

# Razvoj nove elektroanalitičke metode za određivanje febuksostata

---

Milanović, Ivona

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:163:905547>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-01**



Repository / Repozitorij:

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



**Ivona Milanović**

**Razvoj nove elektroanalitičke metode za  
određivanje febuksostata**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

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

Zahvaljujem se svojoj mentorici, prof.dr.sc. Biljani Nigović, na stručnoj pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada, na njenoj nesebičnoj želji za podjelom velikog znanja i iskustva te na njenim savjetima koji su mi pomogli odabrati smijer kojim želim ići u mom daljnjem akademskom i profesionalnom obrazovanju.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. FEBUKSOSTAT.....	2
1.2. ELEKTROANALITIČKE METODE.....	5
1.2.1. VOLTAMETRIJA.....	5
1.2.1.1. CIKLIČKA VOLTAMETRIJA.....	6
1.2.1.2. PRAVOKUTNO-VALNA VOLTAMETRIJA.....	8
1.3. KRUTE ELEKTRODE.....	10
1.3.1. DIJAMANTNA ELEKTRODA SA PRIMJESAMA BORA....	11
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	<b>14</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>16</b>
3.1. KEMIKALIJE.....	17
3.2. RADNI INSTRUMENTI.....	18
3.3. UVJETI MJERENJA.....	18
3.4. PRIPREMA OTOPINA.....	19
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>22</b>
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>36</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>37</b>
<b>7. SAŽETAK/SUMMARY</b> .....	<b>40</b>
7.1. SAŽETAK.....	41
7.2. SUMMARY.....	42

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA /BASIC  
DOCUMENTATION CARD**

## **1. UVOD**

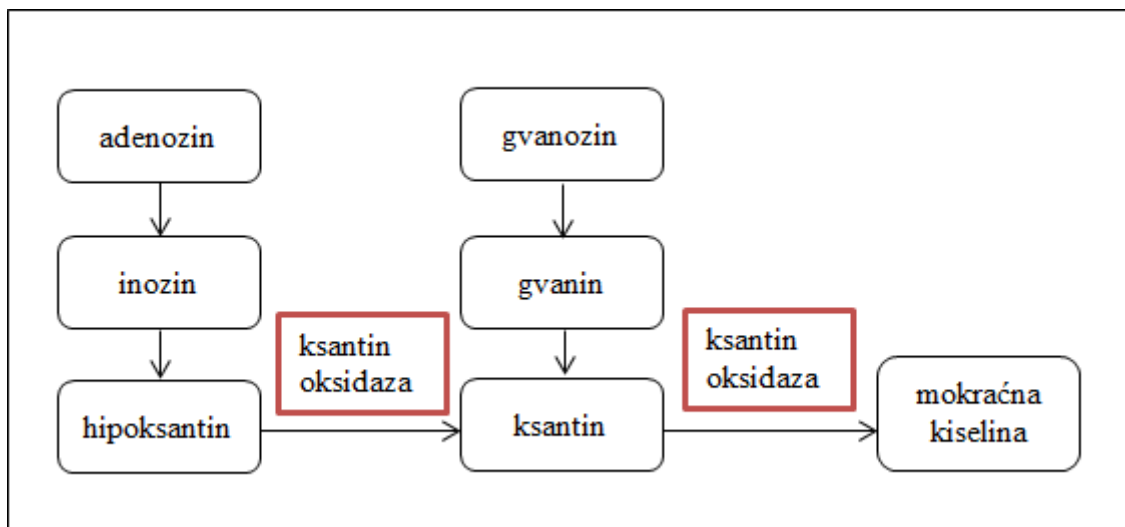
## 1.1 FEBUKSOSTAT

Febuksostat je lijek indiciran za liječenje dugotrajne hiperuricemije te za liječenje i sprječavanje visoke razine mokraćne kiseline u krvi u odraslih koji primaju kemoterapiju za rak krvi i kod kojih postoji opasnost od nastanka sindroma lize tumora ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)). U Republici Hrvatskoj, Hrvatski zavod za zdravstveno osiguranje djelomično pokriva trošak liječenja (dopunska lista lijekova) samo za one bolesnike kod kojih je prethodno provedena terapija alopurinolom, ali bezuspješno, i u onih koji su na alopurinol razvili alergijsku reakciju ([www.hzzo.hr](http://www.hzzo.hr)).

Istraživanja pokazuju da febuksostat učinkovitije snižava razine mokraćne kiseline nego alopurinol (Singh i sur., 2015). Lijek je razvila tvrtka Menarini International Operations Luxembourg S.A., a u Europskoj uniji odobren je centraliziranim postupkom davanja odobrenja za stavljanje u promet lijeka 21. travnja 2008. godine. Izdaje se na recept, u ljekarni.

