao modifikatora površine elektrode. Britton – Robinson pufer korišten je kao osnovni elektrolit, a kao optimalan odabran je pH 6. Problem teške topljivosti lovastatina riješen je dodatkom acetonitrila u koncentraciji od 5%. Također su izvršena i mjerenja s dodatkom bizmutovih nanočestica na površinu elektrode, ali značajno poboljšanje voltametrijskog odgovora nije zabilježeno, jedino je primjećen katalitički učinak bizmutovih nanočestica.

Ciklički i diferencijalno pulsni voltamogrami dobiveni mjerenjem u otopini neбиволола pokazuju da se najintenzivniji strujni vrh može očekivati ako se površina elektrode od staklastog ugljika modificira grafenom u etanolu. Kao osnovni elektrolit odabran je Britton – Robinson pufer pH vrijednosti 6. Također, nakon mjerenja ustanovljeno je da se neбиволола akumulira na površinu modificirane elektrode, a najizraženiji strujni vrh dobiven je nakon perioda akumulacije od 120 s na GC elektrodu modificiranu ugljikovim nanocjevčicama u Nafionu.

Ispitivana je i kombinacija ugljikovih nanocjevčica i bizmutovih nanočestica kao modifikacija površine elektrode, no pokazalo se da dodatak nanočestica metala nema značajniji utjecaj na struju oksidacije neбиволола iako je primjećeno da je voltametrijski vrh neбиволола pomaknut prema manje pozitivnim vrijednostima potencijala zbog katalitičkog učinka bizmutovih nanočestica.

Zaključno, izvršena mjerenja pokazuju velik potencijal primjene nanomaterijala kao modifikatora površine elektrode od staklastog ugljika u elektroanalitici. Kako bi se razvila nova metoda za određivanje lovastatina i neбиволола potrebno je detaljno optimirati parametre.

6. LITERATURA

1. Mirošević Skvrce N, Andrić A, Macolić Šarinić V. Rizici primjene dodataka prehrani koji sadrže crvenu rižu u bolesnika koji su iskusili nuspojave na lijekove iz skupine statina. *Farm glas*, 2012, 68, 108-113.
2. Dekanski A, Jovanović M. V, Nikolić Ž. B, Stevanović J, Stevanović R. Glassy carbon electrodes, *Carbon*, 2001, 39, 1195-1205.
3. Nigović B, Behetić S. Elektroanalitika u farmaciji. *Farm glas*, 2007, 63, 163-175.
4. Liu L, Du M, Pan H, Xie W, Wang J. Glassy carbon electrode modified with Nafion – Au colloids for clenbuterol electroanalysis. *Electrochimica Acta*, 2010, 55, 7240-7245.
5. Nigović B, Bačić – Vrca V, Fabijanić P. Statini. *Farm glas*, 2007, 63, 315-331.
6. Tsai Y, Chen J, Li S, Marken F. Electroanalytical thin film electrodes based on a Nafion – multi-walled carbon nanotube composite. *Electrochemistry Communications*, 2004, 6, 917-922.
7. Yang X, Ding Y, Fei J, Feng B, He X, Li F. Carbon nanomaterial based electrochemical sensors for biogenic amines. *Microchim Acta*, 2013, 180, 935-956.
8. Sudakova L. A, Malakhova N. A, Stozhko N. Yu. Bismuth Nanoparticles in Stripping Voltammetry of Sulfide Ions. *Electroanalysis*, 2014, 26, 1445-1448.
9. Campbell F. W, Compton R. W. The use of nanoparticles in electroanalysis: an updated review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 396, 241-259.
10. Mauritz K. A, Moore R. B. State of Understanding of Nafion. *Chem. Rev.*, 2004, 104, 4535-4586.
11. Shao Y, Wang J, Wu H, Liu J, Aksay I.A, Lin Y. Graphene Based Electrochemical Sensors and Biosensors: A Review. *Electroanalysis*, 2010, 22, 1027-1036.
12. Katzung B. G, Masters S. B, Trevor A. J. Basic and Clinical Pharmacology, San Francisco, 2011, str. 626.
13. Wang J, Analytical Electrochemistry. Wiley – VCH Pub, New York, 2000, str. 68.
14. Nebivolol, 2011., <http://www.plivamed.net>, pristupljeno 30.5.2015.
15. Registrirani lijekovi s nebivololom, 2015., <http://www.halmed.hr>, pristupljeno 30.5.2015.

