

Elektroanalitika u farmaciji

Nigović, Biljana; Behetić, Sandra

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 2007, 63, 163 - 175**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljeni verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:612420>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Repository / Repozitorij:

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



Elektroanalitika u farmaciji

BILJANA NIGOVIĆ, SANDRA BEHETIĆ

Zavod za analitiku i kontrolu lijekova Farmaceutsko-bioteknološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

UVOD

Elektroanalitičke metode imaju široku primjenu u farmaciji (1). U ranoj fazi istraživanja i razvoja lijekova upotrebljavaju se u elektroorganskoj sintezi farmakološki zanimljivih molekula i u ispitivanju njihovog učinka korelacijom redoks potencijala i aktivnosti. Poznavanje mehanizma redoks reakcije može razjasniti mehanizam djelovanja lijeka i njegove biotransformacije reakcijama prijenosa elektrona. Elektroanalitičkim tehnikama mogu se pratiti interakcije lijekova s metalnim ionima, proteinima ili DNA.

Uspješno se primjenjuju za identifikaciju i određivanje ljekovitih tvari u različitim uzorcima, od farmaceutskih sirovina, različitih ljekovitih oblika, do bioloških tekućina nakon terapijskih doza. Uglavnom nije potrebno prethodno provesti postupke odjeljivanja, što je jedna od velikih prednosti elektroanalitičkih metoda. To su metode visoke osjetljivosti, točnosti i preciznosti. Omogućuju selektivnu detekciju ljekovitih tvari, pri čemu selektivnost ovisi o dostupnom rasponu potencijala elektroaktivnih tvari.

ELEKTROANALITIČKE METODE

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 (2). Prema signalu pobude, čija je posljedica odvijanje elektrokemijske reakcije na radnoj elektrodi i mjerenoj varijabli iz koje se dobiva željeni analitički ili drugi podatak o ispitivanoj otopini, dijele se na: potenciometriju, voltametriju, kronoamperometriju, elektrogravimetriju, kronopotencimetriju, kulometriju i konduktometriju.

Primjenjuju se u različitim stadijima istraživanja i razvoja lijekova. Neke se primjenjuju u Europskoj farmakopeji (3). Potenciometrijskom titracijom određuje se sadržaj ljekovitih i pomoćnih tvari u mnogim farmakopejskim postupcima. Potenciometrijski se određuje sadržaj onečišćenja u farmaceutskim tvarima (primjerice fluorida u kalcijevom askorbatu i izofluranu, jodida u diosminu). Potenciometrijskim mjeranjem pH vrijednosti ograničavaju se kisela ili lužnata onečišćenja u ljekovitim i pomoćnim tvarima koja potječu iz postupka proizvodnje ili nastaju u razgradnji tvari. Amperometrijskom titracijom određuje se točka ekvivalencije u postupku određivanja vode u ljekovitim tvarima

Karl-Fischerovom titracijom (primjerice, u ispitivanju čistoće cefaleksina, betametazon acetata, ciprofloxacin hidroklorida, klindamicin fosfata, itd.). Konduktometrijski se određuje čistoća farmaceutske vode mjerjenjem njezine vodljivosti i čistoća farmaceutskih tvari (određivanje onečišćenja ionskim spojevima u ioheksolu, heparinu male molekulske mase, manitolu, sorbitolu, saharozi).

Elektrokemijski senzori primjenjuju se u rutinskim analizama (4), a danas je jedan od najpoznatijih biosenzora na bazi enzima amperometarski senzor glukoze koji se upotrebljava u kućnoj uporabi i kliničkim laboratorijima za uobičajeno određivanje glukoze u krvi.

VOLTAMETRIJA

Voltametrija obuhvaća skupinu elektroanalitičkih tehniki koje su se počele razvijati otkrićem polarografije 1922. češkog kemičara Jaroslava Heyrovskyg, dobitnika Nobelove nagrade 1959. Voltametrija se temelji na mjerenu struje radne elektrode nastale kontinuiranim mijenjanjem njezinog potencijala. Prikaže li se ovisnost struje o potencijalu, dobiva se voltamogram. Najčešće se primjenjuju voltametrijske metode: ciklička, diferencijalna pulsna, pravokutnovalna i *stripping* voltametrija (metoda otapanja prekoncentriranog analita), kao i različite vrste polarografije koje se od ostalih voltametrijskih tehniki razlikuju po tome što radna mikroelektroda ima oblik kapajuće živine elektrode (2).

Voltametrijske metode primjenjuju se u kvantitativnoj analizi organskih i anorganiskih tvari u vodenim i nevodenim medijima, za određivanje redoks potencijala, istraživanje kinetike i mehanizma redoks reakcija, kao i za elektrokemijsku detekciju eluiranih analita u tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti (HPLC).

