

Razvoj voltametrijske metode za simultano određivanje febuksostata i mokraćne kiseline

Vlak, Jakov

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:591288>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-27**



Repository / Repozitorij:

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



Jakov Vlák

**Razvoj voltametrijske metode za simultano
određivanje febuksostata i mokraćne kiseline**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

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

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Biljani Nigović na pomoći, uloženom vremenu i savjetima prilikom izrade ovog diplomskog rada. Profesorica je tijekom cijele naše suradnje bila vrlo društvena, susretljiva i komunikativna pa je stoga uistinu bio užitak surađivati s njom u takvoj prijateljskoj atmosferi.

Također, htio bih se zahvaliti svojim kolegama i prijateljima na podršci, druženju, međusobnom pomaganju i lijepim trenucima koji su moj period studiranja učinili puno lakšim i zabavnijim.

I za kraj, najveće hvala mojoj obitelji, posebice roditeljima, na neizmjernom razumijevanju i potpori od prvog do zadnjeg dana bez čega sve ovo ne bi bilo moguće ostvariti.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. FEBUKSOSTAT I GIHT.....	1
1.2. MOKRAĆNA KISELINA.....	3
1.3. ELEKTROANALITIČKE METODE.....	5
1.3.1. VOLTAMETRIJA.....	5
1.3.1.1. CIKLIČKA VOLTAMETRIJA.....	6
1.3.1.2. PRAVOKUTNOVALNA VOLTAMETRIJA.....	8
1.4. ELEKTRODE.....	9
1.4.1. ELEKTRODA OD STAKLASTOG UGLJIKA.....	9
1.4.2. DIJAMANTNA ELEKTRODA S PRIMJESAMA BORA.....	10
1.5. NANOMATERIJALI.....	11
2. OBRAZLOŽENJE TEME	12
3. MATERIJALI I METODE	13
3.1. KEMIKALIJE.....	13
3.2. RADNI INSTRUMENTI.....	14
3.3. UVJETI MJERENJA.....	14
3.4. PRIPREMA OTOPINA.....	15
4. REZULTATI I RASPRAVA	19
5. ZAKLJUČAK	32
6. LITERATURA	33
7. SAŽETAK/SUMMARY	35
7.1. SAŽETAK.....	35
7.2. SUMMARY.....	36

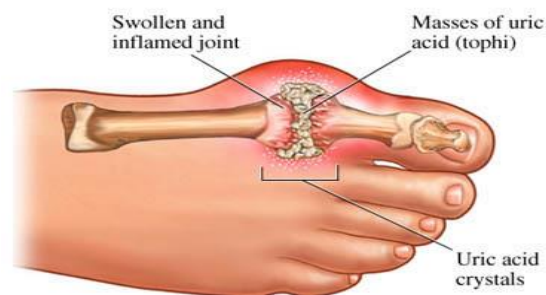
**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC
DOCUMENTATION CARD**

1. UVOD

1.1. FEBUKSOSTAT I GIHT

Febuksostat je selektivni, nepurinski inhibitor ksantin oksidaze indiciran za liječenje gihta, tj. stanja kronične hiperuricemije u kojima je već došlo do taloženja urata (www.halmed.hr). Sintetiziran je 1998. godine od strane japanske kompanije Teijin, a na hrvatsko tržište dolazi 2012. (www.ema.europa.eu), četiri godine nakon što je odobren centraliziranim postupkom za područje Europske unije. Lijek se u nalazi na dopunskoj listi HZZO-a, izdaje se na recept, a postoji u obliku filmom obloženih tableta od 80 i 120 mg (www.hzzo.hr).

Giht (ulozi) je metabolička reumatska bolest koja nastaje kao posljedica dugotrajno povišenih koncentracija mokraćne kiseline u krvi (hiperuricemija), zbog čega dolazi do taloženja kristala mononatrijeva urata ponajviše u zglobovima, ali i u mekim tkivima te unutrašnjim organima (Slika 1). Bolest se najčešće manifestira ponavljajućim napadima akutnog artritisa zbog precipitacije kristala urata na sinovijalnim stanicama i zglobnim hrskavicama te njihova otpuštanja u sinovijalnu tekućinu, što za posljedicu ima izrazito jaku bol, crvenilo i natečenost zglobova. Napadi akutnog artritisa nakon nekoliko dana spontano prolaze, no njihovo učestalo pojavljivanje dovodi do kroničnog artritisa karakteriziranog stvaranjem tzv. tofa (veće naslage urata) u sinovijalnoj membrani i području oko zglobova. Prvih nekoliko napadaja obično pogađa samo jedan zglob i traje svega nekoliko dana, a napretkom bolesti biva zahvaćeno istodobno ili uzastopno više zglobova (Damjanov i sur., 2014). Bez terapijske intervencije napadaji mogu trajati i do 3 tjedna, a intervali između njih se vremenom skraćuju.



Slika 1. Urički artritis

(Izvor: <http://www.drlox.com/arthritis/gouty-arthritis/>)

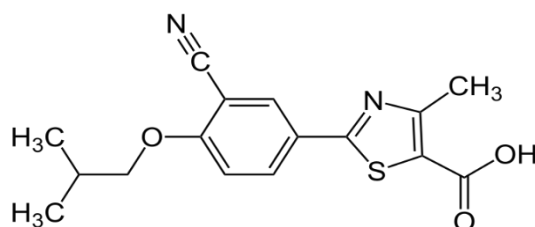
Terapijske opcije za liječenje akutnih napadaja gihta su najčešće nesteroidni protuupalni lijekovi (NSAIL), a osim njih koriste se i kolhicin te kortikosteroidi, dok su lijekovi izbora za kronični oblik bolesti, tj. za dugoročnu prevenciju napadaja, alopurinol, febeksostat i probenecid.

Alopurinol je najpoznatiji i najkorišteniji lijek u terapiji gihta tijekom posljednjih 50-ak godina te se unatoč svojim manama i dalje koristi kao prva linija liječenja u većini zemalja, uključujući i Hrvatsku. Razlozi tome prije svega leže u činjenici da je alopurinol vrlo jeftin lijek, ali i učinkovit te jako dobro istražen s obzirom da se nalazi na tržištu već dugi niz godina pa ga stoga febeksostat, bez obzira na brojne prednosti, još uvijek nije istisnuo iz upotrebe. Kao selektivni inhibitor ksantin oksidaze, febeksostat inhibira i oksidirani i neoksidirani oblik enzima te za razliku od alopurinola ne inhibira ostale enzime uključene u metabolizam purinskih i pirimidinskih baza (Avena-Woods i Hilas, 2010). Posljedica povećane selektivnosti i strukturne specifičnosti je smanjeni broj, ali i ozbiljnost prijavljenih nuspojava. Također, febeksostat ne zahtijeva prilagodbu doze kod bolesnika s blagim do umjerenim bubrežnim zatajenjem te je općenito pokazao veću učinkovitost kod bolesnika sa smanjenom bubrežnom funkcijom. U randomiziranim, dvostruko slijepim studijama, terapija febeksostatom kroz period od 6 do 12 mjeseci, u dozama od 80 ili 120 mg dnevno bila je značajno učinkovitija u snižavanju serumskih koncentracija urata nego terapija alopurinolom u standardnim dozama od 100 do 300 mg dnevno (Frampton, 2015). Preporučena doza febeksostata je obično 80 mg jednom dnevno, a terapijski cilj je dugoročno održavanje razine mokraćne kiseline u serumu ispod 6 mg/dL. No, ukoliko se nakon 2 do 4 tjedna od primjene lijeka razina urata ne spusti ispod željene granice, može se razmotriti i primjena doza od 120 mg jednom dnevno (www.halmed.hr).

Osim izvrsne učinkovitosti i dobrog profila nuspojava, prednost febeksostata je svakako i njegova vrlo povoljna farmakokinetika. Lijek se nakon oralne primjene brzo i efikasno apsorbira te dostiže maksimalnu serumsku koncentraciju 60 do 90 minuta nakon uzimanja, a sama apsorpcija ne ovisi o tome uzima li se lijek uz obrok ili ne. Dolaskom u sistemsku cirkulaciju, lijek se značajno veže na proteine plazme, ponajviše na albumin, u udjelu većem od 99%, a većina njegova metabolizma odvija se u jetri, i to primarno putem UDP-glukuronoziltransferaza (UGT), dok se manje količine oksidiraju citokrom P450 enzimima. Lijek ne ulazi u klinički značajne farmakokinetičke interakcije s obzirom da je slabi inhibitor samo CYP 2D6 enzima, a na ostale enzime gotovo i nema utjecaja. Poluvrijeme eliminacije

iznosi između 5 i 8 sati, a eliminacija se odvija renalnim i hepatičkim putem, pri čemu je većina izlučenog lijeka u obliku metabolita, dok se samo manji dio izlučuje nepromijenjen urinom.

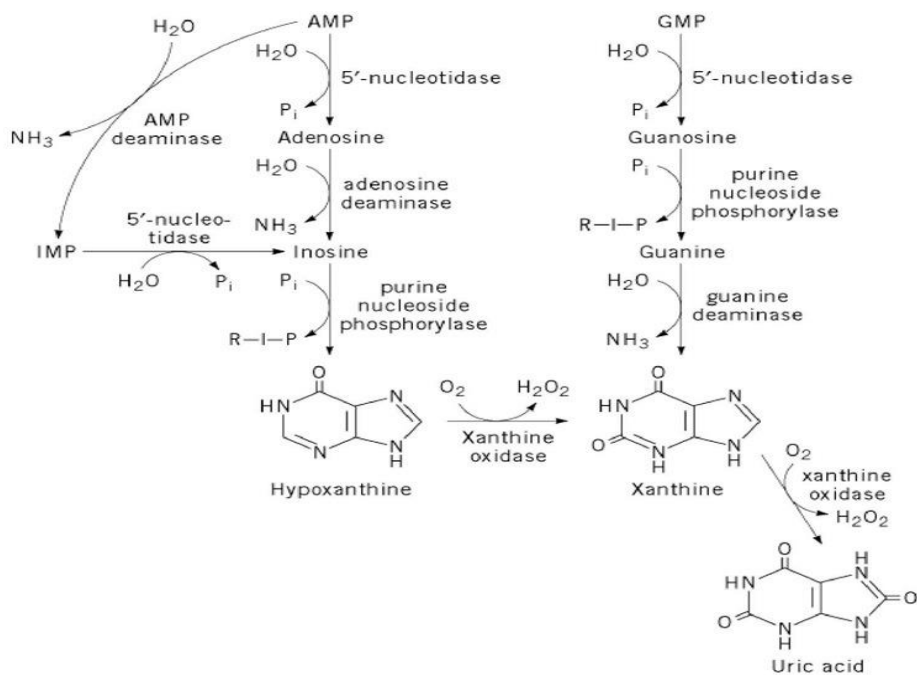
Po svojoj kemijskoj strukturi, febuksostat spada u skupinu derivata tiazolkarboksilne kiseline (Slika 2), a pK_a vrijednost njegove karboksilne skupine iznosi 3,3, tj. ponaša se kao slaba kiselina (<https://www.tga.gov.au/>). Topljivost u vodi iznosi 0,0183 mg/mL, odnosno može se reći da je gotovo netopljiv u njoj, a dodatkom etanola/metanola ili povećanjem pH vrijednosti iznad 8 topljivost umjereno raste (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).



Slika 2. Struktura febuksostata
(Izvor: <https://commons.wikimedia.org/wiki/>)

1.2. MOKRAĆNA KISELINA

Mokraćna kiselina je organska molekula koja se u organizmu čovjeka sintetizira kao završni produkt metabolizma purina (Slika 3). Purinske baze, odnosno nukleotidi metaboliziraju se u jetri nizom reakcija do purinskog derivata hipoksantina, koji se u posljednjem koraku uz pomoć enzima ksantin oksidaze pretvara u mokraćnu kiselinu. Upravo je ksantin oksidaza glavno ciljno mjesto djelovanja lijekova u stanjima hiperuricemije jer se njenom inhibicijom značajno smanjuje endogeno nastajanje mokraćne kiseline i njenih soli.