Giht je metabolička reumatska bolest koju karakterizira hiperuricemija (povišena razina mokraćne kiseline u krvi), a što rezultira odlaganjem kristala natrijevog urata u zglobovima i tetivama. Mokraćna kiselina slabo je topljiva supstancija koja je glavni produkt metabolizma purina u ljudskom tijelu (Furst i sur., 2012). Kod većine sisavaca prisutan je enzim urat-oksidaza koji razgrađuje mokraćnu kiselinu na allantoin koji je pak puno bolje topljiv i koji se lakše izlučuje urinom. Nažalost, kod ljudi taj enzim nije prisutan.

Metabolički put purinskih baza prikazan je na Slici 1. Ksantin oksidaza je enzim koji prevodi hipoksantin u ksantin i ksantin u mokraćnu kiselinu. Febuksostat djeluje kao snažan, nepurinski, selektivni inhibitor ksantin oksidaze, a u terapijskim koncentracijama ne inhibira druge enzime uključene u metabolizam purina ili pirimidina ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)). Inhibicijom ovog enzima sprječava se biosinteza mokraćne kiseline.

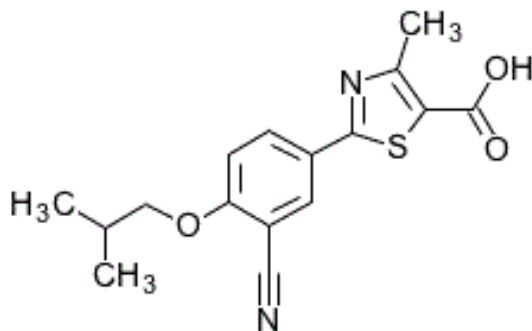


Slika 1. Metabolički put purinskih baza u ljudskom organizmu

U kliničkim studijama dokazano je da je febeksostat u dnevnoj dozi od 80 mg odnosno 120 mg učinkovitiji u snižavanju serumskih koncentracija urata od alopurinola u standardnoj dnevnoj dozi od 300 mg (Furst i sur., 2012). Terapijski cilj je smanjiti i održavati razine mokraćne kiseline u serumu ispod 6 mg/dL (357  $\mu$ mol/L).

Febeksostat ima prividnu srednju vrijednost poluvremena eliminacije ( $t_{1/2}$ ) od oko 5 do 8 sati. Brzo se ( $t_{max}$  1,0 - 1,5 h) i dobro apsorbira (najmanje 84%). Može se uzimati neovisno o hrani. Vezanje febeksostata na proteine plazme je oko 99,2% (ponajprije na albumin). Vezanje aktivnih metabolita na proteine plazme je u rasponu od oko 82% do 91%. Febeksostat se opsežno metabolizira konjugacijom putem sustava enzima uridin difosfat glukuronoziltransferaze (UDPGT) i oksidacijom putem sustava citokroma P450 (CYP). Identificirana su četiri farmakološki aktivna hidroksil metabolita, od kojih se tri pojavljuju u plazmi kod ljudi. Eliminira se putem bubrega i jetre ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

Febuksostat se ubraja u skupinu tiazolkarboksilnih kiselina i njenih derivata, a prema IUPAC-u se imenuje kao 2-(3-cijano-4-izobutoksifenil)-4-metil-1,3-tiazol-5-karboksilna kiselina (Slika 2). Molekulska masa iznosi 316,375 g/mol,  $pK_{a1} = 0,39$  i  $pK_{a2} = 3,08$ , a točka tališta je na  $238^{\circ}\text{C}$  ([www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca)). Topljivost u vodi iznosi 0,0183 mg/mL pa je gotovo netopljiv u njoj. Ipak, umjereno je topljiv u etanolu, metanolu i acetonitrilu, a značajno u dimetilsulfoksidu i dimetilformamidu ([www.rxlist.com](http://www.rxlist.com)).



Slika 2. Struktura febuksostata (preuzeto sa: [www.genome.jp](http://www.genome.jp))



## 1.2 ELEKTROANALITIČKE METODE

Elektroanalitičke metode imaju široku primjenu u farmaciji (Brooks i sur., 1996). 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 (Wang, 2000). Prema tome, postoji više vrsta elektroanalitičkih metoda, a to su voltometrija, potenciometrija, elektrogravimetrija, kulometrija, konduktometrija, kronoamperometrija i kronopotenciometrija. Neke od njih primjenjuju se u farmakopeji (European Pharmacopoeia 8th ed, 2014).

