

# Elektroanalitika u farmaciji

---

**Nigović, Biljana; Behetić, Sandra**

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

**Journal article, Published version**

**Rad u časopisu, Objavljena 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: **2025-01-16**



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-biokemijskog 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: potencijometriju, voltametrij, kronoamperometriju, elektrogravimetriju, kronopotencijometriju, kulometriju i konduktometriju.

Primjenjuju se u različitim stadijima istraživanja i razvoja lijekova. Neke se primjenjuju u Europskoj farmakopeji (3). Potencijometrijskom titracijom određuje se sadržaj ljekovitih i pomoćnih tvari u mnogim farmakopejskim postupcima. Potencijometrijski se određuje sadržaj onečišćenja u farmaceutskim tvarima (primjerice fluorida u kalcijevom askorbatu i izofluranu, jodida u diosminu). Potencijometrijskim mjerenjem 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, ciprofloksacin hidroklorida, klindamicin fosfata, itd.). Konduktometrijski se određuje čistoća farmaceutske vode mjerenjem 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 amperometrijski senzor glukoze koji se upotrebljava u kućnoj uporabi i kliničkim laboratorijima za uobičajeno određivanje glukoze u krvi.

## VOLTAMetriJA

Voltametrijom obuhvaća skupinu elektroanalitičkih tehnika koje su se počele razvijati otkrićem polarografije 1922. češkog kemičara Jaroslava Heyrovskyog, dobitnika Nobelove nagrade 1959. Voltametrijom se temelji na mjerenju 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* voltametrijom (metoda otapanja pretkoncentriranog analita), kao i različite vrste polarografije koje se od ostalih voltametrijskih tehnika razlikuju po tome što radna mikroelektroda ima oblik kapajuće živine elektrode (2).

Voltametrijske metode primjenjuju se u kvantitativnoj analizi organskih i anorganskih 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).

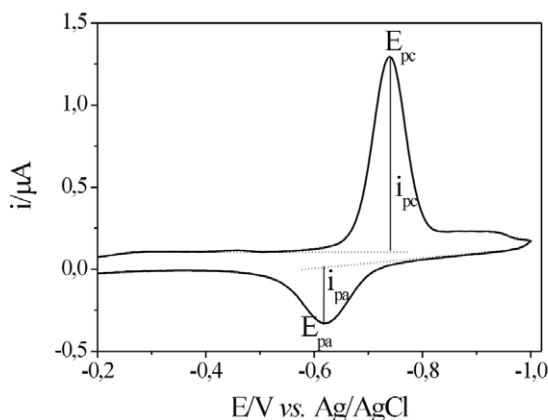
Osnovne su jedinice modernog voltametrijskog instrumenta, osim računala, potenciostat i elektrokemijski članak. Zadaća je potenciostata nametnuti potencijal i izmjeriti jakost struje. Elektrokemijski članak služi kao nosač otopine analita u koju su uronjene elektrode. U otopinu analita može se dodati ionska otopina koja povećava vodljivost. U voltametrijskim mjerenjima 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 mjerenja.

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, platinska, 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 mjerenja.

## Ciklička voltimetrija

Ciklička se voltimetrija primjenjuje za istraživanje kinetike i mehanizama redoks reakcija, određivanje redoks potencijala i broja izmijenjenih elektrona, istraživanje adsorpcijskih 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 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  $500 \text{ mV/s}^{-1}$  (5).

Važni su parametri u cikličkoj voltimetriji 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:

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

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

Randles-Ševčikova jednadžba povezuje koncentraciju i vršnu jakost struje:

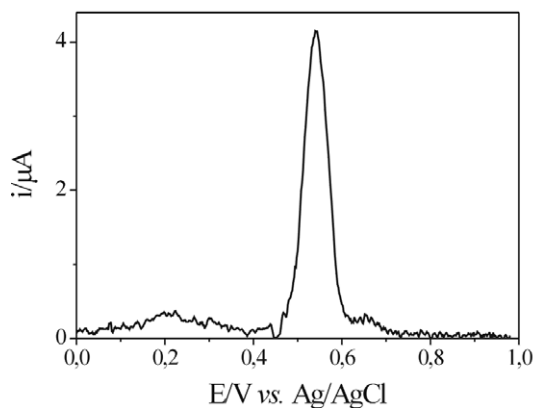
$$i_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A c_0 D^{1/2} v^{1/2}$$