Slika 3. Metabolizam purinskih nukleotida (Izvor: <http://what-when-how.com/>)

Molekula ima četiri kisela protona od kojih samo jedan (na poziciji 9) disocira pri fiziološkim uvjetima ($\text{pK}_a=5,8$) pa se stoga u krvi pri $\text{pH}=7,4$ nalazi dominantno u obliku natrijeve soli, odnosno urata (www.medscape.com). Urati pokazuju vrlo slabu topljivost u vodi, a samim time i u plazmi, no vezanjem na proteine (ponajviše albumin), topljivost se povećava za čak 70% u odnosu na slobodni oblik. Unatoč značajnom povećanju topljivosti prilikom vezanja na proteine, soli mokraćne kiseline su i dalje prilično netopljive u krvnoj plazmi te pri povećanim koncentracijama teže formiranju kristala što je glavni uzrok njihove patogenosti. Slobodna frakcija koja nije vezana na plazmatske proteine izlučuje se iz organizma najvećim dijelom putem bubrega (65-75%), dok se ostatak eliminira putem žuči (de Oliveira i Burini, 2012).

Koncentracija urata u krvi može porasti povećanjem njihove endogene produkcije uslijed stanja karakteriziranih velikim brojem mrtvih stanica, pri čemu se oslobađa njihov DNK sadržaj iz jezgre, uključujući i purinske baze. Također, značajan učinak na pojavu hiperuricemije ima i povećan unos hrane bogate purinima, alkohola, fruktoze, ali i nemogućnost izlučivanja samih urata, najčešće zbog smanjene funkcije bubrega (de Oliveira i Burini, 2012).

Plazmatske koncentracije mokraćne kiseline povećavaju se sa životnom dobi, ali i ovise o spolu pa su tako referentne vrijednosti za žene u postmenopauzi i odrasle muškarce u rasponu od 3,5 do 7,2 mg/dL, a za žene u premenopauzi između 2,5 i 6,0 mg/dL. Raspon referentnih vrijednosti te koncentracije pri kojima nastupa hiperuricemija se razlikuju ovisno o izvoru, no opće prihvaćena je granica od 6 mg/dL kao dugoročni cilj terapije gihta, ali i sprječavanja ostalih rizika povezanih s taloženjem urata u organizmu (Desideri i sur., 2014).

U kliničkom kontekstu, hiperuricemija je najčešće povezana s pojavom gihta i bubrežnih kamenaca, no sve češće se koristi i kao prognostički indikator za kardiovaskularne bolesti, dijabetes, zatajenje bubrega i metabolički sindrom.

Unatoč tome što se mokraćna kiselina, tj. njene soli najčešće promatraju kao rizičan i štetan čimbenik, bitno je naglasiti da sama molekula posjeduje snažnu antioksidacijsku aktivnost koja čini više od 50% ukupnog antioksidacijskog kapaciteta krvi (de Oliveira i Burini, 2012).

1.3. ELEKTROANALITIČKE METODE

Elektroanalitičke metode čine skupinu metoda kod kojih se podatak o koncentraciji, aktivitetu ili nekom drugom termodinamičkom svojstvu određivane tvari dobiva u ovisnosti o naponu, struji ili naboju. Ovisno o mjerenoj varijabli i signalu pobude koji uzrokuje odvijanje elektrokemijske reakcije na radnoj elektrodi, dijele se na: potenciometrijske, voltametrijske, elektrogravimetrijske, kulometrijske, konduktometrijske, kronopotenciometrijske i kronoamperometrijske metode (Wang, 2000).

1.3.1. VOLTAMETRIJA

Voltometrija obuhvaća skupinu elektroanalitičkih tehnika koje se temelje na mjerenju struje radne elektrode nastale kontinuiranim mijenjanjem njenog potencijala. Prikazom ovisnosti potencijala i izmjerene struje dobiva se voltamogram (Wang, 2000). Voltametrijske metode imaju široku primjenu te se koriste u kvantitativnoj analizi organskih i anorganskih spojeva u vodenim i nevodnim medijima, za određivanje redoks potencijala, za elektrokemijsku

detekciju eluiranih analita u HPLC-u, za istraživanje kinetike i mehanizma redoks potencijala, itd.

Osnovni dijelovi voltametrijskog instrumenta su računalo, potenciostat i elektrokemijski članak. Uloga potenciostata je nametnuti potencijal i izmjeriti jakost struje, dok elektrokemijski članak služi kao nosač otopine analita u koju su uronjene elektrode. U voltametrijskim mjerenjima koriste se tri elektrode: radna elektroda, pomoćna ili protuelektroda i referentna elektroda. Potencijal se mjeri između radne i referentne elektrode, a struja između radne i protuelektrode, dok se sama reakcija oksidacije/redukcije događa na radnoj elektrodi. Također, površine primijenjenih elektroda su konstantne, čime se osigurava reproducibilnost mjerenja (Nigović i Behetić, 2007).

Postoji više vrsta voltametrijskih tehnika među kojima su najčešće korištene ciklička, diferencijalna pulsna i pravokutnovalna.

1.3.1.1. CIKLIČKA VOLTAMTERIJA

Ciklička voltametrija je elektrokemijska tehnika koja se temelji na mjerenju struje uz linearno mijenjanje potencijala radne elektrode, pri čemu se mijenja smjer promjene potencijala nakon dostizanja određene vrijednosti. Jakost struje raste kako se potencijal približava redoks potencijalu analita, a promjenom potencijala preko karakterističnog potencijala redoks procesa nastaje strujni vrh (Slika 4). Nakon strujnog vrha dolazi do pada jakosti struje uslijed smanjenja koncentracije analita u blizini elektrode, a povratkom potencijala na početnu vrijednost dolazi do oksidacije/redukcije produkata koji su nastali u prvoj polovici ciklusa. Kao rezultat mjerenja dobivamo voltamogram čiji oblik ovisi o brzinama prijenosa elektrona i tvari te o kemijskim reakcijama koje prate same redoks reakcije. Također, ukoliko je oblik simetričan, to znači da je proces oksidacije, odnosno redukcije reverzibilan.

Iz voltamograma možemo izvući podatke o potencijalu vrha redukcije (E_{pc}) i oksidacije (E_{pa}) te 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:

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

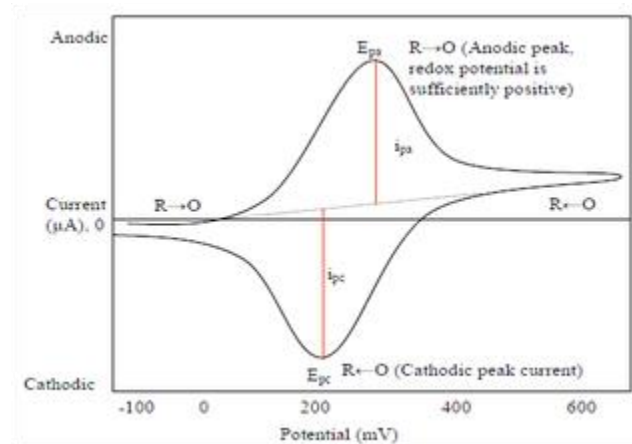
Pri 25 °C, za redoks reakciju prijenosa n elektrona ΔE_p iznosi 0,0592 / nV, odnosno 60 mV za jedan elektron.

Vežu između koncentracije i vršne jakosti struje daje Randles-Ševčikova jednačina:

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

gdje je i_p vršna jakost struje u amperima, A je površina elektrode u cm^2 , D difuzijski koeficijent u cm^2/s , c_0 je koncentracija otopine u mol/cm^3 , v brzina promjene potencijala V/s, a n broj elektrona. (Nigović i Behetić, 2007)

Ciklička voltametrijia se 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 (Wang, 2000). Nedostatak tehnike je relativno visoka granica detekcije (10^{-5} - 10^{-6} M) zbog čega se rijetko primjenjuje u svrhu kvantitativne analize.

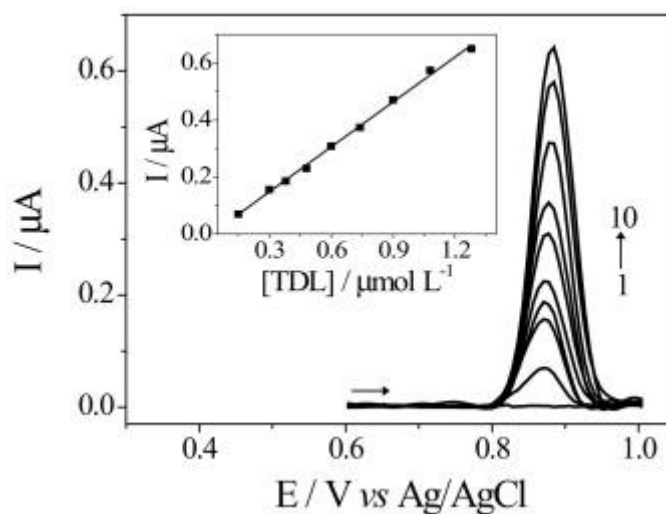


Slika 4. Primjer cikličkog voltamograma (Izvor: <https://openi.nlm.nih.gov/>)

1.3.1.2. PRAVOKUTNOVALNA VOLTAMETRIJA

Pravokutnovalna voltametrija je pulsna voltametrijska tehnika koja se temelji na dobivanju signala pobude dodavanjem pravokutnovalnih pulseva na stepeničasti signal potencijala. Pri tome se struja mjeri dvaput unutar svakog ciklusa - jednom na početku polaznog pulsa, a drugi puta na kraju pulsa suprotnog smjera. Polazni puls proizvodi katodnu struju, a povratni anodnu. Razlika tih struja proporcionalna je koncentraciji analita u otopini, a potencijal maksimuma može se upotrijebiti za potvrdu identiteta samog analita (Wang, 2000). Primjer pravokutnovalnog voltamograma prikazan je na Slici 5.

Najveća prednost ove tehnike je velika brzina, odnosno mogućnost snimanja cijelog voltamograma za samo nekoliko sekundi čime se značajno skraćuje vrijeme analize. Tako velike brzine snimanja omogućene su frekvencijama od 1 do 100 ciklusa u sekundi čime se dopušta upotreba ekstremno brzih promjena potencijala. Osim toga, tehnika ima i vrlo niske granice detekcije (do 1×10^{-8} M) pa se stoga često koristi za određivanja ljekovitih tvari u farmaceutskim i biološkim uzorcima (Nigović i Behetić, 2007).



Slika 5. Pravokutnovalni voltamogram i područje linearnosti za tadalafil (Sartori i sur., 2017)

1.4. ELEKTRODE

1.4.1. ELEKTRODA OD STAKLASTOG UGLJIKA

Elektroda od staklastog ugljika (eng. glassy carbon electrode, GCE) jedna je od najčešće korištenih elektroda na području analitike lijekova, a napravljena je od posebne vrste ugljika koji ujedinjuje svojstva grafita, stakla i keramike te se ubraja u skupinu tzv. ugljikovih elektroda (Slika 6). Za razliku od samog grafita, staklasti ugljik se na mikrorazini sastoji od fullerenskih struktura, a 100% ugljikovih atoma u njegovoj građi je sp^2 hibridizacije (Kissinger i Heineman, 1996) zbog čega posjeduje specifična svojstva zaslužna za njegovu vrlo široku primjenu. Osim izvrsnih mehaničkih i električnih karakteristika, ova vrsta elektrode ima i mogućnost mjerenja širokog raspona potencijala, kemijski je inertna, posjeduje iznimno nisku poroznost te sadrži vrlo niske razine onečišćenja. Također, materijal posjeduje iznimnu otpornost na oksidaciju i koroziju, a zbog visoke gustoće i male veličine pora, nije potrebna njegova impregnacija (Uslu i Ozkan, 2007). Staklasti ugljik izrađuje se kontroliranim zagrijavanjem prethodno oblikovane polimerne smole u inertnoj atmosferi, a proces karbonizacije se odvija vrlo sporo uz postepeno povećanje temperature u rasponu između 300 i 1200 °C (Brett i Brett, 1993) kako bi se osigurala eliminacija kisika, dušika i vodika.

Prilikom primjene elektrode, često se vrši obrada površine poliranjem aluminijskim česticama (veličine manje od 0,05 μm) na posebnoj tkanini za poliranje kako bi se postigla njena dodatna aktivacija te povećala reproducibilnost, a samim time dobili i bolji rezultati analize. Također, aktivacija elektrode, tj. povećanje transfera elektrona se može postići i upotrebom topline ili elektrokemijskom predobradom (Uslu i Ozkan, 2007). GC elektroda je svoju primjenu pronašla ponajviše na biomedicinskom području, pri čemu se dominantno koristi u voltametrijskim i potenciometrijskim ispitivanjima.