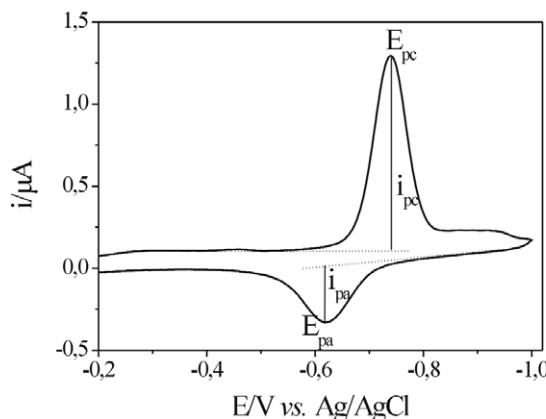
Osnovne su jedinice modernog voltametrijskog instrumenta, osim računala, potenciostat i elektrokemijski članak. Zadaća je potenciostata nametnuti potencijal i izmjeriti jakost struje. Elektrokemijski članak služi kao nosač otopine analita u koju su uronjene elektrode. U otopinu analita može se dodati ionska otopina koja povećava vodljivost. U voltametrijskim mjerjenjima upotrebljavaju se tri elektrode: radna elektroda, pomoćna ili protuelektroda i referentna elektroda. Potencijal se mjeri između radne i referentne elektrode (kontrolira se signal pobude), a struja između radne i protuelektrode (mjeri se signal odziva). U voltametriji se upotrebljavaju elektrode koje konstantnom površinom osiguravaju reproducibilnost mjerjenja.

Na radnoj elektrodi se odvija redoks reakcija. Reakcije redukcije najčešće se proučavaju na kapajućoj ili statičnoj živinoj elektrodi, visećoj živinoj kapi ili živinoj film elektrodi. Krute elektrode rabe se za oksidacijske procese. Postoji više vrsta krutih elektroda, npr. staklasta ugljikova elektroda, grafitna elektroda impregnirana voskom, ugljikova, plinska, zlatna elektroda, itd. Općenito, radnu elektrodu u voltametriji karakterizira malena površina, koja pospješuje polarizaciju. Drugi je razlog za primjenu elektroda malih površina smanjenje razgradnje analita elektrolizom. Izbor radne elektrode veoma je važan za osjetljivost i reproducibilnost mjerjenja.

Ciklička voltametrija

Ciklička se voltametrija primjenjuje za istraživanje kinetike i mehanizama redoks reakcija, određivanje redoks potencijala i broja izmijenjenih elektrona, istraživanje adsorpcionih procesa i kemijskih reakcija koje prethode ili slijede prijenos elektrona (2). Rijetko se rabi za kvantitativne analize lijekova, jer u optimalnim uvjetima granica detekcije iznosi 10^{-5} - 10^{-6} M.

Potencijal radne elektrode mijenja se linearno, a kada dosegne određenu vrijednost, mijenja se smjer promjene potencijala. Pritom se mjeri struja koja protječe kroz članak. Jakost će struje rasti kako se potencijal približava redoks potencijalu analita. Promjenom potencijala preko karakterističnog potencijala redoks procesa nastaje strujni vrh (slika 1.), a nakon tog dolazi do pada jakosti struje zbog smanjenja koncentracije analita u blizini elektrode. Povratkom potencijala na početnu vrijednost dolazi do oksidacije/redukcije produkata nastalih u prvoj polovici ciklusa. Oblik cikličkog voltamograma ovisi o brzina- ma prijenosa elektrona, prijenosa tvari i kemijskim reakcijama koje prate redoks reakcije.



Slika 1. Ciklički voltamogram olsalazina na elektrodi s visećom živinom kapi u Britton-Robinson puferu pri pH 10; brzina promjene potencijala 500 mV/s^{-1} (5).

Važni su parametri u cikličkoj voltametriji potencijali vrha redukcije (E_{pc}) i oksidacije (E_{pa}) i vršne jakosti struje (i_{pc} i i_{pa}). Potencijal vrha je vrijednost karakteristična za svaki spoj, a korelira s njegovom sposobnošću da prima ili daje elektrone. Ako je proces prijenosa elektrona brz, s obzirom na druge procese u otopini (npr. difuziju), reakcija je reverzibilna. Broj izmijenjenih elektrona može se odrediti iz razlike potencijala vrhova:

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

Pri 25°C , za redoks reakciju prijenosa n elektrona ΔE_p iznosi $0,0592 / n \text{ V}$, odnosno 60 mV za jedan elektron.

Randles-Ševčikova jednadžba povezuje koncentraciju i vršnu jakost struje:

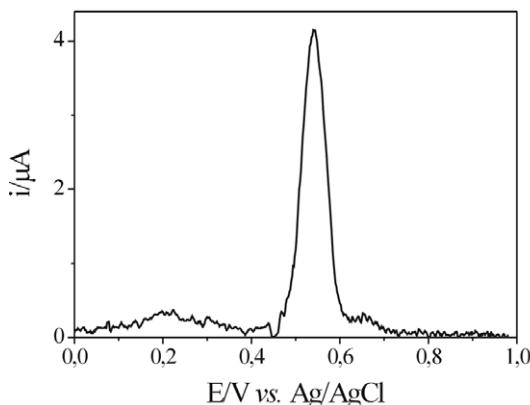
$$i_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A c_0 D^{1/2} v^{1/2}$$

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

Diferencijalna pulsna voltametrija

Diferencijalna pulsna voltametrija pulsna je tehnika za određivanje vrlo niskih koncentracija elektroaktivnih komponenata u farmaceutskim uzorcima, tkivima i biološkim tekućinama (6). Pulsevi odredene veličine, dodani na linearni nagib potencijala, primjenjeni su na radnu elektrodu. Struja se mjeri izravno prije primjene pulsa i na kraju pulsa te se bilježi razlika između tih izmjerenih vrijednosti kao funkcija potencijala.