### 1.2.1 VOLTAMetriJA

Voltometrija je elektroanalitička tehnika koja se zasniva na mjerenju jakosti struje ovisno o promjeni potencijala. Grafički prikaz toga zove se voltamogram. Postoji više vrsta voltometrijskih tehnika, primjerice ciklička, diferencijalna pulsna i pravokutnovalna voltometrija.

Voltometrija se smatra aktivnom tehnikom (suprotno od pasivne tehnike kao što je primjerice potenciometrija) zato što primjenjen potencijal elektrokemijski reducira ili oksidira elektroaktivne specije na površini elektrode te tako potiče promjenu njihove koncentracije (Kounaves, 1997).

Neke od prednosti voltometrije su vrlo dobra osjetljivost, brzo vrijeme analize te relativno niska cijena analize (u odnosu na neke druge analitičke tehnike).

Osnovne su jedinice modernog voltometrijskog instrumenta, osim računala, potencijostat i elektrokemijski članak. Elektrokemijski članak služi kao nosač otopine analita u koju su uronjene elektrode (Nigović i Behetić, 2007) (Slika 3).

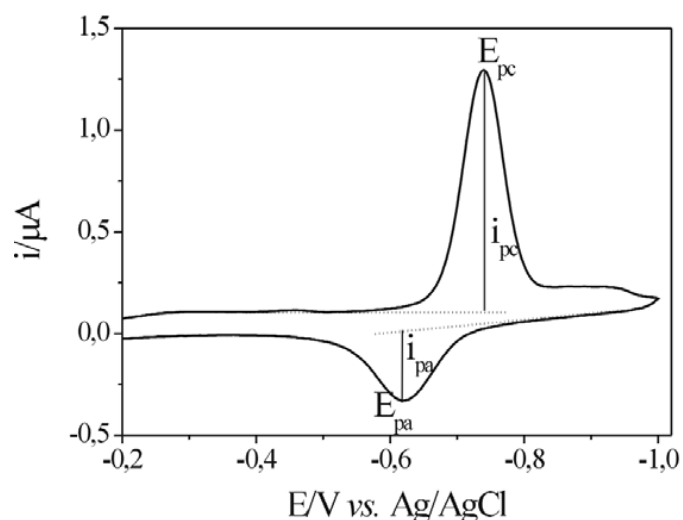


Slika 3. Prikaz voltametrijskog uređaja 797 VA Computrace proizvođača Metrohm (preuzeto sa: [www.metrohm.com](http://www.metrohm.com))

U voltametriji se koriste tri elektrode, radna, referentna i protuelektroda. Na radnoj elektrodi odvija se reakcija oksidacije ili redukcije, dok referentna i protuelektroda služe za mjerenje potencijala odnosno struje. Potencijal se mjeri između radne i referentne elektrode, a struja između radne i protuelektrode (Nigović i Behetić, 2007). Vrlo važno svojstvo elektroda koje se koriste u analizi jest njihova konstantna površina što osigurava reproducibilnost mjerenja.

### **1.2.1.1 CIKLIČKA VOLTAMETRIJA**

Ciklička voltametrija vrsta je voltametrijske tehnike u kojoj se linearno mijenja primjenjeni potencijal, pri čemu se mjeri struja, a potom se smjer promjene potencijala promjeni u suprotnom smjeru. Raspon potencijala u oba smjera isti je, kao što se vidi na primjeru prikazanom na Slici 4. Primjerice, prvo se mjeri od 0 V do -1,0 V, a potom od -1,0 V do 0 V.



Slika 4. Ciklički voltamogram olsalazina na elektrodi s visećom živinom kapi u Britton-Robinson puferu pri pH 10; brzina promjene potencijala 500 mV/s–1 (Nigović i sur., 2005).

Iz voltamograma dobivenog cikličkom voltametrijom najvažniji podaci jesu potencijal vrha redukcije ( $E_{pc}$ ) i oksidacije ( $E_{pa}$ ) te jakost struje u tim vrhovima ( $i_{pc}$  i  $i_{pa}$ ).

Ukoliko je proces oksidacije odnosno redukcije reverzibilan (u slučaju da je prijenos elektrona puno brži u odnosu na ostale procese), voltamogram će u biti simetričan. Dakle, već iz samog izgleda cikličkog voltamograma možemo dobiti neke podatke o redoks potencijalu ispitivanog lijeka.