Slika 6. Elektroda od staklastog ugljika
(Izvor: <https://www.als-japan.com/>)

1.4.2. DIJAMANTNA ELEKTRODA S PRIMJESAMA BORA

Kao što joj i samo ime kaže, dijamantna elektroda napravljena je od dijamanta, najpoznatije alotropske modifikacije ugljika te se poput elektrode od staklastog ugljika također ubraja u skupinu ugljikovih elektroda. Dijamant je najtvrdi poznati mineral kojeg krasi iznimna čvrstoća, visoka gustoća, kemijska inertnost, stabilnost, a poznat je i kao odličan električni izolator zbog čega se sam po sebi ne bi mogao koristiti za izradu elektroda (Uslu i Ozkan, 2007). No, dodatkom primjesa bora (eng. boron doped), ovisno o njihovoj količini, dijamant dobiva svojstva u rasponu od poluvodiča do polumetala te postaje vrlo koristan materijal za oblikovanje novih vrsta elektroda i predstavlja veliki iskorak na ovom polju jer se svojim svojstvima značajno razlikuje od dotadašnjih opcija. Dijamantna elektroda s primjesama bora (eng. boron doped diamond electrode, BDDE) otvorila je nove mogućnosti u istraživanjima iz razloga što je sposobna za rad u vrlo ekstremnim uvjetima kao što su agresivni kemijski medij (npr. vrlo niski pH) te rad s iznimno velikim anodnim potencijalima (Uslu i Ozkan, 2007) zahvaljujući već spomenutoj kemijskoj inertnosti i stabilnosti (ponajviše stabilnost površine). Osim navedenih svojstava, BDD elektroda ima i čitav niz drugih prednosti poput povoljnog omjera signal-šum, niske pozadinske struje, širokog raspona potencijala, preciznosti, mehaničke otpornosti, brzog odgovora te niske granice detekcije (Hupert i sur., 2003). Jedan od razloga sve većeg značaja koji se pridaje BDD elektrodi jest i njena široka primjena koja među ostalim obuhvaća i protočnu injekcijsku analizu (eng. flow injection analysis), ionsku kromatografiju, HPLC te ponajviše elektroanalitičke metode (Fortin i sur., 2005). Uz sve navedene prednosti, BDD elektroda također ima i neke nedostatke poput niske elektrokatalitičke aktivnosti i selektivnosti, no i to je moguće nadvladati određenim modifikacijama kao što su oksidacija površine i uvođenje novih funkcionalnih skupina (npr. karboksilne i amino skupine).

1.5. NANOMATERIJALI

Nanotehnologija je grana znanosti koja se bavi istraživanjem, razvojem i primjenom nanomaterijala, odnosno tvari čija je veličina osnovne građevne jedinice u rasponu od 1 do 100 nm. Nanomaterijali su već danas prisutni u gotovo svim sferama ljudskoga života te predstavljaju jedno od najbrže rastućih područja moderne znanosti, a to mogu zahvaliti svojim iznimnim kemijskim i fizikalnim svojstvima koja su značajno bolja od „klasičnih“ materijala korištenih prije nano ere.

Na području analitike lijekova, točnije elektroanalitike, najznačajniji doprinos nanomaterijala jest svakako brzi razvoj senzora, odnosno pojava tzv. nanosenzora koji daju željeni odgovor temeljem interakcija na nano razini. Zbog navedenih svojstava omogućene su puno uspješnije analize širokog spektra analita, a u usporedbi sa starijim vrstama senzora, postiže se niži limit detekcije, šire područje linearnost, povećana osjetljivost i reproducibilnost (Kurbanoglu i Ozkan, 2017). Sam nanosenzor se sastoji od transduktora (npr. voltametrijski, amperometrijski) direktno povezanog s nanomaterijalima koji prepoznaju željenu promjenu. Jedan od najkorištenijih nanomaterijala u kontekstu elektrokemijskih ispitivanja je grafen, monosloj grafita građen isključivo od sp^2 hibridiziranih atoma ugljika, koji je podložan i modifikaciji u grafen oksid s ciljem poboljšanja njegovih karakteristika (Zhu i sur., 2010). Osim toga, grafen se koristi i kao građevna jedinica za sintezu drugih vrsta često korištenih nanomaterijala, kao što su nanocjevčice i nanovlakna, cilindrične strukture čija primjena posljednjih godina predstavlja jedan od najvećih iskoraka u elektroanalitici lijekova

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Febuksostat je lijek novije generacije za liječenje gihta, tj. stanja kronične hiperuricemije te je prisutan relativno kratko na europskom, ali i svjetskom tržištu u usporedbi s njegovim terapijskim alternativama. Iako se zbog svoje djelotvornosti i dobrog profila nuspojava brzo nametnuo kao izvrstan terapijski izbor za navedene indikacije, febuksostat nije često bio tema znanstvenih radova iz područja analitike lijekova, a razlog tomu leži u činjenici da je sam lijek u općoj upotrebi tek nekoliko godina.

Pregledom znanstvene literature nisu pronađene metode koje se bave simultanom analizom lijeka i mokraćne kiseline, već su temeljene na zasebnoj analizi ili samog lijeka ili same mokraćne kiseline. S obzirom da koncentracija urata igra vrlo važnu ulogu u patofiziologiji bolesti, a ujedno je i meta djelovanja lijeka, zaključeno je da bi bilo korisno razviti metodu koja može istovremeno određivati oba analita čime bi se stekao bolji uvid u tijek bolesti, ali i djelotvornost terapije. Metoda izbora bila je voltometrija zato što je jeftina, brza i jednostavna za izvedbu te bi stoga potencijalno mogla zaživjeti u navedenoj primjeni.

Cilj je dakle bio razviti voltametrijsku metodu koja bi se temeljila na elektrooksidaciji obaju analita i pri tome optimizirati njene parametre (odabir prikladne elektrode, vrste pufera i njegove pH vrijednosti, frekvencije, amplitude pulsa i brzine promjene potencijala) te ispitati značajne interferencije s fiziološki prisutnim tvarima, potencijalnim suplementima i ostalim lijekovima u terapiji gihta.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. KEMIKALIJE

U praktičnom dijelu rada korištene su sljedeće kemikalije:

- febuksostat, Ph.Eur. standard
- mokraćna kiselina (99%, Sigma-Aldrich)
- H_3PO_4 85% (Lach-Ner)
- CH_3COOH (Panreac Quimica)
- H_3BO_3 (Sigma-Aldrich)
- $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (GRAM-MOL)
- NaOH (Sigma-Aldrich)
- askorbinska kiselina (Sigma-Aldrich)
- glukoza, bezvodna (Kemika)
- folna kiselina (97%, Sigma-Aldrich)
- dopamin (Sigma-Aldrich)
- diklofenak (ekstrakcija iz Voltaren forte 50 mg tablete, Pliva)
- NaCl
- NaHCO_3
- MgSO_4
- CaCl_2
- KCl
- Kitozan (Sigma-Aldrich)
- Nafion (Sigma-Aldrich)
- Grafen pločice (US Research Nanomaterials, Inc., Houston, SAD)
- Ugljikove nanocjevčice (Sigma-Aldrich)
- Ugljikova nanovlakna (US Research Nanomaterials, Inc., Houston, SAD)
- Ultračista voda (pripravljena pomoću Milli-Q sustava, Millipore, Bradford, SAD)

3.2. RADNI INSTRUMENTI

Mjerenja cikličke i pravokutnovalne voltametrije izvedena su na uređaju μ Autolab potencijostat/galvanostat (Eco Chemie) spojenom na računalo koje uz pomoć programa GPES 4.9 kontrolira mjerenja (Slika 7). Elektrokemijski članak sastoji se od tri elektrode: radne, referentne i protuelektrode. Od radnih elektroda korištene su elektroda od staklastog ugljika te dijamantna elektroda s primjesama bora. Kao referentna elektroda korištena je srebro/srebrov klorid (Ag/AgCl) elektroda, a kao protuelektroda platinska žica.



Slika 7. Voltametrijski uređaj 797 VA Computrace Metrohm

(Izvor: <https://www.metrohm.com/en>)

Ispitivane tvari vagane su na analitičkoj vagi Mettler Toledo AG245.

Za poboljšanje otapanja kemijskih supstancija korištena je ultrazvučna kupelj kupelj Elma[®] S 30 H Elmasonic.

Mjerenja pH vrijednosti prilikom izrade pufera izvedena su na Mettler Toledo pH-metru s kombiniranom staklenom elektrodom.

3.3. UVJETI MJERENJA

Ciklički voltamogrami snimljeni su na: GC elektrodi, BDD elektrodi, GC elektrodi modificiranoj grafenom u obliku pločica u 0,5%-tnoj otopini kitozana u 0.1% octenoj kiselini (GCE-GRP/Chit) te u 0,3%-tnoj etanolnoj otopini Nafiona (GCE-GRP/Naf), GC elektrodi

modificiranoj suspenziji grafena i ugljikovih nanovlakana (1:1) u 0,3%-tnoj etanolnoj otopini Nafiona (GCE-GRP/CNF/Naf) i suspenziji ugljikovih nanocjevčica u 0,5%-tnoj otopini kitozana u 0,1% octenoj kiselini (GCE-CNT/Chit), BDD elektrodi modificiranoj grafenom u obliku pločica u 0,5%-tnoj otopini kitozana u 0,1% octenoj kiselini (BDDE-GRP/Chit) te u 0,3%-tnoj etanolnoj otopini Nafiona (BDDE-GRP/Naf) i suspenziji ugljikovih nanocjevčica u 0,5%-tnoj otopini kitozana u 0,1% octenoj kiselini (BDDE-CNT/Chit). Njihovo snimanje provedeno je uz brzinu promjene potencijala od 25 do 3000 mV/s te u rasponu potencijala od 0 do 1,5 V.

Pravokutnovalni voltamogrami snimljeni su na dijamantnoj elektrodi s primjesama bora u rasponu potencijala od 0 do 1,5 V, frekvencije od 25 do 100 Hz, amplitude od 15 do 50 mV te promjene porasta potencijala od 2 do 8 mV.

3.4. PRIPREMA OTOPINA

Matična otopina febeksostata

Matična otopina febeksostata pripravljena je u koncentraciji 1×10^{-2} M. Postupak započinje vaganjem 31,63 mg lijeka na analitičkoj vagi, nakon čega se sadržaj kvantitativno prenosi u tikvicu volumena 10,0 mL. Tikvica se nadopuni 96%-tnim etanolom do oznake, promućka i ostavi u ultrazvučnoj kupelji dok se lijek u potpunosti ne otopi. Matična otopina se čuva u hladnjaku.

Matična otopina mokraćne kiseline

Matična otopina mokraćne kiseline pripravljena je u koncentraciji 1×10^{-2} M. Postupak započinje vaganjem 16,81 mg tvari na analitičkoj vagi, nakon čega se sadržaj kvantitativno prenosi u tikvicu volumena 10,0 mL. Tikvica se nadopuni ultračistom vodom do oznake uz prethodno dodavanje nekoliko kapi 0,2 M NaOH, promućka se i ostavi u ultrazvučnoj kupelji dok se tvar u potpunosti ne otopi. Matična otopina se čuva u hladnjaku.

Radne otopine

Radne otopine pripravljene su tako da se određeni volumen matične otopine razrijedi Britton-Robinson puferom (BR pufer) u tikvici volumena 20,0 mL i nadopuni do oznake uz prethodno dodavanje otopina ostalih supstancija ukoliko je to potrebno za određeno mjerenje.

Izrada Britton-Robinson pufera

Britton-Robinson pufer izrađuje se iz tri komponente: 0,5 M fosforne kiseline, 0,5 M octene kiseline i 0,5 M borne kiseline i to na sljedeći način:

- 0,5 M fosforna kiselina priredi se pipetiranjem 3,37 mL 85% fosforne kiseline u tikvici od 100,0 mL te nadopuni do oznake
- 0,5 M octena kiselina priredi se pipetiranjem 2,87 mL octene kiseline u tikvici od 100,0 mL te nadopuni do oznake
- 0,5 M borna kiselina priredi se otapanjem 3,09 g borne kiseline u tikvici od 100 mL te nadopuni do oznake

Zatim se u tikvicu od 250,0 mL kvantitativno prenese po 20,00 mL svježe priređenih kiselina te se nadopuni ultračistom vodom do oznake.