Diferencijalni pulsni voltamogrami imaju jasno izražene vrhove, pa su pogodni za analitičke svrhe (slika 2). Granica detekcije iznosi otprilike 10^{-8} M pa je tehnika dovoljno osjetljiva za analizu lijekova u biološkim tekućinama nakon terapijskih doza (7).



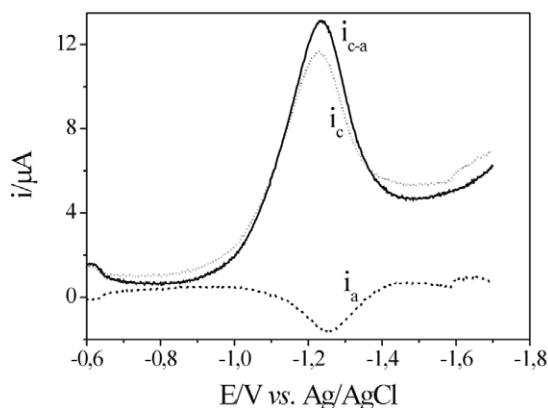
Slika 2. Diferencijalno-pulsni voltamogram mesalazina na staklastoj ugljikovoj elektrodi u Britton-Robinson puferu pri pH 1,8 (8).

Pravokutnovalna voltametrija

Najveća je prednost pravokutnovalne voltametrije njezina velika brzina. Frekvencije od 1 do 100 ciklusa u sekundi dopuštaju upotrebu ekstremno brzih promjena potencijala. Vrijeme analize time se skraćuje te cijeli voltamogram može biti snimljen za nekoliko sekundi, dok je kod diferencijalne pulsne voltametrije potrebno nekoliko minuta.

Signal pobude dobiva se kad se niz pravokutnovalnih pulseva doda na stepeničasti signal potencijala (2). Struja se mjeri dvaput tijekom svakog ciklusa, jednom na početku polaznoga pulsa i drugi put na kraju pulsa suprotnoga smjera. Za reverzibilnu reakciju redukcije veličina pulsa dovoljna je da se oksidacija produkta stvorenog na polaznom pul-

su dogodi za vrijeme pulsa suprotnoga smjera, stoga se tehnika može primjenjivati i za istraživanje mehanizma prijenosa elektrona. Polazni puls proizvodi katodnu struju, a povratni puls stvara anodnu struju. Razlika tih struja razmjerna je koncentraciji analita u otopini, a potencijal maksimuma može se upotrijebiti za potvrdu identiteta analita (slika 3.) Pravokutnovalna voltametrija pogodna je za brza, jednostavna i točna određivanja ljekovitih tvari u farmaceutskim ili biološkim uzorcima.



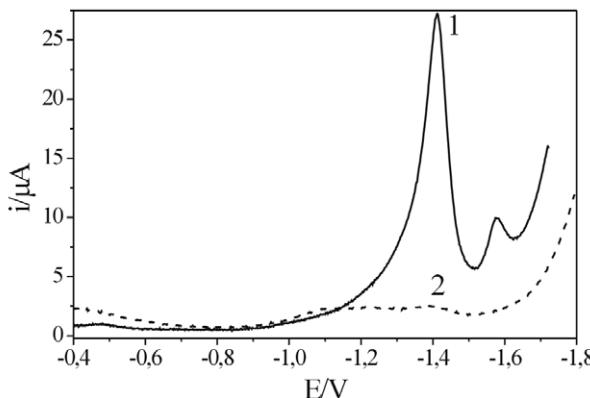
Slika 3. Pravokutnovalni voltamogram pravastatina na elektrodi s visećom živinom kapi u Britton-Robinson pufuru pri pH 7; frekvencija pulsa 400 Hz (9).

Stripping voltametrija

U analizi uzoraka s koncentracijom analita ispod granice detekcije primjenjene metode, često je potrebno upotrijebiti neku vrstu ukoncentriravanja analita prije samog određivanja. *Stripping voltametrija* uključuje elektrolitičko ili adsorpcijsko pretkoncentriranje analita na površinu elektrode prije voltametrijskog mjerjenja (2). Analit se istaloži na radnoj elektrodi pri određenom potencijalu iz otopine koja se mijеša. Nakon određenoga vremena (vrijeme akumulacije), mijеšanje se zaustavlja te se istaloženi analit određuje voltametrijski. Analit se otapa s elektrode (engl. *stripping*) primjenom promjene potencijala. Mjerjenje, odnosno promjena potencijala, može se obaviti primjenom diferencijalne pulsne ili pravokutnovalne voltametrije. Ovisno o promjeni potencijala, istaloženi analit se oksidira (anodna *stripping voltametrija*) ili reducira (katodna *stripping voltametrija*) natrag u otopinu, a struja snimljena tijekom ovoga koraka proporcionalna je koncentraciji analita na elektrodi. Koncentracija analita na površini elektrode veća je nego u otopini te se može odrediti vrlo male koncentracije (10^{-8} do 10^{-11} M).