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

### Diferencijalna pulsna voltametrij

Diferencijalna pulsna voltametrij pulsna je tehnika za određivanje vrlo niskih koncentracija elektroaktivnih komponenata u farmaceutskim uzorcima, tkivima i biološkim tekućinama (6). Pulsevi određene veličine, dodani na linearni nagib potencijala, primijenjeni 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).



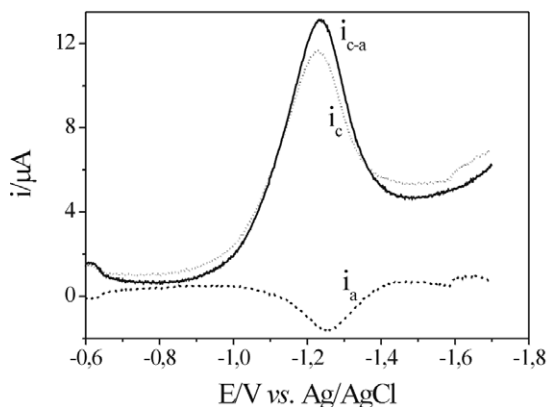
**Slika 2.** Diferencijalno-pulsni voltamogram mesalazina na staklastoj ugljikovoj elektrodi u Britton-Robinson puferu pri pH 1,8 (8).

### Pravokutnovalna voltametrij

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 mehanizama 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 voltametrijia pogodna je za brza, jednostavna i točna određivanja ljevkovitih tvari u farmaceutskim ili biološkim uzorcima.



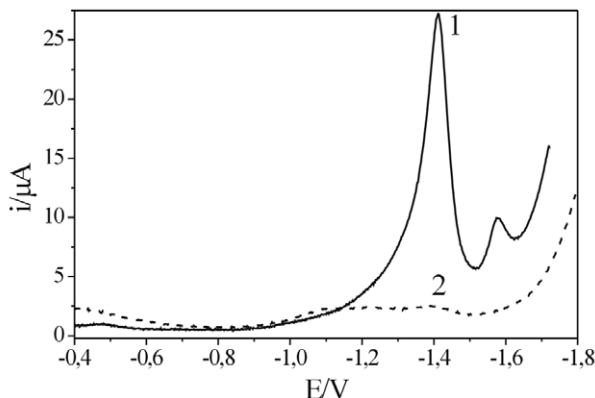
**Slika 3.** Pravokutnovalni voltamogram pravastatina na elektrodi s višećom živinom kapi u Britton-Robinson puferu pri pH 7; frekvencija pulsa 400 Hz (9).

### Stripping voltametrijia

U analizi uzoraka s koncentracijom analita ispod granice detekcije primijenjene metode, često je potrebno upotrijebiti neku vrstu ukoncentriravanja analita prije samog određivanja. *Stripping* voltametrijia uključuje elektrolitičko ili adsorpcijsko pretkoncentriranje analita na površinu elektrode prije voltametrijskog mjerenja (2). Analit se istaloži na radnoj elektrodi pri određenom potencijalu iz otopine koja se miješa. Nakon određenoga vremena (vrijeme akumulacije), miješanje se zaustavlja te se istaloženi analit određuje voltametrijski. Analit se otapa s elektrode (*engl.* stripping) primjenom promjene potencijala. Mjerenje, odnosno promjena potencijala, može se obaviti primjenom diferencijalne pulsne ili pravokutnovalne voltametrije. Ovisno o promjeni potencijala, istaloženi analit se oksidira (anodna *stripping* voltametrijia) ili reducira (katodna *stripping* voltametrijia) 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 voltametrijia 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 odziv izravno ovisi o količini adsorbiranih čestica (slika 4). Tijekom akumulacije treba primijeniti 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.** Pravokutnovoltni voltamogram simvastatina na elektrodi s višećom 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 voltametrisko mjerenje. Analit je koncentriran na elektrodi, a mjerenje se provodi u čistom otapalu pa nema interferencija matrice uzorka.