Izrada suspenzija nanomaterijala

Suspenzije nanomaterijala u kitozanu pripremljene su vaganjem 1,0 mg nanomaterijala koji je kvantitativno prenesen u tikvicu u koju je prethodno dodan 1,0 mL ranije pripremljene 0,5%-tne otopine kitozana u 0,1% octenoj kiselini. Suspenzija je stavljena u ultrazvučnu kupelj na 30 minuta nakon čega je nanešena na površinu elektrode.

Suspenzije nanomaterijala u Nafionu pripremljene su vaganjem 1,0 mg nanomaterijala koji je kvantitativno prenesen u tikvicu u koju je prethodno dodan 1,0 mL ranije pripremljene 0,3%-tne etanolne otopine Nafiona. Tikvica sa suspenzijom je stavljena u ultrazvučnu kupelj na 30 min, a potom je suspenzija nanesena na površinu elektrode.

Izrada otopina za ispitivanje interferencija

Otopine za ispitivanje interferencija sadržavale su sljedeće tvari: askorbinska kiselina, dopamin, folna kiselina, glukoza, diklofenak, NaCl, MgSO₄, KCl, NaHCO₃, CaCl₂.

a) askorbinska kiselina, dopamin, folna kiselina, glukoza

Navedene tvari su izvagane na analitičkoj vagi i kvantitativno prenesene u tikvice od 10,0 mL koje su potom nadopunjene ultračistom vodom do oznake. Također, u otopinu folne kiseline dodano je nekoliko kapi 0,2 M NaOH zbog boljeg otapanja. Nakon toga, tikvice su promućkane i stavljene u ultrazvučnu kupelj do potpunog otapanja (ukoliko je to bilo potrebno). Iz tako pripremljenih otopina uzeti su prikladni volumeni koji su preneseni u tikvice od 20,0 mL s ciljem dobivanja željenih koncentracija (Tablica 1). Zatim su po potrebi dodane druge ispitivane tvari te BR pufer kojim je tikvica nadopunjena do oznake.

Tablica 1. Priprema otopina askorbinske kiseline, dopamina, folne kiseline i glukoze za ispitivanje interferencija

Interferirajuća tvar	Ispitivane koncentracije
askorbinska kiselina	5×10^{-6} M, 1×10^{-5} M, 1.5×10^{-5} M, 2×10^{-5} M, 1×10^{-4} M, 2×10^{-4} M
dopamin	2.5×10^{-7} M, 5×10^{-7} M, 1×10^{-6} M, 2.5×10^{-5} M, 5×10^{-5} M
folna kiselina	2.5×10^{-7} M, 5×10^{-7} M, 1×10^{-6} M, 2×10^{-6} M, 5×10^{-6} M i 1×10^{-5} M
glukoza	3×10^{-3} M, 4.5×10^{-3} M, 6×10^{-3} M, 9×10^{-3} M, 1.2×10^{-2}

b) NaCl, MgSO₄, KCl, NaHCO₃, CaCl₂

Navedene tvari su izvagane na analitičkoj vagi i kvantitativno prenesene u tikvice od 10,0 mL koje su potom nadopunjene ultračistom vodom do oznake. Nakon toga, tikvice su promućkane i stavljene u ultrazvučnu kupelj do potpunog otapanja. Iz tako pripremljenih

otopina uzeti su prikladni volumeni koji su preneseni u tikvice od 20,0 mL s ciljem dobivanja željenih koncentracija (Tablica 2). Zatim su po potrebi dodane druge ispitivane tvari te BR pufer kojim je tikvica nadopunjena do oznake.

Tablica 2. Priprema otopina NaCl, MgSO₄, KCl, NaHCO₃ i CaCl₂ za ispitivanje interferencija

Interferirajuća tvar	Ispitivane koncentracije
CaCl ₂	1x10 ⁻² M, 5x10 ⁻³ M, 2,5x10 ⁻³ M, 1,25x10 ⁻³ M
KCl	1x10 ⁻¹ M, 6x10 ⁻² M, 1x10 ⁻² M, 5x10 ⁻³ M
NaCl	2x10 ⁻² M, 3x10 ⁻² M, 5x10 ⁻² M, 10x10 ⁻³ M, 15x10 ⁻³ M, 20x10 ⁻³ M
NaHCO ₃	2x10 ⁻¹ M, 1,5x10 ⁻¹ M, 5x10 ⁻² M, 3x10 ⁻² M, 1x10 ⁻² M, 1x10 ⁻² M
MgSO ₄	2x10 ⁻³ M

c) diklofenak

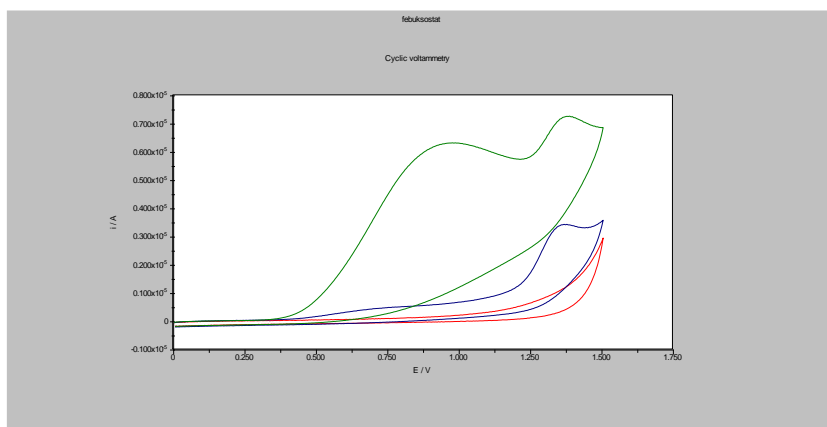
Diklofenak je dobiven ekstrakcijom iz tablete Voltaren forte 50 mg, Pliva. Tableta je usitnjena u tarioniku, a sadržaj izvagan na analitičkoj vagi i kvantitativno prebačen u tikvicu od 20,0 mL. Tikvica je nadopunjena ultračistom vodom do oznake i stavljena u ultrazvučnu kupelj na 10 minuta. Dio suspenzije potom je profiltriran kako bi se odstranile pomoćne tvari netopljive u vodi. Otpipetiran je prikladan volumen filtrata u tikvicu od 20,0 mL kako bi se dobile željene koncentracije (Tablica 3). Zatim su po potrebi dodane druge ispitivane tvari te BR pufer kojim je tikvica nadopunjena do oznake.

Tablica 3. Priprema otopina diklofenaka za ispitivanje interferencija

Interferirajuća tvar	Ispitivane koncentracije
diklofenak	1x10 ⁻⁴ M, 2x10 ⁻⁴ M, 2x10 ⁻⁵ M, 3x10 ⁻⁵ M, 4x10 ⁻⁵ M, 5x10 ⁻⁵ M

4. REZULTATI I RASPRAVA

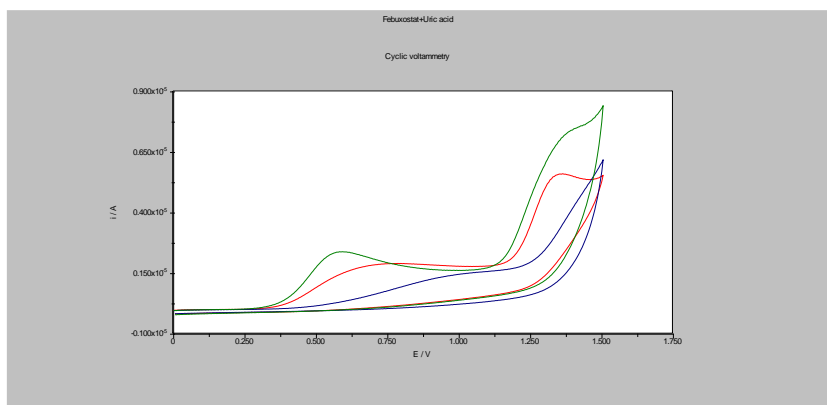
Elektrokemijska mjerenja otopine febuksostata i mokračne kiseline započeta su na elektrodi od staklastog ugljika primjenom cikličke voltametrije. Prije ispitivanja samih analita, napravljeno je zasebno mjerenje Britton-Robinson pufera pH vrijednosti 6. Matične otopine obiju supstancija koncentracije 1×10^{-2} M su prvo razrijeđene u BR puferu kako bi se dobile koncentracije od 5×10^{-5} M. Potencijal strujnog vrha oksidacije (E_p) febuksostata iznosio je 1,38 V, a pik mokračne kiseline nije bio vidljiv (Slika 8). Nakon toga je povećana koncentracija mokračne kiseline 10 puta, dok su svi ostali parametri ostali isti. Mjerenje je potom pokazalo potencijal strujnog vrha oksidacije i za mokračnu kiselinu na vrijednosti $E_p=0,88$ V. Iz toga se može zaključiti da je provedena voltametrijska metoda na elektrodi od staklastog ugljika osjetljivija za lijek nego za mokračnu kiselinu.



Slika 8. Ciklički voltamogrami febuksostata ($c=5 \times 10^{-5}$ M) i mokračne kiseline ($c=5 \times 10^{-4}$ M (zeleno) i $c=5 \times 10^{-5}$ M (plavo)) zabilježeni u BR puferu pH 6 na elektrodi od staklastog ugljika; sam BR pufer pH 6 (crveno)

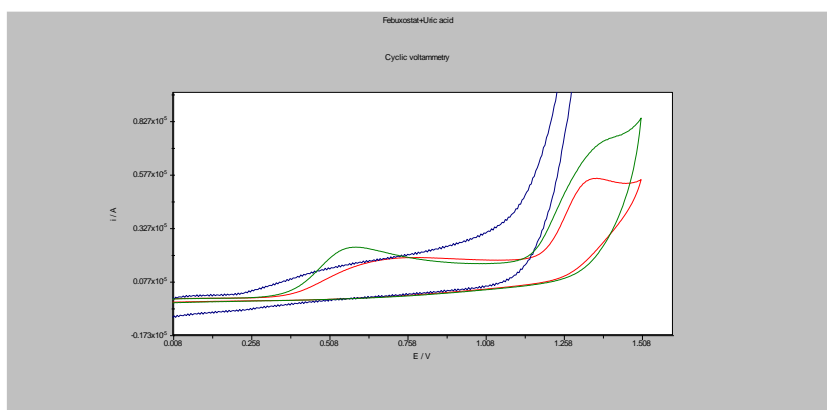
U svrhu poboljšanja osjetljivosti i voltametrijskog odgovora obaju analita, sljedeći korak bio je modificirati površinu elektrode od staklastog ugljika nanošenjem suspenzije nanomaterijala, točnije grafena u obliku pločica u 0,5%-tnoj otopini kitozana u 0.1% octenoj kiselini. Prvo mjerenje napravljeno je bez nanomaterijala, a sljedeća dva mjerenja nakon njihove primjene (Slika 9). Voltametrijski odgovor mokračne kiseline s modificiranom elektrodom je bolje definiran, ali i ujedno pomaknut ka nižim vrijednostima potencijala oksidacije, dok je strujni vrh lijeka veći, no slabije definiran. Nakon ponovljenog mjerenja na

modificiranoj elektrodi, rezultati nisu zadovoljavajući, najvjerojatnije uslijed adsorpcije analita na površinu elektrode.