U analitici lijekova najčešće se analit istaloži na površini elektrode adsorpcijom (10). Stoga se tehnika naziva voltametrija s adsorptivnom akumulacijom (engl. *adsorptive stripping voltammetry*). U elektrokemiji adsorpcija je čvrsto vezanje molekula ili iona iz otopine na površini radne elektrode pri čemu se stvara monomolekularni sloj adsorbiranih molekula. Voltametrijski odaziv izravno ovisi o količini adsorbiranih čestica (slika 4). Tijekom akumulacije treba primjeniti optimalne uvjete za adsorpciju analita da bi se pos-

tigla maksimalna osjetljivost metode. Visina strujnoga vrha ovisi o mnogo čimbenika, kao što su vrsta i površina elektrode, vrijeme i potencijal akumulacije, svojstva analita, otapalo, ionska jakost, pH i temperatura.



Slika 4. Pravokutnovalni voltamogram simvastatina na elektrodi s visećom živinom kapi u 0,1 M fosfatnom puferu pri pH 7 prije (1) i nakon (2) akumulacije od 30 sekundi (11).

Da bi se povećala selektivnost metode, adsorpcija analita može se izvesti uranjanjem elektroda u miješanu otopinu uzorka tijekom zadanoga vremena akumulacije. Elektrode se potom isperu i premjeste u čistu otopinu osnovnog elektrolita u kojem se provodi voltametrijsko mjerjenje. Analit je koncentriran na elektrodi, a mjerjenje se provodi u čistom otapalu pa nema interferencija matrice uzorka.

Voltametrija s adsorptivnom akumulacijom popularna je u analizi ljekovitih tvari zbog visoke osjetljivosti, selektivnosti, točnosti i preciznosti, kao i zbog niskih troškova analize u usporedbi s ostalim analitičkim metodama (12).

ELEKTROANALITIČKO ODREĐIVANJE LJEKOVITIH TVARI

Elektroanalitičke metode se primjenjuju za rješavanje različitih problema u analitici lijekova. Ljekovite tvari moraju se reducirati/oksidirati u dosegu promjene potencijala radne elektrode, dok otapalo i elektrode u tom rasponu promjene potencijala moraju biti inertni. Ako ljekovita tvar ne sadrži funkcionalnu skupinu podložnu oksidaciji ili redukciji, derivatizacijom se može prevesti u elektroaktivnu. Funkcionalne grupe, poput nitro, nitrozo, azo, azoksi, azometinske, kao i aktivirani karbonili i dvostrukе veze mogu se analizirati elektrokemijski. Primjerice, propranolol i lizinopril mogu se uspješno određivati elektrokemijski nakon što se kemijskom reakcijom prevedu u nitro i nitrozo derivate koji se reduciraju na živinoj elektrodi (13).

Voltametrijske metode primjenjuju se za identifikaciju elektroaktivne molekule lijeka, identifikaciju i istraživanje razgradnih produkata ljekovitih tvari i za određivanje lijekova u različitim uzorcima. Za identifikaciju ljekovite tvari na temelju njezinog redoks potenci-

jala, osim opisanih voltametrijskih metoda, rabi se i abrazivna voltametrija otapanja. Krute mikročestice lijeka mehanički se imobiliziraju na površini grafitne elektrode, koja se potom uroni u otopinu elektrolita. Takva tehnika omogućuje izravnu potvrdu identiteta lijekova netopljivih u vodi i identifikaciju aktivne tvari u farmaceutskim oblicima bez prethodne obrade uzorka (14).

Elektroanalitika se primjenjuju za određivanja stabilnosti lijekova u vodenim otopinama. Ovisno o kakvoj se tvari radi, može se mjeriti raspad ljekovite tvari ili nastajanje razgradnog produkta, ako pokazuje prihvatljivu elektroaktivnost. Elektrokemijski se određuje razgradni produkt nifedipina djelovanjem svjetlosti (15). Kinetika razgradnje antibiotika cefepima u lužnatom mediju uspješno se može pratiti redukcijom oksimino skupine (16). Razgradnja lansoprazola, inhibitora protonskе pumpe, u kiselim vodenim otopinama može se istraživati redukcijom sulfoksidne skupine na razini nanomolarnih koncentracija (17). Kontrola onečišćenja salicilnom kiselinom u ljekovitim oblicima acetilsalicilne kiseline može se provesti na temelju elektrokemijske oksidacije salicilne kiseline koja nastaje kao produkt hidrolize aktivne tvari (18).

Voltametrijske metode obuhvaćaju široko područje linearnosti (10^{-3} - 10^{-11} M) te se njima mogu analizirati farmaceutske sirovine i ljekovite tvari u različitim doziranim oblicima. Prednost je tih metoda da većina pomoćnih tvari u farmaceutskom obliku nije elektroaktivna pa stoga ne utječu na voltametrijski odaziv ljekovite tvari (7). Priprema uzorka vrlo je jednostavna, a sastoji se u otapanju aktivne komponente farmaceutskog oblika odgovarajućim otapalom. Izravnim mjerjenjem alkvota dobivene otopine određuje se sadržaj ljekovite tvari (19). Elektroanalitika se primjenjuje i u ispitivanju brzine oslobođanja aktivne tvari iz gotovoga ljekovitog oblika.