16. Mirčeski V, Komorsky – Lovrić Š, Lovrić M. Square – wave voltammetry: theory and application. Berlin, Springer, 2007.
17. Thostenson E.T, Chou T.W, Ren Z. Advances in the science and technology of carbon nanotubes and their composites: a review. *Composites Science and Technology*, 2001,61, 1899-1912.
18. Lovastatin, 2015., <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, pristupljeno 29.5.2015.
19. Upotreba lovastatina, 2015., <http://www.webmd.com>, pristupljeno 29.5.2015.
20. Nebivolol, 2015., <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, pristupljeno 31.5.2015.
21. Struktura nebivolola, 2014. <http://www.chemicalbook.com>, pristupljeno 1.6.2015.
22. Mehanizam djelovanja nebivolola, 2011., <http://www.plivamed.net>, pristupljeno 1.6.2015.
23. Voltamogram u diferencijalno pulsnoj voltametriji, 2012., <http://chemwiki.ucdavis.edu>, pristupljeno 5.6.2015.
24. Općeniti prikaz cikličkog voltamograma, 2005., <http://wiki.edaq.com>, pristupljeno 6.6.2015.
25. Promjena potencijala u cikličkoj voltametriji, 2014., <http://chemwiki.ucdavis.edu>, pristupljeno 6.6.2015.
26. Struktura Nafiona, 2011., <https://www.polymersolutions.com>, pristupljeno 10.6.2015.
27. Struktura lovastatina, 2012., <http://pubs.acs.org>, pristupljeno 15.6.2015.
28. Welch C. M, Compton R. G. The use of nanoparticles in electroanalysis: a review. *Anal Bioanal Chem*, 2006, 384, 601-619.
29. Nafion, 2014., <http://www.permapure.com>, pristupljeno 10.6.2015.
30. Slika različitih slojeva grafena, 2008., <http://spie.org>, pristupljeno 6.6.2015.
31. Zittel H. E, Miller F. J. A Glassy-Carbon Electrode for Voltammetry. *Anal. Chem*, 1965, 37, 200-203.

7. SAŽETAK / SUMMARY

7.1. Sažetak

Lovastatin je hipolipemik iz skupine statina, kompetitivnih inhibitora HMG CoA reduktaze. Koristi za snižavanje „lošeg“ kolesterola (LDL-C) i povišenje „dobrog“ kolesterola (HDL).

Nebivolol je kardioselektivan antagonist β_1 receptora i spada u treću generaciju β blokatora. Koristi se za liječenje esencijalne hipertenzije, kroničnog zatajenja srca, aritmija te angine pectoris.

U ovom radu promatrani su utjecaji različitih modifikacija nanomaterijalom površine elektrode od staklastog ugljika na voltametrijski odgovor lovastatina, odnosno nebirolola u otopini. Korištene modifikacije bile su nano dimenzija i to: grafen, ugljikove nanocjevčice i bizmutove nanočestice. Navedeni nanomaterijali bili su dispergirani u otopinama Nafiona u etanolu. Prilikom mjerenja, mijenjani su i uvjeti u otopini lovastatina i nebirolola kao što su pH pufera, udio organskog otapala i vrijeme akumulacije analita na modificiranu površinu elektrode od staklastog ugljika. Mjerenja su provedena cikličkom i diferencijalno pulsnom voltametrijom.

Svrha ispitivanja bila je utvrditi postoji li mogućnost primjene navedenih modifikacija površine elektrode od staklastog ugljika za razvoj nove elektroanalitičke metode za određivanje lovastatina i nebirolola.

7.2. Summary

Lovastatin is a hypolipidemic agent. It belongs to a group of competitive inhibitors of HMG CoA reductase, also called statins. Lovastatin is used for lowering the „bad“ cholesterol (LDL-C) and increasing the „good“ cholesterol (HDL).