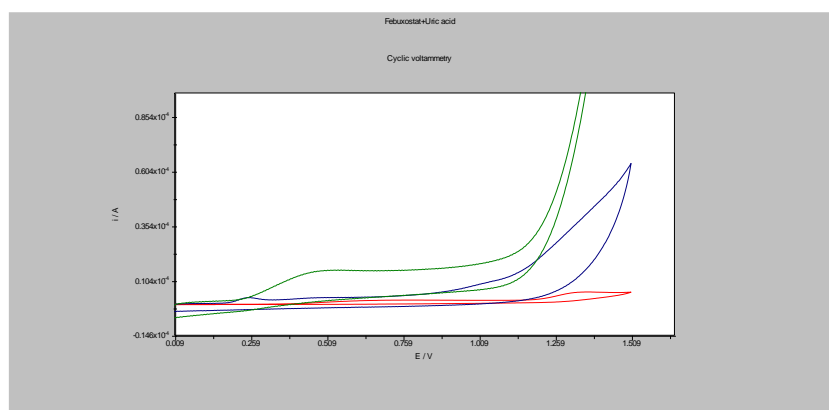
Slika 9. Ciklički voltamogrami febuksostata ($c=1 \times 10^{-4}$ M) i mokraćne kiseline ($c=1 \times 10^{-4}$ M) zabilježeni u BR puferu pH 6 na elektrodi od staklastog ugljika (crveno), GCE-GRP/Chit (zeleno) i drugo snimanje na GCE-GRP/Chit (plavo)

Za sljedeću modifikaciju GC elektrode nanomaterijalima upotrijebljena je također suspenzija grafena u obliku pločica u 0,3%-tnoj etanolnoj otopini Nafiona koja nije dala zadovoljavajuće rezultate (Slika 10). To je najvjerojatnije zbog toga što Nafion ima negativn naboj, baš kao i oba analita u uvjetima pH 6 (febuksostat ima pKa 3,3, a mokraćna kiselina 5,6).



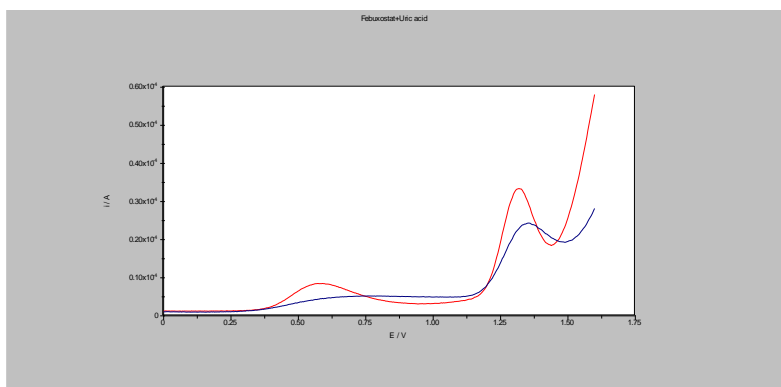
Slika 10. Ciklički voltamogrami febuksostata ($c=1 \times 10^{-4}$ M) i mokraćne kiseline ($c=1 \times 10^{-4}$ M) zabilježeni u BR puferu pH 6 na elektrodi od staklastog ugljika (crveno), GCE-GRP/Chit (zeleno) i GCE-GRP/Naf (plavo)

Površina elektrode od staklastog ugljika potom je modificirana suspenzijom grafena i ugljikovih nanovlakana (1:1) u 0,3%-tnoj etanolnoj otopini Nafiona. Voltametrijski odgovor mokraćne kiseline bio je dobro izražen, no strujni vrh lijeka preklapa se s pozadinskom strujom osnovnog elektrolita (Slika 11). Zadnja u nizu modifikacija površine elektrode nanomaterijalima napravljena je uz pomoć ugljikovih nanocjevčica. Suspenzija je ponovno izrađena u 0,5%-tnoj otopini kitozana u 0,1% octenoj kiselinu, no dobiveni su loši voltametrijski odgovori i mokraćne kiseline i lijeka (Slika 11).



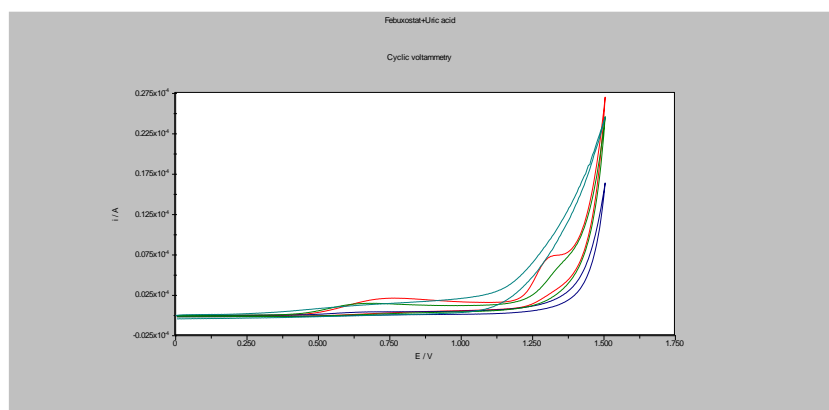
Slika 11. Ciklički voltamogrami febuksostata ($c=1 \times 10^{-4}$ M) i mokraćne kiseline ($c=1 \times 10^{-4}$ M) zabilježeni u BR puferu pH 6 na elektrodi od staklastog ugljika (crveno), na GCE-GRP/CNF/Naf (zeleno) i GCE-CNT/Chit (plavo)

U svrhu odabiranja najoptimalnije elektrode za nastavak mjerenja, uz dosad korištenu GC elektrodu, upotrijebljena je i dijamantna elektroda s primjesama bora (BDD elektroda). Ispitivanja su izvršena pri istim koncentracijama analita i pri istoj pH vrijednosti osnovnog elektrolita korištenjem pravokutnovalne voltametrije. Usporedbom dobivenih voltamograma, zaključeno je da su rezultati značajno bolji prilikom mjerenja na BDD elektrodi, tj. pikovi su veći, uži i bolje izraženi (Slika 12).



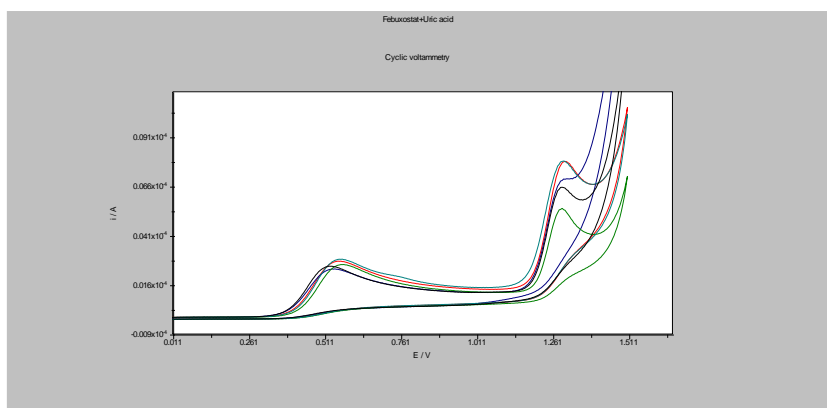
Slika 12. Pravokutnovalni voltamogrami febuksostata ($c=1 \times 10^{-4}$ M) i mokračne kiseline ($c=1 \times 10^{-4}$ M) zabilježeni u BR puferu pH 6 na dijamantnoj elektrodi s primjesama bora (crveno) i elektrodi od staklastog ugljika (plavo)

S obzirom da je BDD elektroda pokazala značajno bolje rezultate u odnosu na GC elektrodu, također su ispitane i njene modifikacije istim nanomaterijalima (Slika 13), u istim uvjetima kao i za GC elektrodu, no modifikacija površine nije dala bolje voltametrijske odgovore febuksostata i mokračne kiseline. Zbog svega navedenog, za razvoj voltametrijske metode korištena je samo nemođificirana BDD elektroda.



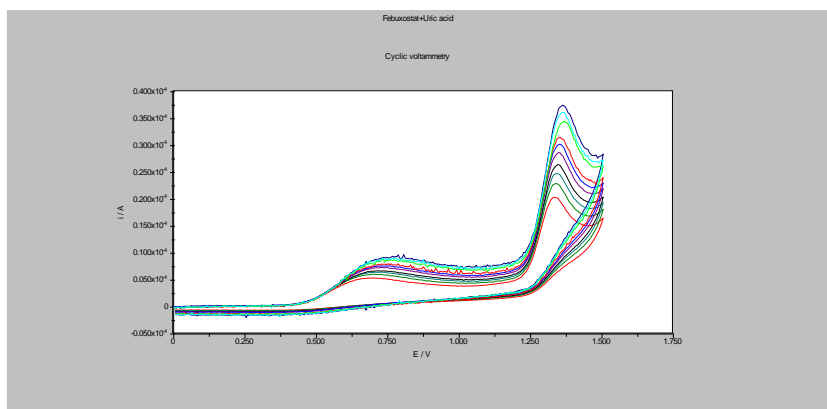
Slika 13. Ciklički voltamogrami febuksostata ($c=1 \times 10^{-4}$ M) i mokračne kiseline ($c=1 \times 10^{-4}$ M) zabilježeni u BR puferu pH 6 na dijamantnoj elektrodi s primjesama bora (crveno), BDDE-GRP/Chit (zeleno), BDDE-GRP/Naf (cijan) i BDDE-CNT/Chit (plavo)

Jedan od najbitnijih parametara u optimizaciji metode je odabir prikladne pH vrijednosti osnovnog elektrolita koji će se koristiti u svim daljnjim ispitivanjima. Upravo zbog toga bilo je potrebno usporediti cikličke voltamograme dobivene mjerenjem istih koncentracija analita pri različitim pH vrijednostima na BDD elektrodi (Slika 14). Uspoređene su pH vrijednosti BR pufera u rasponu od 5 do 8, a analizom voltametrijskih odgovora obaju analita, kao optimalna vrijednost odabran je BR pufer pH 6.



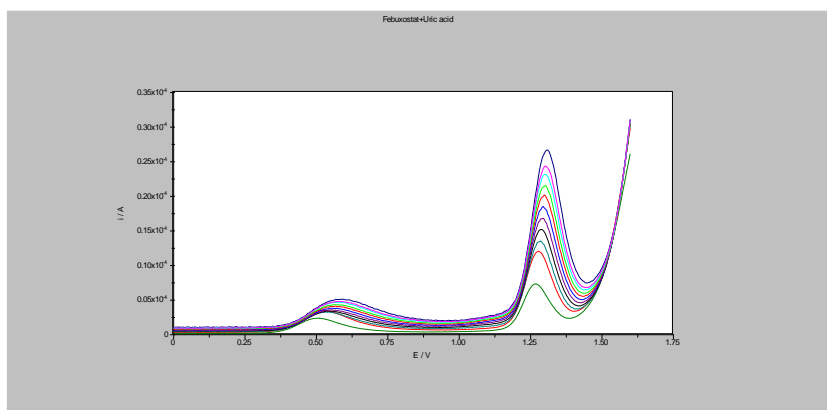
Slika 14. Ciklički voltamogrami febuksostata ($c=1 \times 10^{-4}$ M) i mokraćne kiseline ($c=1 \times 10^{-4}$ M) zabilježeni na dijamantnoj elektrodi s primjesama bora u BR puferu različitih pH vrijednosti: 5 (zeleno), 5,5 (cijan), 6 (crveno), 7 (crno) i 8 (plavo)

Nakon odabira optimalne pH vrijednosti osnovnog elektrolita, ispitan je utjecaj različitih brzina promjene potencijala na strujni vrh s ciljem dobivanja uvida u redoks proces na BDD elektrodi. Ciklički voltamogrami mjereni su pri brzinama promjene potencijala u rasponu od 25 mV/s do 3000 mV/s, a na slici 15 prikazan je dio navedenih mjerenja od 1000 mV/s do 3000 mV/s. Porastom brzine promjene potencijala dolazi do rasta vrijednosti struje, a potencijal strujnog vrha pomiče se prema pozitivnijim vrijednostima zbog ireverzibilnosti procesa oksidacije. Linearna ovisnost strujnog vrha o drugom korijenu brzine promjene potencijala ukazuje na to da se radi o difuzijski kontroliranim redoks procesima u kojima se febuksostat i mokraćna kiselina ireverzibilno oksidiraju.