Većina ljekovitih tvari pokazuje značajnu adsorpciju na površini elektrode te se mogu određivati voltametrijom s adsorptivnom akumulacijom u kombinaciji s pulsnim tehnikama (12). Metode su dovoljno osjetljive i selektivne pa se njima mogu analizirati lijekovi u biološkim tekućinama nakon uobičajenih terapijskih doza. Postoji mogućnost izravnog određivanja lijeka u plazmi ili urinu nakon razrjeđivanja prikladnom otopinom elektrolita. Ponekad, ovisno o redoks potencijalu ispitivanog lijeka, potrebno je prije elektroanalitičkoga mjerjenja obaviti uobičajne predobradbe biološkoga materijala, poput ekstrakcija ili taloženja kojima bi se odijelili elektroaktivni endogeni spojevi. Elektroanalitika daje vrijedan doprinos izučavanju farmakokinetike lijekova, posebice jer se tim metodama mogu pratiti redoks biotransformacije lijekova. Ako metaboliti lijekova pokazuju redoks potencijal na drugim vrijednostima, metoda se može primjeniti za identifikaciju i kvantitativnu analizu metabolita (20). Kod pulsnih tehniku dovoljna je razlika potencijala ispitivanih spojeva od samo 50 mV. Voltametrijske metode mogu biti alternativa češće rabljenim kromatografskim i spektroskopskim metodama u analitici lijekova (21).

U voltametrijskim analizama lijekova upotrebljavaju se modificirane čvrste elektrode koje povećavaju osjetljivost i selektivnost (22). One se primjenjuju u širokom spektru elektroanalitičkih istraživanja. Površina elektrode može se promijeniti elektrokemijskom aktivacijom, primjenom ultrazvuka ili kemijskim načinima. U usporedbi s ostalim elek-

trodama u elektrokemiji, kemijski izmijenjena elektroda razlikuje se po tome što je relativno tanak sloj (od molekulskog monosloja do nekoliko mikrometara debelog) odabranog spoja nanesen na površinu elektrode kako bi joj podario kemijsku, elektrokemijsku ili neku drugu željenu osobitost ili svojstvo. Elektroda je presvučena odabranim ionskim izmjenjivačem, enzimom, DNA ili polimerskim filmom, koji se u prisutnosti specifične tvari, pod utjecajem promjene naboja ili razlike potencijala, kemijski, elektrokemijski i/ili optički mijenja. Elektrode su kemijski izmijenjene: adsorpcijom, kovalentnim vezanjem sloja ili miješanjem s elektrodnim matriksom.

Tablica 1. Elektroanalitika ljekovitih tvari

Ljekovita tvar	Elektroanalitička tehnika	Radna elektroda	Granice detekcije (M)
Amoksicilin	CV	MCPE	1×10^{-7}
Atenolol, propranolol	DPP	DME	$5 \times 10^{-8}, 3 \times 10^{-8}$
Cefepim	CV	SMDE	9×10^{-7}
Cefoperazon	SWV-CSV	HMDE	6×10^{-10}
Diazepam	DPP	SMDE	$5,3 \times 10^{-7}$
Doksazosin	DPV-ASV	MCPE	$4,3 \times 10^{-11}$
Epinefrin	SWV-ASV	CME	1×10^{-8}
Eritromicin	DPV-ASV	GCE	5×10^{-9}
Etinilestradiol	SWV-CSV	HMDE	$5,9 \times 10^{-10}$
Famotidin	SWV-CSV	HMDE	$4,9 \times 10^{-11}$
Feksofenadin	SWV	GCE	$4,9 \times 10^{-8}$
Glivek	DPV-ASV	GCE	$2,9 \times 10^{-10}$
Grizeofulvin	SWV-CSV	HMDE	$5,8 \times 10^{-10}$
Imipramin	SWV	CME	$4,6 \times 10^{-10}$
Indapamid	DPV	CPE, GCE	$9,8 \times 10^{-8}$
Ketorolak	CV	HMDE	4×10^{-6}
Kvetiapin	SWV	GCE	$6,2 \times 10^{-7}$
Labetalol	DPV	CPE	1×10^{-8}
Lansoprazol, omeprazol	DPV	CPE	$1 \times 10^{-8}, 2,5 \times 10^{-8}$
Metronidazol	CV	GCE	3×10^{-6}
Olsalazin	SWV-CSV	HMDE	9×10^{-9}
Pravastatin	SWV-CSV	HMDE	$3,6 \times 10^{-8}$
Ramipril	DPV	Pt	$4,8 \times 10^{-8}$
Sildenafil citrat	DPV	GCE	$6,9 \times 10^{-7}$
Valaciclovir	SWV	GCE	$4,6 \times 10^{-8}$

Skraćenice u tablici potječu od engleskih naziva za pojedine tehnike i elektrode:

CPE – ugljikova elektroda; MCPE – modificirana ugljikova elektroda; GCE – staklasta ugljikova elektroda; SMDE – statična živina elektroda; HMDE – višeća živina kap; DME – kapajuća živina elektroda; CME – kemijski promijenjena elektroda; Pt – platinска elektroda; CV – ciklička voltametrija; DPV- diferencijalna pulsna voltametrija; DPP- diferencijalna pulsna polarografija; SWV- pravokutnovalna voltametrija; CSV- katodna stripping voltametrija; ASV- anodna stripping voltametrija.

Primjena modificiranih elektroda jako je dobra u složenim biološkim uzorcima. Primjerice, elektrokemijski aktivirana elektroda od staklastog ugljika (oksidacijom kod visokih potencijala) preporučuje se za određivanje azitromicina u urinu (23), a sefadeksom obrađena ugljikova elektroda primjenjuje se za analizu glibenklamida u serumu s granicom detekcije od $4 \cdot 10^{-10}$ M (24).