Nebivolol is cardioselective β_1 antagonist and belongs to a group of third - generation beta blockers. It is used for treatment of essential hypertension, chronic heart failure, arrhythmias, and angina pectoris.

In this paper, effects of different nanomodifications of GCE surface on voltammetric response of lovastatin and nebivolol were observed. Used modifiers were nano – sized: graphene, Carbon nanotubes and Bismuth nanoparticles, all of them were dispersed in Nafion solutions. During measurements, conditions in lovastatin i nebivolol solutions were changed: pH, content of organic solvent and accumulation time of analyte on modified surface of glassy carbon electrode. Measurements were carried out by cyclic and differential pulse voltammetry.

8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

UTJECAJ MODIFIKACIJA POVRŠINE ELEKTRODE NANOMATERIJALOM NA VOLTAMETRIJSKI ODGOVOR LOVASTATINA I NEBIVOLOLA

Nuša Kujundžić

SAŽETAK

Lovastatin je hipolipemik iz skupine statina, kompetitivnih inhibitora HMG CoA reduktaze. Koristi za snižavanje „lošeg“ kolesterola (LDL-C) i povišenje „dobrog“ kolesterola (HDL).

Nebivolol je kardioselektivan antagonist β_1 receptora i spada u treću generaciju β blokatora. Koristi se za liječenje esencijalne hipertenzije, kroničnog zatajenja srca, aritmija te angine pectoris.

U ovom radu promatrani su utjecaji različitih modifikacija nanomaterijalom površine ugljikove elektrode od staklastog ugljika na voltametrijski odgovor lovastatina, odnosno nebivolola u otopini. Korištene modifikacije bile su nano dimenzija i to: grafen, ugljikove nanocjevčice i bizmutove nanocestice. Navedeni nanomaterijali bili su dispergirani u otopinama Nafiona u etanolu. Prilikom mjerenja, mijenjani su i uvjeti u otopini lovastatina i nebivolola kao što su pH pufera, udio organskog otapala i vrijeme akumulacije analita na modificiranu površinu elektrode od staklastog ugljika. Mjerenja su provedena cikličkom i diferencijalno pulsnom voltametrijom.

Svrha ispitivanja bila je utvrditi postoji li mogućnost primjene navedenih modifikacija površine elektrode od staklastog ugljika za razvoj nove elektroanalitičke metode za određivanje lovastatina i nebivolola.

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

Rad sadrži: 53 stranice, 26 grafičkih prikaza i 31 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Lovastatin, nebivolol, ciklička voltetrija, diferencijalna pulsna voltetrija, nanomaterijalima modificirana elektroda

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Biljana Nigović**, redovita profesorica Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.
Dr. sc. Željko Maleš, redoviti profesor Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.
Dr. sc. Ana Mornar Turk, izvanredna profesorica Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rad prihvaćen: rujan 2015.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

THE INFLUENCE OF NANOMATERIAL BASED ELECTRODE SURFACE MODIFICATIONS ON VOLTAMMETRIC RESPONSE OF LOVASTATIN AND NEBIVOLOL

Nuša Kujundžić

SUMMARY

Lovastatin is a hypolipidemic agent. It belongs to a group of competitive inhibitors of HMG CoA reductase, also called statins. Lovastatin is used for lowering the „bad“ cholesterol (LDL-C) and increasing the „good“ cholesterol (HDL).

Nebivolol is cardioselective β_1 antagonist and belongs to a group of third - generation beta blockers. It is used for treatment of essential hypertension, chronic heart failure, arrhythmias, and angina pectoris.

In this paper, effects of different nanomodifications of GCE surface on voltammetric response of lovastatin and nebivolol were observed. Used modifiers were nano – sized: graphene, carbon nanotubes and bismuth nanoparticles, all of them were dispersed in Nafion solutions. During measurements, conditions in lovastatin i nebivolol solutions were changed: pH, content of organic solvent and accumulation time of analyte on modified surface of glassy carbon electrode. Measurements were carried out by cyclic and differential pulse voltammetry.

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

Thesis includes: 53 pages, 26 figures and 31 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Lovastatin, nebivolol, cyclic voltammetry, differential pulse voltammetry, electrode, nanomaterial surface modifier

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
Ana Mornar Turk, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2015.