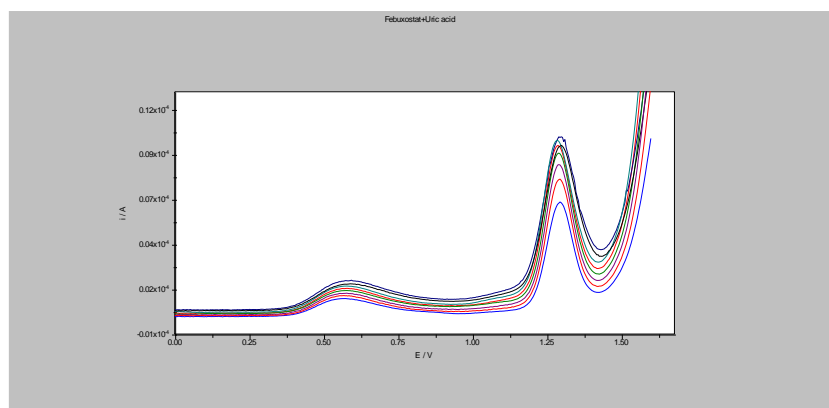
Slika 15. Ciklički voltamogrami febuksostata ($c=1 \times 10^{-4}$ M) i mokraćne kiseline ($c=1 \times 10^{-4}$ M) zabilježeni u BR puferu pH 6 na dijamantnoj elektrodi s primjesama bora pri različitim brzinama promjene potencijala: 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000, 2200, 2600, 2800 i 3000 mV/s

U razvoju pravokutnovalne voltametrijske metode mijenjane su vrijednosti frekvencije pulsa u rasponu od 25 Hz do 300 Hz (Slika 16). Izabrana je optimalna vrijednost od 50 Hz s obzirom da su pri toj frekvenciji dobiveni voltametrijski odazivi najbolje definiranog oblika, zadovoljavajuće brzine mjerenja i bez porasta pozadinske struje.



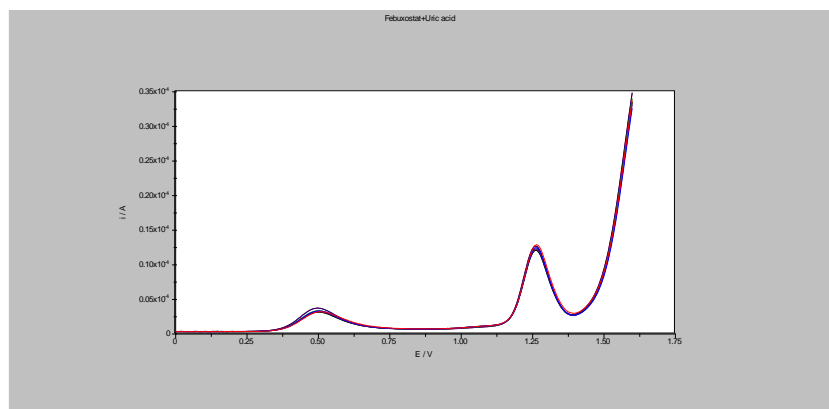
Slika 16. Pravokutnovalni voltamogrami febuksostata ($c=1 \times 10^{-4}$ M) i mokraćne kiseline ($c=1 \times 10^{-4}$ M) zabilježeni u BR puferu pH 6 na dijamantnoj elektrodi s primjesama bora pri različitim frekvencijama pulsa: 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250 i 300 Hz

Sljedeći korak u optimizaciji metode bio je određivanje prikladne vrijednosti amplitude pulsa. Mjerenja su napravljena pravokutnovalnom voltametrijom u rasponu od 15 mV do 50 mV (Slika 17), a kao optimalna vrijednost izabrana je amplituda pulsa od 35 mV. Pri toj vrijednosti voltametrijski odaziv karakteriziran je najvišim strujnim vrhom koji je zadovoljavajuće pozadinske struje.



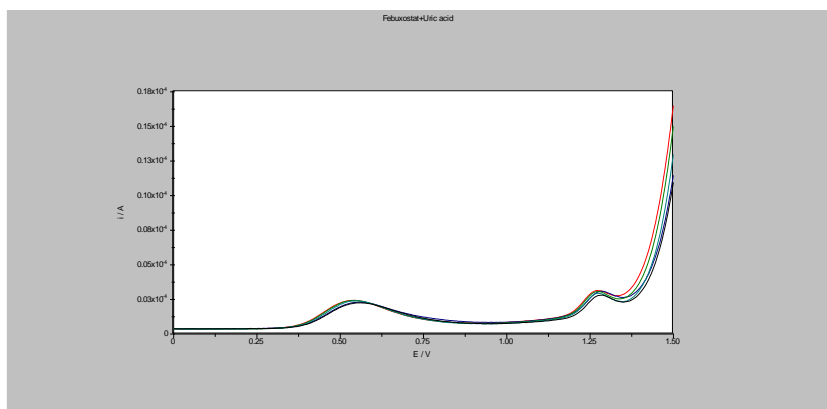
Slika 17. Pravokutnovalni voltamogrami febuksostata ($c=1 \times 10^{-4}$ M) i mokraćne kiseline ($c=1 \times 10^{-4}$ M) zabilježeni u BR puferu pH 6 na dijamantnoj elektrodi s primjesama bora pri različitim amplitudama pulsa: 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 i 50 mV ($f=35$ Hz, $dE=4$ mV)

Jedan od parametara validacije analitičkih metoda jest preciznost koja se među ostalim može iskazati i kao ponovljivost (repeatability) čija definicija je podudaranje rezultata dobivenih uzastopnim mjerenjem istog uzorka istom metodom pod istim uvjetima. Ponovljivost metode u ovom slučaju ispitana je pravokutnovalnom voltametrijom tako da je napravljeno 6 uzastopnih mjerenja bez čišćenja elektrode, a preklapanje dobivenih voltamograma pokazuje izvrsnu razinu ponovljivosti (Slika 18).



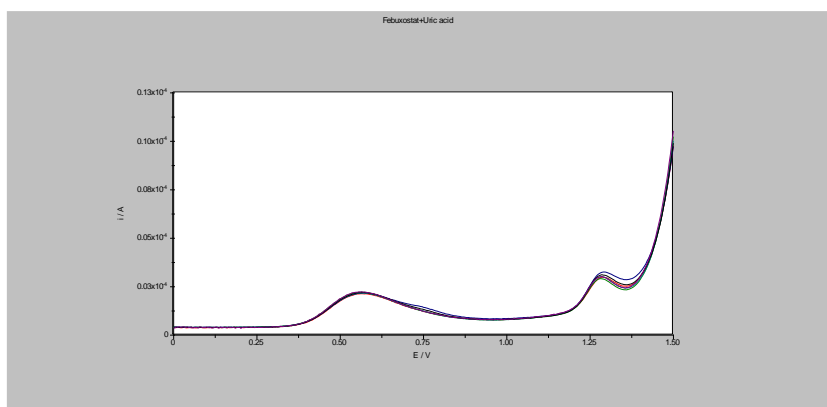
Slika 18. Ponovljeni pravokutnovalni voltamogrami febuksostata ($c=1 \times 10^{-4}$ M) i mokraćne kiseline ($c=1 \times 10^{-4}$ M) zabilježeni u BR puferu pH 6 na dijamantnoj elektrodi s primjesama bora ($f=50$ Hz, $E=35$ mV, $dE=4$ mV) bez čišćenja elektrode (6 mjerenja)

Ispitana je selektivnost pravokutnovalne voltametrijske metode kojom se dokazuje da na voltametrijske odazive ispitivanih analita (febuksostata i mokraćne kiseline) ne utječe prisutnost tvari koje su fiziološki prisutne u krvi u značajnijim koncentracijama kod osoba koje boluju od gihta. Ispitivanje interferencija temelji se na tome da se u ranije optimiziranim uvjetima mjere analiti zajedno s interferirajućim tvarima, a ukoliko dodane tvari ne ometaju mjerenja, vrijednosti struje oksidacije analita će biti iste prije i nakon njihova dodavanja. Prva ispitana interferirajuća tvar bila je glukoza čije su fiziološke vrijednosti u krvi u rasponu od $3,3 \times 10^{-3}$ M do $5,8 \times 10^{-3}$ M. Iz dobivenog voltamograma može se uočiti da se čak i pri višestruko većim koncentracijama od onih fizioloških ne vide nikakve interferencije, što znači da glukoza u krvi neće utjecati na potencijalna mjerenja (Slika 19).



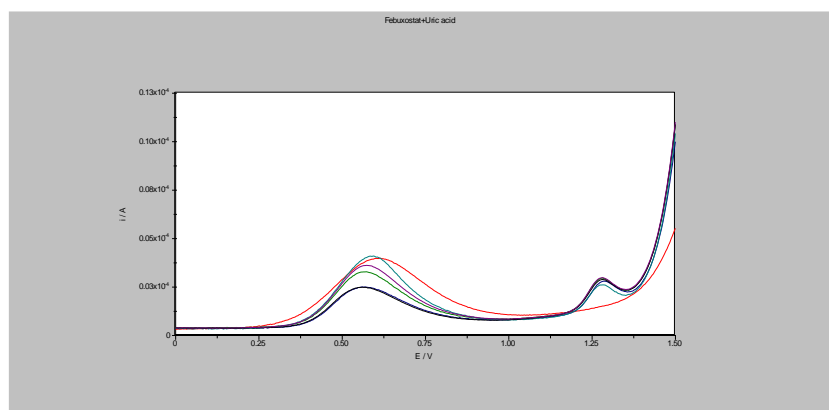
Slika 19. Pravokutnovalni voltamogrami febuksostata ($c=1 \times 10^{-5}$ M) i mokraćne kiseline ($c=1 \times 10^{-4}$ M) zabilježeni u BR puferu pH 6 na dijamantnoj elektrodi s primjesama bora ($f=50$ Hz, $E=35$ mV, $dE=4$ mV) uz dodatak glukoze ($c_1=3 \times 10^{-3}$ M, $c_2=4.5 \times 10^{-3}$ M, $c_3=6 \times 10^{-3}$ M, $c_4=9 \times 10^{-3}$ M, $c_5=1.2 \times 10^{-2}$ M)

Sljedeći korak bio je ispitivanje interferencija folne kiseline čije se koncentracije u krvi kreću od 7×10^{-9} M do $3,6 \times 10^{-8}$ M tako što je napravljen koncentracijski niz otopina u kojima su koncentracije analita nepromijenjene, dok se istovremeno količina dodane folne kiseline povećava. Preklapanje dobivenih voltamograma (Slika 20) unatoč postepenom povećanju koncentracije folne kiseline pokazuje da ona čak ni u vrlo visokim koncentracijama ne interferira sa željenim mjerenjima.



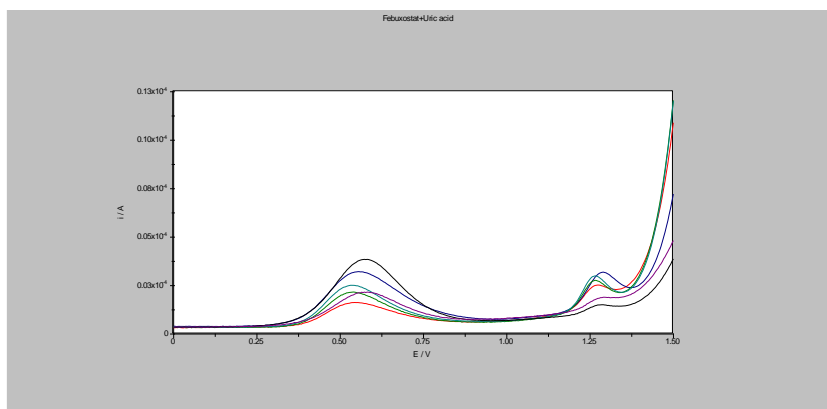
Slika 20. Pravokutnovalni voltamogrami febuksostata ($c=1 \times 10^{-5}$ M) i mokraćne kiseline ($c=1 \times 10^{-4}$ M) zabilježeni u BR puferu pH 6 na dijamantnoj elektrodi s primjesama bora ($f=50$ Hz, $E=35$ mV, $dE=4$ mV) uz dodatak folne kiseline ($c_1=2.5 \times 10^{-7}$ M, $c_2=5 \times 10^{-7}$ M, $c_3=1 \times 10^{-6}$ M, $c_4=2 \times 10^{-6}$ M, $c_5=5 \times 10^{-6}$ M i $c_6=1 \times 10^{-5}$ M)

Interferencije askorbinske kiseline ispitane su ponajviše iz razloga što literaturni podaci pokazuju da se ona oksidira pri vrijednosti potencijala oko 0,81 V zbog čega čak i unatoč niskim očekivanim koncentracijama može povećati strujni vrh mokraćne kiseline čija vrijednost E_p iznosi 0,55 V. Stoga je prvo izmjerena samo otopina askorbinske kiseline koncentracije 2×10^{-4} M, nakon čega je napravljen njen koncentracijski niz otopina kojem su dodavane nepromijenjene količine obaju analita (Slika 21). Kao što se i očekivalo, askorbinska kiselina utječe na struju voltametrijskog odgovora mokraćne kiseline u koncentraciji iznad $1,5 \times 10^{-5}$ M.