Voltametrija se primjenjuje u analizi ljekovitih tvari u farmaceutskim oblicima i biološkim tekućinama, a samo neki primjeri odabrani su u tablici 1.

ISTRAŽIVANJE MEHANIZAMA REDOKS BIOTRANSFORMACIJE LIJEKOVA

Reakcije prijenosa elektrona imaju važnu ulogu u biokemijskim procesima pa stoga i u biotransformaciji lijekova. Istraživanjem mehanizama prijenosa elektrona i putova razgradnje može se bolje razumjeti mehanizam djelovanja lijekova u organizmu. Na temelju sličnosti reakcija koje se zbivaju elektrokemijskom oksidacijom i redukcijom i metaboličkih redoks reakcija, istraživanjem mehanizma elektrodnoga procesa može se dobiti uvid u metabolizam lijekova u organizmu (12), a posebice može pomoći u identifikaciji nestabilnih toksičnih intermedijera.

Elektrokemijskim metodama istraživan je mehanizam redukcije olsalazina koji se primjenjuje u terapiji kroničnih upalnih bolesti crijeva (25). Olsalazin u strukturi ima azo vezu koja se cijepa bakterijama debelog crijeva, azoreduktazama, pri čemu nastaje mesalazin čijem se protuupalnom djelovanju može pripisati terapijski učinak. Budući da je bakterijsko cijepanje azo veze proces redukcije, poznavanje mehanizma elektrodne reakcije pomoglo je u razjašnjenu mehanizma redukcije proljeka u biološkom sustavu.

Djelovanje antitumorskog lijeka hidroksiuree uključuje inhibiciju ribonukleotidne reduktaze koja sadrži trovalentno željezo. Istraženi mehanizam redukcije kompleksa hidroksiuree sa željezom elektroanalitičkim metodama, kao i njegov redoks potencijal, upućuju da lijek može interferirati s procesima prijenosa elektrona u biološkom sustavu nakon vezanja na enzim (26).

Elektrokemijska oksidacija apomorfina (27), azitromicina (28) i probukola (29) istraživana je kao model metaboličke oksidacije tih lijekova. Reakcijama prijenosa elektrona objašnjen je mehanizam djelovanja metronidazola (30). Posebno dizajnirana bioelektroda s polianilinskim filmom na elektrodi od staklastog ugljika i vezanim citokromom P450 rabila se u istraživanju biotransformacije fluoksetina *in vitro* (31).

Metaboličkim redoks reakcijama lijekova često nastaju radikali, reaktivni intermedijeri, uključujući i slobodne radikale kisika, koji imaju toksična djelovanja. Stoga elektrokemijska istraživanja redoks ponašanja ksenobiotika mogu poslužiti u dizajniranju aktivnijih i sigurnijih lijekova (32).

Napredak u razvoju mikroelektroda i enzimski modificiranih elektroda omogućava ispitivanja utjecaja lijekova na oslobađanje neurotransmitera, kao i praćenje metaboličkih promjena lijekova *in vivo* (33).

ELEKTROKEMIJA U SINTEZI NOVIH LIJEKOVA

U ranoj fazi istraživanja lijekova elektrokemijske tehnike mogu se primijeniti u nekom od redukcijskih/oksidacijskih stupnjeva organske sinteze farmakološki zanimljivih molekula. Primjerice, elektroorganskom sintezom priređeni su novi derivati makrolidnog antibiotika tilozina (34), a enantioselektivnom elektroredukcijom novi spojevi kumarina (35).

Elektroorganska sinteza omogućuje selektivnu redoks reakciju na određenom dijelu molekule postignutu preciznom kontrolom primijenjenog potencijala. Ekološki je prihvativljivija od kemijske redukcije/oksidacije, jer nema zagađivanja okoliša toksičnim reagensima. Elektrokemijski se može postići jeftina regeneracija enantioselektivnih redoks enzima u sintezi enantiomerno čistih lijekova.

KORELACIJA REDOKS POTENCIJALA I AKTIVNOSTI LIJEKOVA

Elektroanalitičke tehnike primjenjuju se u istraživanju učinaka lijekova i novosintetiziranih farmakološki aktivnih spojeva. Ispitivanje učinka lijekova temelji se na korelaciji potencijala oksidacije/redukcije ispitivane skupine spojeva s njihovom molekulskom strukturu i farmakološkom aktivnošću.

Pronađeno je da antimikotska aktivnost derivata 1,2-benzotiazola ovisi o njihovom potencijalu redukcije (1). Elektrokemijska istraživanja skupine antitumorskih, protuupalnih i antikonvulzivnih lijekova pokazala su da prijenos elektrona ima važnu ulogu u aktivnosti i načinu djelovanju tih spojeva te da potencijal redukcije mora biti u rasponu fizioloških reducsena (-0,1 do -0,5 V) (36). Potencijal redukcije aktivnih spojeva treba biti pozitivniji od -0,5 V da bi došlo do prijenosa elektrona u biološkom sustavu. Dobivenе spoznaje pomogle su u razumijevanju aktivnosti ispitivanih lijekova, kao i u dizajniranju novih aktivnih molekula.

Antioksidativna aktivnost prirodnih polifenola i spojeva iz skupine metaloporfirina, povezana je s elektrokemijskim ponašanjem ispitivanih spojeva i njihovim redoks potencijalima (37). Utvrđeno je da spojevi s nižim potencijalom oksidacije imaju veći antioksidativni učinak. Antioksidativni kapacitet gotovih proizvoda koji sadrže acetilsalicilnu kiselinu, određivan je voltametrijskim metodama i elektrodom s imobiliziranom superoksid dismutazom (38).