Voltametrijia 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 doseg 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 dvostruke 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).

Voltametriske 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 voltametrijia 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 primjenjuje 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 protonske pumpe, u kiselim vodenim otopinama može se istraživati redukcijom sulfoksidne skupine na razini nanomolarnih koncentracija (17). Kontrola onečišćenja salicilnom kiselinom u ljekovitim oblicima acetylsalicilne 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 mjerenjem alikvota dobivene otopine određuje se sadržaj ljekovite tvari (19). Elektroanalitika se primjenjuje i u ispitivanju brzine oslobađanja 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 pulsniim 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 mjerenja 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 primijeniti za identifikaciju i kvantitativnu analizu metabolita (20). Kod pulsniim tehnika 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 elektrodnom matriksom.

**Tablica 1.** Elektroanalitika lijekovitih tvari

Ljekovita tvar	Elektroanalitička tehnika	Radna elektroda	Granice detekcije (M)
Amoksicilin	CV	MCPE	$1 \times 10^{-7}$
Atenolol, propranolol	DPP	DME	$5 \times 10^{-8}$ , $3 \times 10^{-8}$
Cefepim	CV	SMDE	$9 \times 10^{-7}$
Cefoperazon	SWV-CSV	HMDE	$6 \times 10^{-10}$
Diazepam	DPP	SMDE	$5,3 \times 10^{-7}$
Doksazosin	DPV-ASV	MCPE	$4,3 \times 10^{-11}$
Epinefrin	SWV-ASV	CME	$1 \times 10^{-8}$
Eritromicin	DPV-ASV	GCE	$5 \times 10^{-9}$
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	$4 \times 10^{-6}$
Kvetiapin	SWV	GCE	$6,2 \times 10^{-7}$
Labetalol	DPV	CPE	$1 \times 10^{-8}$
Lansoprazol, omeprazol	DPV	CPE	$1 \times 10^{-8}$ , $2,5 \times 10^{-8}$
Metronidazol	CV	GCE	$3 \times 10^{-6}$
Olsalazin	SWV-CSV	HMDE	$9 \times 10^{-9}$
Pravastatin	SWV-CSV	HMDE	$3,6 \times 10^{-8}$
Ramipril	DPV	Pt	$4,8 \times 10^{-8}$
Sildenafil citrat	DPV	GCE	$6,9 \times 10^{-7}$
Valaciklovir	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 – viseća živina kap; DME – kapajuća živina elektroda; CME – kemijski promijenjena elektroda; Pt – platinska elektroda; CV – ciklička voltametrija; DPV- diferencijalna pulsna voltametrija; DPP- diferencijalna pulsna polarografija; SWV- pravokutna valna 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).

Voltametrij 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 elektrodno 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 razjašnjenju mehanizma redukcije prolijeka 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 prihvatljivija 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 strukturom 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 djelovanja tih spojeva te da potencijal redukcije mora biti u rasponu fizioloških reduciranih ( $-0,1$  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. Dobiene 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 voltometrijskim metodama i elektrodom s imobiliziranom superoksid dismutazom (38).

Sintezom novih analoga klozapina (npr. olanzapin, kvetiapin) željelo se izbjeći njegovo hepatotoksično djelovanje. U procjeni neželjenih učinaka 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 djelovanje 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 vezivanje 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. Nađeno 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 mjesta 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 lorazepamama 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, mjesta 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 Biologically Important Compounds*, 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. Nemeč, M. Sticha, J. Gabriel, V. Mirčeski, *Coll. Czech. Chem. Comm.* **64** (1999) 1100–1110.
30. I. Hrdý, 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. Mathebe, K. Montane-Jaime, D. Narinesingh, A. Guiseppi-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. Naranda, 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.