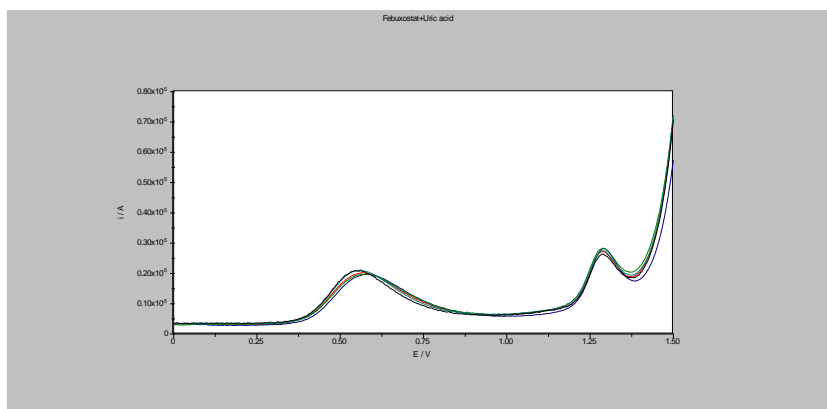
Slika 21. Pravokutnovalni voltamogrami febuksostata ($c=1 \times 10^{-5}$ M) i mokraćne kiseline ($c=1 \times 10^{-4}$ M) zabilježeni u BR puferu pH 6 na dijamantnoj elektrodi s primjesama bora ($f=50$ Hz, $E=35$ mV, $dE=4$ mV) uz dodatak askorbinske kiseline ($c_1=5 \times 10^{-6}$ M (plavo), $c_2=1 \times 10^{-5}$ M (zeleno), $c_3=2 \times 10^{-5}$ M (ljubičasto), $c_4=1 \times 10^{-4}$ M (cijan)); sama askorbinska kiselina ($c=2 \times 10^{-4}$ M (crveno))

Sljedeća u nizu ispitivanih interferirajućih tvari jest dopamin koji je prvo izmjeren zasebno u koncentracijama od 5×10^{-5} M i 1×10^{-6} M, pri čemu je uočeno da se potencijal strujnog vrha oksidacije preklapa s potencijalom mokraćne kiseline (Slika 22). Potom su različite koncentracije dopamina mjerene zajedno s analitima, a rezultati su samo potvrdili ranije spomenuto preklapanje. No, treba naglasiti da su koncentracije dopamina pri kojima dolazi do preklapanja pikova značajno veće od onih koje očekujemo u krvi bolesnika pa se iz toga može zaključiti da pri očekivanim koncentracijama dopamina u serumu ($0,2 \times 10^{-9}$ M) neće doći do analitički značajnih interferencija prilikom mjerenja.

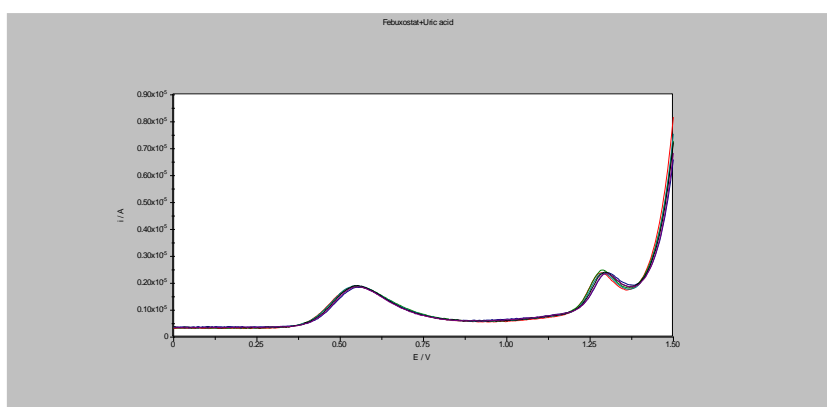


Slika 22 Pravokutnovalni voltamogrami febuksostata ($c=1 \times 10^{-5}$ M) i mokraćne kiseline ($c=1 \times 10^{-4}$ M) zabilježeni u BR puferu pH 6 na dijamantnoj elektrodi s primjesama bora ($f=50$ Hz, $E=35$ mV, $dE=4$ mV) uz dodatak dopamina ($c_1=2.5 \times 10^{-7}$ M (crveno), $c_2=5 \times 10^{-7}$ M (zeleno), $c_3=1 \times 10^{-6}$ M (cijan), $c_4=2.5 \times 10^{-5}$ M (plavo)); sam dopamin ($c_6=5 \times 10^{-5}$ M (ljubičasto), $c_7=1 \times 10^{-6}$ M (crno))

Anorganske tvari jedne su od najzastupljenijih sastavnica krvi pa je stoga logičan korak pri razvoju metode ispitati njihove potencijalne interferencije s promatranim analitima. U tu svrhu ispitan je utjecaj natrijevih, kalijevih, magnezijevih, kalcijevih i kloridnih iona, hidrogenkarbonata te sulfata čije su otopine pripremljene u širokom koncentracijskom rasponu, od vrlo niskih do onih koje su čak i višestruko veće od očekivanih fizioloških. Mjerenja su provedena nakon dodatka mokraćne kiseline i febuksostata u ispitivane otopine, a dobiveni rezultati pokazatelj su odsutnosti interferencije analita s bilo kojim od navedenih iona (Slika 23 i 24).



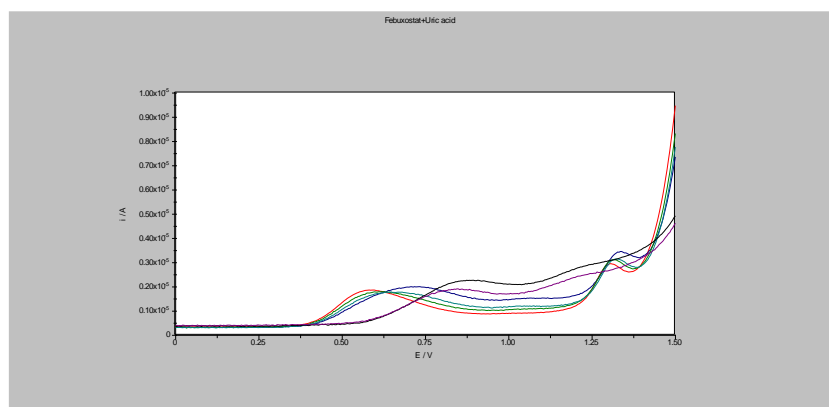
Slika 23. Pravokutnovalni voltamogrami febuksostata ($c=1 \times 10^{-5}$ M) i mokraćne kiseline ($c=1 \times 10^{-4}$ M) zabilježeni u BR puferu pH 6 na dijamantnoj elektrodi s primjesama bora ($f=50$ Hz, $E=35$ mV, $dE=4$ mV) uz dodatak KCl ($c_1=10 \times 10^{-2}$ M, $c_2=6 \times 10^{-2}$ M, $c_3=1 \times 10^{-2}$ M, $c_4=5 \times 10^{-3}$ M); uz dodatak $MgSO_4$ ($c=2 \times 10^{-3}$ M (plavo))



Slika 24. Pravokutnovalni voltamogrami febuksostata ($c=1 \times 10^{-5}$ M) i mokraćne kiseline ($c=1 \times 10^{-4}$ M) zabilježeni u BR puferu pH 6 na dijamantnoj elektrodi s primjesama bora ($f=50$ Hz, $E=35$ mV, $dE=4$ mV) uz dodatak NaCl ($c_1=2 \times 10^{-2}$ M, $c_2=3 \times 10^{-2}$ M, $c_3=5 \times 10^{-2}$ M, $c_4=10 \times 10^{-3}$ M, $c_5=15 \times 10^{-3}$ M, $c_6=20 \times 10^{-3}$ M)

Posljednja ispitivana interferirajuća tvar je diklofenak, nesteroidni protuupalni lijek koji se često koristi prilikom akutnih napadaja gihta za smanjenje boli i ublažavanje simptoma. Diklofenak je također zanimljiv u ovom kontekstu jer je poznato da se on oksidira na BDD elektrodi što i pokazuju voltamogrami samih otopina lijeka (Slika 25, ljubičasto i crno). Potencijal njegove oksidacije ne preklapa se s oksidacijom febuksostata, ali se zato

djelomično preklapa s oksidacijom mokračne kiseline zbog čega može uzrokovati interferencije, no samo pri relativno visokim koncentracijama, što znači da će to u realnim terapijskim okvirima biti analitički irelevantno.



Slika 25. Pravokutnovalni voltamogrami febuksostata ($c=1 \times 10^{-5}$ M) i mokračne kiseline ($c=1 \times 10^{-4}$ M) zabilježeni u BR puferu pH 6 na dijamantnoj elektrodi s primjesama bora ($f=50$ Hz, $E=35$ mV, $dE=4$ mV) uz dodatak diklofenaka ($c_1=2 \times 10^{-5}$ M (crveno), $c_2=3 \times 10^{-5}$ M (zeleno), $c_3=4 \times 10^{-5}$ M (cijan), $c_4=5 \times 10^{-5}$ M (plavo)); sam diklofenak ($c_5=1 \times 10^{-4}$ M (ljubičasto), $c_6=2 \times 10^{-4}$ M (crno))

5. ZAKLJUČAK

Ispitivani analiti, feboksostat i mokraćna kiselina, pokazali su se pogodnima za voltametrijska mjerenja s obzirom da se ireverzibilno oksidiraju, i to pri različitim potencijalima, čime su zadovoljeni temeljni uvjeti za njihovo simultano određivanje. Voltamogrami dobiveni mjerenjem na BDD elektrodi bili su značajno bolji u usporedbi s onima na GC elektrodi, a modifikacije obiju elektroda nanomaterijalima pokazale su se neuspješnima. Kao osnovni elektrolit izabran je Britton-Robinson pufer pH vrijednosti 6.

Primjenom cikličke voltametrije, ispitan je utjecaj različitih brzina promjene potencijala na strujni vrh, a u svrhu optimizacije parametara u pravokutnovalnoj voltametriji odabrane su vrijednosti frekvencije od 50 Hz i amplitude pulsa od 35 mV. Također, metoda je pokazala izvrsnu preciznost, tj. ponovljivost prilikom 6 uzastopnih mjerenja bez čišćenja elektrode.

Serumski elektroliti i folna kiselina nisu pokazali nikakve interferencije s mjerenjima analita. Dopamin, diklofenak i askorbinska kiselina pri koncentracijama značajno većima od očekivanih ulaze u interakcije s analitima zbog svojih oksidacijskih svojstava, no pri realnim očekivanim koncentracijama te interakcije nisu analitički značajne.

Osim već spomenute preciznosti, metoda također ima i zadovoljavajuću brzinu, selektivnost i osjetljivost za simultanu analizu feboksostata i mokraćne kiseline te posjeduje potencijal za moguću primjenu u praksi, tj. za određivanje njihove koncentracije u serumu ili urinu osoba koje boluju od gihta.