Sintezom novih analoga klozapina (npr. olanzapin, kvetiapin) željelo se izbjegći njegovo hepatotoksično djelovanje. U procjeni neželjenih učinka novih spojeva upotrebljavao se potencijal oksidacije. Spojevi koji nisu bili lako podložni oksidaciji, pokazali su se kao dobri antipsihotici s malo neželjenih učinaka (39).

ELEKTROANALITIČKO PRAĆENJE VEZIVANJA LIJEKOVA

Farmakološko djelovanja lijeka većinom izravno ovisi o koncentraciji slobodnog lijeka u plazmi. Vezivanje lijeka za plazma albumin utječe na njegovu distribuciju, brzinu metaboličke razgradnje i izlučivanje. Elektroanalitičkim metodama istraživano je vezivanja lije-

kova iz skupine 1,4-benzodiazepina za serumske albumine, što je dalo vrijedne rezultate u ispitivanju njihove bioraspoloživosti (1).

Voltametrijske su metode vrlo učinkovite u ispitivanju vezivanja lijekova za deoksiribonukleinsku kiselinu. Određeni su mehanizmi i konstante vezivanja antitumorskih lijekova na DNA (40). Elektrokemijskim metodama može se procijeniti oštećenje DNA nastalo kao posljedica vezivanja antitumorskog lijeka. Najviše su istraživani antraciklinski antibiotici iz skupine kemoterapeutika. Nadeno je da vezivanjem adriamicina nastaje oksidativno oštećenje DNA, jer dolazi do prijenosa elektrona u dvostrukom heliks sa susjednog gvanidina, pri čemu nastaje 8-oksogvanin i reducirani oblik adriamicina (41). Elektrokemijski pristup u istraživanju dao je vrijedne spoznaje, ne samo u razumijevanju mehanizma djelovanja antitumorskih lijekova, već i u pronalaženju i dizajniranju novih, djelotvornijih lijekova s ciljanim djelovanjem na DNA. Elektroanalitičkim metodama utvrđen je afinitet i mjesto vezivanja kinolonskih antibiotika, inhibitora bakterijske DNA giraze, na nukleinske kiseline. Dublji uvid u mehanizam interakcije norfloksacina, levofloksacina, pefloksacina i lomefloksacina pomogao je u razumijevanju njihove terapijske djelotvornosti, kao i neželjenih, toksičnih učinaka (42). Interakcija lijeka s DNA može se upotrijebiti i za analizu. Primjenom modificiranih elektroda s DNA kvantitativno se mogu analizirati lijekovi koji se vezuju na DNA (40).

Vezivanjem nekih lijekova na metalne ione mijenja se njihova aktivnost. Primjerice, metalni kompleksi lijekova iz skupine 1,4-benzodiazepina aktivniji su od slobodnog lijeka, a vezivanjem lorazepamom na dvovalentni bakar produžuje se njegovo djelovanje. Antibiotici kinolonske skupine stvaraju stabilne komplekse s kationima, a kao posljedica te interakcije smanjena je njihova apsorpcija i djelovanje. Kinolonski antibiotici sposobnošću stvaranja kompleksa utječu na metabolizam esencijalnih elemenata te djeluju kao inhibitori enzima koji sadrže bakar ili cink. Elektrokemijskim se metodama mogu analizirati kompleksirajuća svojstva lijekova u otopini, može se odrediti omjer metala i liganda u kompleksu, mjesto vezivanja lijeka na metalni ion, mehanizam stvaranja i disocijacije kompleksa, kao i konstante stabilnosti nastalih kompleksa što je osobito važno za neke skupine lijekova (43).

Electroanalysis in pharmacy

by B. Nigović, S. Behetić

S u m m a r y

The great diversity of electroanalytical methods allows the application of electrochemistry to various stages of drug research and development. Electrochemistry can be used at the early stage of drug research for electroorganic synthesis of pharmacologically interesting molecules and screening the activity. There are several examples showing the relationship between redox potential and the pharmacological properties of drugs. Electroanalytical techniques have been used widely in studying the redox mechanism of many biologically significant molecules. Knowledge of the mechanism of electrode reac-

tions can give a useful clue in elucidation of the mechanism of their interaction with living cell. Interactions of drugs with metal ions, protein or DNA may be studied using modern electroanalytical techniques.

Electrochemical methods cover a large domain of investigation in drug analysis. Those techniques are well suited for the determination of drugs in various samples, that is, raw material, pharmaceutical dosage forms and biological fluids. The principal advantage of those methods is that the excipients do not interfere, and extraction procedure is not necessary. They are a rapid technique that has been applied successfully for trace measurements of important pharmaceutical compounds thanks to the high sensitivity and selectivity that it provides. Only selected examples demonstrating the applicability in biological media or in dosage forms of these methods for various classes of drugs are described.

A review of the principles and applications of modern electroanalytical techniques is presented.

(Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb)

Literatura – References

1. M. A. Brooks, E. W. Tsai, *Electrochemistry in Pharmaceutical Analysis in Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*, P. T. Kissinger, W. R. Heineman (Eds.), Marcel Dekker Inc., New York-Basel, 1996, 769–812.
2. J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, Wiley-VCH, New York, 2000.
3. European Pharmacopoeia 5th ed., Council of Europe, Strasbourg, 2004.
4. J-M. Kauffmann, *Annal. Pharm. Fr.* **60** (2002) 28–37.
5. B. Nigović, Š. Komorsky-Lovrić, B. Šimunić, *Electroanal.* **17** (2005) 81–89.
6. J. P. Hart, *Electroanalysis of Biological Important Compound*, Ellis Horwood Limited, New York, 1990.
7. S. A. Ozkan, B. Uslu, H. Y. Aboul-Enein, *Crit. Rev Anal. Chem.* **33** (2003) 155–181.
8. B. Nigović, B. Šimunić, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **31** (2003) 169–174.
9. B. Nigović, *Anal. Bioanal. Chem.* **384** (2006) 431–437.
10. A. Z. Abu Zuhri, W. Voelter, *Frasenius J. Anal. Chem.* **360** (1998) 1–9.
11. B. Nigović, *rad u pripremi*.
12. J. C. Vire, J-M. Kauffmann, *Trends in Electrochemistry in Drug Analysis in Current Topics in Electrochemistry*, (S.G. Pandalai Ed.) Research Trends Trivandrum, India, 1994, 493–515.
13. M. M. Ghoneim, A. M. Beltagi, A. Radi, *Quim. Anal.* **20** (2002) 237–241.
14. Š. Komorsky-Lovrić, B. Nigović, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **36** (2004) 81–89.
15. Lj. Nunez-Vergara, S. Bollo, J. Fuentealba, J. C. Strum, J. A. Squella, *Pharm. Res.* **19** (2002) 522–529.
16. B. Uslu, S. A. Ozkan, P. Zuman, *Microchem. J.* **76** (2004) 61–63.
17. A. Radi, *Microchem. J.* **73** (2002) 349–354.

18. A. J. Torriero, J. M. Luco, L. Sereno, J. Raba, *Talanta* **62** (2004) 247–254.
19. B. Nigović, B. Šimunić, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **32** (2003) 197–202.
20. N. A. El-Maali, *Bioelectrochem.* **64** (2004) 99–107.
21. L. Campanella, A. Ambrosi, F. Bellanti, M. Tomassetti, *Curr. Anal. Chem.* **2** (2006) 229–241.
22. N. S. Lawrence, E. L. Beckett, J. Davis, R. G. Compton, *Anal. Biochem.* **303** (2002) 1–16.
23. B. Nigović, *Anal. Sci.* **20** (2004) 639–643.
24. A. Radi, *Anal. Bioanal. Chem.* **378** (2004) 822–826.
25. B. Nigović, B. Šimunić, Z. Mandić, *Pharmazie* **57** (2002) 468–470.
26. B. Nigović, N. Kujundžić, K. Sanković, *Eur. J. Med. Chem.* **40** (2005) 50–55.
27. J. M. Garrido, C. Delerue-Matos, F. Borges, T. R. Macedo, A. M. Oliveira-Brett, *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 2* **10** (2002) 1713–1717.
28. Z. Mandić, Z. Weitner, M. Ilijaš, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **33** (2003) 647–654.
29. K. Nesmarak, I. Nemec, M. Sticha, J. Gabriel, V. Mirčeski, *Coll. Czech. Chem. Comm.* **64** (1999) 1100–1110.
30. I. Hrdy, R. Cammack, P. Stopka, J. Kulda, J. Tachezy, *Antimicrob. Agents Chemother.* **49** (2005) 5033–5036.
31. E. I. Iwuoha, A. Wilson, M. Howel, N.G. Matthebe, K. Montane-Jaime, D. Narinesingh, A. Guiseppe-Elie, *Anal. Lett.* **37** (2004) 929–941.
32. G. Pagano, *Hum. Exp. Toxicol.* **21** (2002) 77–81.
33. R. N. Adams, *Prog. Neurobiol.* **35** (1990) 297–311.
34. Z. Mandić, A. Narandža, P. Novak, K. Brajša, M. Derek, *J. Antibiot.* **55** (2002) 807–813.
35. N. Schoo, H. J. Schafer, *Liebigs Ann. Chem.* **6** (1993) 601–607.
36. P. Kovacic, L. E. Becvar, *Curr. Pharm. Des.* **6** (2000) 143–167.
37. A. J. Blasco, M. C. Gonzalez, A. Escarpa, *Anal. Chim. Acta* **511** (2004) 71–81.
38. L. Campanella, A. Bonanni, D. Bellantoni, G. Favero, M. Tomassetti, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **36** (2004) 91–99.
39. A. Mouithys-Mickalad et al., *J. Med. Chem.* **44** (2001) 769–776.
40. S. Rauf, J. J. Gooding, K. Akhtar, M. A. Ghauri, M. Rahman, M. A. Anwar, A. M. Khalid, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **37** (2005) 205–217.
41. A. M. O. Brett, M. Vivian, I. R. Fernandes, J. A. P. Piedade, *Talanta* **56** (2002) 959–970.
42. Y. Zhang, Y. Cai, S. Su, Y. Ni, *Electroanal.* **18** (2006) 1479–1484.
43. M. M. C. dos Santos, V. Familia, M. L. S. Goncalves, *Anal. Biochem.* **303** (2002) 111–119.

Primljeno 24. studenoga 2006.