6. LITERATURA

1. Loiseau A, Launois P, Petit P, Roche S, Salvetat JP. Understanding Carbon Nanotubes, Springer-Verlag, Berlin, 2006.
2. Adenuric – EMA, www.ema.europa.eu, pristupljeno 2.2.2018.
3. Avena-Woods C, Hilar O. Febuxostat (Uloric), A New Treatment Option for Gout. *PT* 2010; 35(2):82-85.
4. Barr WG. Uric acid. In : Walker HK, Hall WD, Hurst JW, eds. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. 3rd edition. Boston: Butterworths; 1990.
5. Brett CMA, Brett AMO. 1993. *Electrochemistry, Principles, Methods and Applications*. Oxford University Press: New York.
6. Dalbeth N, Stamp LK. Xanthine Oxidase Inhibitor Treatment of Hyperuricemia. In: Terkeltaub R ed. *Gout & Other Crystal Arthropathies*. Philadelphia : Elsevier Saunders 2012, 154–173.
7. De Oliveira EP, Carlos Burini R. High plasma uric acid concentration: causes and consequences. *Diabetol Metabol Syndr* 2012;4:12.
8. Desideri G, Castaldo G, Lombardi A et al. Is it time to revise the normal range of serum uric acid levels? *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2014; 18(9):1295-306.
9. Elektroda od staklastog ugljika, <https://www.als-japan.com/1406.html>, pristupljeno 14.2.2018.
10. Fizikalno-kemijska svojstva lijeka, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Febuxostat>, pristupljeno 4.2.2018.
11. Fizikalno-kemijska svojstva lijeka, <https://www.tga.gov.au/sites/default/files/auspar-febuxostat-150108-pi.pdf>, pristupljeno 4.2.2018.
12. Fizikalno-kemijska svojstva mokraćne kiseline, <https://emedicine.medscape.com/article/983759-medication>, pristupljeno 6.2.2018.
13. Fortin i sur., 2005. Interfacing boron doped diamond and biology: An insight on its use for bioanalytical applications. *Electroanalysis*, 17: 517–526.
14. Frampton JE. Febuxostat: a review of its use in the treatment of hyperuricaemia in patients with gout. *Drugs* 2015; 75(4):427-38.
15. Hrvatski zavod za zdravstveno osiguranje, dopunska lista lijekova, www.hzzo.hr, pristupljeno 2.2.2018.

16. Hupert, M i sur., G.M. 2003. Conductive diamond thin-films in electrochemistry. *Diamond Related Mater.*, 12: 1940–1949.
17. J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, Wiley-VCH, New York, 2000.
18. Kissinger PT, Heineman WR. 1996. *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*, 2nd ed.; Marcel Dekker: New York.
19. Metabolizam purinskih nukleotida, <http://what-when-how.com/molecular-biology/purine-ribonucleotide-metabolism-molecular-biology/>, pristupljeno 6.2.2018.
20. Nigović B, Behetić S. Elektroanalitika u farmaciji. *Farmaceutski glasnik* 2007; 63(3): 163-175
21. Primjer cikličkog voltamograma, <https://www.zimmerpeacocktech.com/knowledge-base/faq/cyclic-voltammetry/>, pristupljeno 10.2.2018.
22. Sartori ER, Clausen DN, Pires IMR, Salamanca-Neto CAR. Sensitive square-wave voltammetric determination of tadalafil (Cialis®) in pharmaceutical samples using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode. *Diamond Related Mater.*, 2017; 77:153-158.
23. Sažetak opisa svojstava lijeka, www.halmed.hr, pristupljeno 2.2.2018.
24. Seiwerth S, Manojlović S, Damjanov I. Bolesti kostiju, zglobova i mekih tkiva. U : Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. ur. *Patologija*. 4. izdanje. Zagreb : Medicinska naklada 2014, 754-55.
25. Sevinc K, Sibel AO. Electrochemical carbon based nanosensors: A promising tool in pharmaceutical and biomedical analysis. *J Pharm Biomed Anal* 2018; 147:439-57.
26. Struktura febuksostata, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Febuxostat_Structural_Formulae_V.1.svg, pristupljeno 4.2.2018.
27. Urički artritis, <http://www.drlox.com/arthritis/gouty-arthritis/>, pristupljeno 2,2,2018.
28. Uslu B, Sibel AO. Electroanalytical Application of Carbon Based Electrodes to the Pharmaceuticals. *Analytical Letters* 2007;40:5, 817-853.
29. Voltametrijski uređaj 797 VA Computrace Metrohm, <https://www.metrohm.com/en/products/voltammetry/va-797-computrace/27970020>, pristupljeno 18.2.2018.
30. Y. Zhu i sur., Graphene and graphene oxide: synthesis, properties, and applications, *Adv. Mater.* 22 (35)(2010) 3906–3924.

7. SAŽETAK/SUMMARY

7.1. SAŽETAK

Febuksostat je selektivni, nepurinski inhibitor ksantin oksidaze indiciran za liječenje gihta, tj. stanja kronične hiperuricemije u kojima je već došlo do taloženja kristala mononatrijeva urata, ponajviše u zglobovima (urički artritis), ali i u mekim tkivima te unutrašnjim organima. Zbog svoje učinkovitosti, povoljne farmakokinetike, dobrog profila nuspojava i jednostavnosti primjene, febuksostat je polako počeo istiskivati starije terapijske opcije (ponajviše alopurinol) te se očekuje da će u skoroj budućnosti postati prva linija liječenja gihta. S obzirom na sve širu upotrebu lijeka, cilj istraživanja bio je razviti jednostavnu voltmetrijsku metodu za simultano praćenje njegove koncentracije i koncentracije urata koja je presudna za napredovanje i manifestaciju same bolesti.

Oksidacijska svojstva febuksostata i mokraćne kiseline praćena su na dijamantnoj elektrodi s primjesama bora cikličkom i pravokutnovalnom voltmetrijom. Ciklički voltamogrami pokazali su ireverzibilnu oksidaciju obaju analita u Britton-Robinson (BR) puferu u pH rasponu od 5,5 do 8 pri brzinama promjene potencijala od 25 mV/s do 3 V/s. Tijekom razvoja nove pravokutnovalne voltmetrijske metode, kao optimalan osnovni elektrolit odabran je BR pufer pH 6, amplituda pulsa 35 mV, frekvencija 50 Hz i ΔE 4 mV. Razlika potencijala oksidacije lijeka i mokraćne kiseline od 720 mV omogućava njihovu istovremenu kvantifikaciju (vrijeme analize svega 8 s). Ispitane su interferencije analita i fiziološki prisutnih tvari (glukoze, dopamina, Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- i HCO_3^- iona), često korištenih lijekova/suplemenata kod osoba koje boluju od gihta (diklofenak i folna kiselina) te askorbinske kiseline zbog njenih oksidacijskih svojstava. Nova metoda je selektivna, brza i mogla bi biti dovoljno osjetljiva za praćenje koncentracije febuksostata i mokraćne kiseline u serumu i urinu.

7.2. SUMMARY

Febuxostat is selective, non-purine xantine oxidase inhibitor used in the treatment of gout, i.e. chronic hyperuricemia with the presence of monosodium urate crystals mostly in the joint area (uric arthritis), but also in the soft tissue area and around internal organs. Because of its effectiveness, good pharmacokinetics, benign side effect profile and simple use, febuxostat has slowly started superseding common therapeutic options (mostly allopurinol) and it is expected soon to become the first line treatment for gout. Considering wider use of the drug, the research objective was to develop a simple voltammetric method for simultaneous determination of febuxostat and uric acid whose concentration is crucial for disease development and manifestation.

Oxidation properties of febuxostat and uric acid were examined by cyclic and square-wave voltammetry using boron doped diamond electrode. Cyclic voltammograms showed irreversible oxidation of both analytes in Britton-Robinson (BR) buffer in the pH range from 5.5 to 8 and in the scan rate from 25 mV/s to 3 V/s. During the new squarewave voltammetric method development, the optimal parameters were chosen: BR buffer pH 6, pulse amplitude 35 mV, frequency 50 Hz and potential step 4 mV. The difference in oxidation potentials of febuxostat and uric acid is 720 mV which is enabling their simultaneous quantification (analysis time only 8 s). Interferences were examined between analytes and physiologically present substances (glucose, dopamine, Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , HCO_3^-), frequently used drugs and supplements in gout management (diclofenac and folic acid) as well as ascorbic acid because of its oxidation properties. The new method is selective, rapid and could be sensitive enough for the determination of febuxostat and uric acid in serum and urine samples.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Razvoj voltametrijske metode za simultano određivanje febeksostata i mokraćne kiseline

Jakov Vlak

SAŽETAK

Febeksostat je selektivni, nepurinski inhibitor ksantin oksidaze indiciran za liječenje gihta, tj. stanja kronične hiperuricemije u kojima je već došlo do taloženja kristala mononatrijeva urata, ponajviše u zglobovima (urički artritis), ali i u mekim tkivima te unutrašnjim organima. Zbog svoje učinkovitosti, povoljne farmakokinetike, dobrog profila nuspojava i jednostavnosti primjene, febeksostat je polako počeo istiskivati starije terapijske opcije (ponajviše alopurinol) te se očekuje da će u skoroj budućnosti postati prva linija liječenja gihta. S obzirom na sve širu upotrebu lijeka, cilj istraživanja bio je razviti jednostavnu voltametrijsku metodu za simultano praćenje njegove koncentracije i koncentracije urata koja je presudna za napredovanje i manifestaciju same bolesti.

Oksidacijska svojstva febeksostata i mokraćne kiseline praćena su na dijamantnoj elektrodi s primjesama bora cikličkom i pravokutnovalnom voltametrijom. Ciklički voltamogrami pokazali su ireverzibilnu oksidaciju obaju analita u Britton-Robinson (BR) puferu u pH rasponu od 5,5 do 8 pri brzinama promjene potencijala od 25 mV/s do 3 V/s. Tijekom razvoja nove pravokutnovalne voltametrijske metode, kao optimalan osnovni elektrolit odabran je BR pufer pH 6, amplituda pulsa 35 mV, frekvencija 50 Hz i ΔE 4 mV. Razlika potencijala oksidacije lijeka i mokraćne kiseline od 720 mV omogućava njihovu istovremenu kvantifikaciju (vrijeme analize svega 8 s). Ispitane su interferencije analita i fiziološki prisutnih tvari (glukoze, dopamina, Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- i HCO_3^- iona), često korištenih lijekova/suplemenata kod osoba koje boluju od gihta (diklofenak i folna kiselina) te askorbinske kiseline zbog njenih oksidacijskih svojstava. Nova metoda je selektivna, brza i mogla bi biti dovoljno osjetljiva za praćenje koncentracije febeksostata i mokraćne kiseline u serumu i urinu.

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

Rad sadrži: 36 stranica, 25 grafičkih prikaza, 3 tablice i 30 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: febeksostat, mokraćna kiselina, ciklička voltometrija, pravokutnovalna voltometrija, GC elektroda, BDD elektroda

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

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

Dr. sc. Miranda Sertić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Sandra Jurić, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: ožujak 2018.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

Development of voltammetric method for simultaneous determination of febuxostat and uric acid

Jakov Vlak

SUMMARY

Febuxostat is selective, non-purine xanthine oxidase inhibitor used in the treatment of gout, i.e. chronic hyperuricemia with the presence of monosodium urate crystals mostly in the joint area (uric arthritis), but also in the soft tissue area and around internal organs. Because of its effectiveness, good pharmacokinetics, benign side effect profile and simple use, febuxostat has slowly started superseding common therapeutic options (mostly allopurinol) and it is expected soon to become the first line treatment for gout. Considering wider use of the drug, the research objective was to develop a simple voltammetric method for simultaneous determination of febuxostat and uric acid whose concentration is crucial for disease development and manifestation.

Oxidation properties of febuxostat and uric acid were examined by cyclic and square-wave voltammetry using boron doped diamond electrode. Cyclic voltammograms showed irreversible oxidation of both analytes in Britton-Robinson (BR) buffer in the pH range from 5.5 to 8 and in the scan rate from 25 mV/s to 3 V/s. During the new squarewave voltammetric method development, the optimal parameters were chosen: BR buffer pH 6, pulse amplitude 35 mV, frequency 50 Hz and potential step 4 mV. The difference in oxidation potentials of febuxostat and uric acid is 720 mV which is enabling their simultaneous quantification (analysis time only 8 s). Interferences were examined between analytes and physiologically present substances (glucose, dopamine, Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Cl⁻, HCO₃⁻), frequently used drugs and supplements in gout management (diclofenac and folic acid) as well as ascorbic acid because of its oxidation properties. The new method is selective, rapid and could be sensitive enough for the determination of febuxostat and uric acid in serum and urine samples.

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

Thesis includes: 36 pages, 25 figures, 3 tables and 30 references. Original is in Croatian language.

Keywords: febuxostat, uric acid, cyclic voltammetry, squarewave voltammetry, GC electrode, BDD electrode

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

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

The thesis was accepted: March 2018