Ciklička se voltametrija primjenjuje za istraživanje kinetike i mehanizama redoks reakcija, određivanje redoks potencijala i broja izmjenjenih elektrona, istraživanje adsorpcijskih procesa i kemijskih reakcija koje prethode ili slijede prijenos elektrona (Wang, 2000)

Kao što je već rečeno, pomoću cikličke voltametrije može se odrediti broj izmjenjenih elektrona i to iz razlike potencijala vrhova:

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

Iz te jednadžbe proizlazi da, pri temperaturi od 25°C,  $\Delta E_p$  za jedan elektron iznosi 60mV.

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

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

gdje su  $i_p$  = vršna jakost struje (A),  $A$  = površina elektrode ( $\text{cm}^2$ ),  $c_0$  = koncentracija otopine ( $\text{mol/cm}^3$ ),  $D$  = difuzijski koeficijent ( $\text{cm}^2/\text{s}$ ),  $v$  = brzina promjene potencijala ( $\text{V/s}$ ).

Međutim, spomenuta jednažba primjenjiva je samo za reverzibilne procese. U slučaju da se radi o ireverzibilnom procesu ona se mora korigirati te glasi:

$$i_p = (2,99 \times 10^5) n (\alpha n_a)^{1/2} A C D^{1/2} v^{1/2}$$

gdje je  $n_a$  broj elektrona u koraku prijenosa naboja, a  $\alpha$  koeficijent prijenosa.

Nedostatak cikličke voltametrije je njena osjetljivost, obzirom da granica detekcije analita iznosi od  $10^{-5}$  M do  $10^{-6}$  M pa se tehnika rijetko koristi za kvantitativnu analizu.

### **1.2.1.2 PRAVOKUTNOVALNA VOLTAMETRIJA**

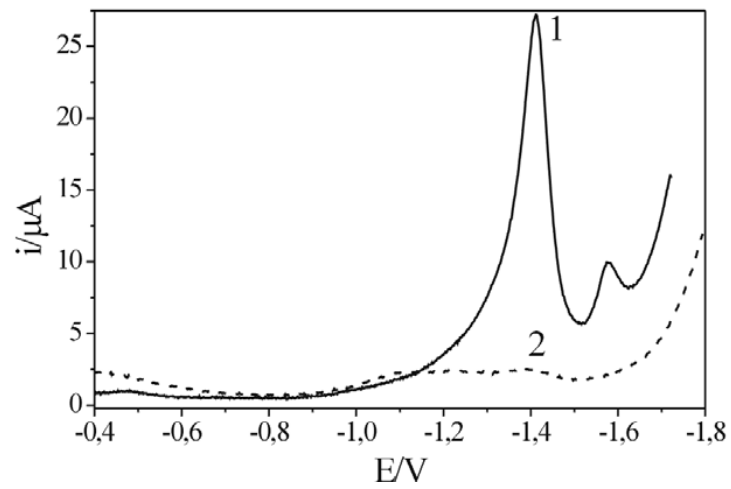
Pravokutnovalna voltametrija ubraja se u pulsne tehnike. Pulsne tehnike razvile su se iz želje za povećanjem brzine i osjetljivosti klasične izvedbe voltametrije.

U prednost pravokutnovalne voltametrije sigurno se ubraja njena velika brzina jer je za snimanje cijelog voltamograma potrebno samo nekoliko sekundi. Također, tehnika ima vrlo niske granice detekcije analita, do  $10^{-8}$  M, pa se koristi i za kvantitativne analize.

Glavni parametar u pravokutnovalnoj voltametriji jest frekvencija. Upravo frekvencije od 1 do 100 ciklusa u sekundi dopuštaju upotrebu ekstremno brzih promjena potencijala (Nigović i Behetić, 2007).

Signal pobude dobije se kad se niz pravokutnovalnih pulseva doda na stepeničasti signal potencijala (Wang, 2000). Struja se mjeri na kraju uzlaznog pulsa, koji proizvodi katodnu struju, i na kraju silaznog pulsa, koji proizvodi anodnu struju. Razlika tih struja razmjerna je koncentraciji analita u otopini (Nigović i Behetić, 2007).

Primjer voltamograma dobivenog pravokutnovalnom voltametrijom prikazan je na Slici 5.



Slika 5. Pravokutnovalni voltamogram simvastatina na elektrodi s visećom žvinom kapi u 0,1 M fosfatnom puferu pri pH 7 prije (1) i nakon (2) akumulacije od 30 sekundi (Nigović i Komorsky-Lovrić, 2008)

### 1.3 KRUTE ELEKTRODE

Kao što je ranije spomenuto, u voltometriji se koriste tri elektrode, radna, referentna i protuelektroda. Na krutim elektrodama, koje se koriste kao radne elektrode, odvija se reakcija oksidacije ili redukcije. Karakteristike krute elektrode i materijal od kojeg je ona građena značajno utječu na svojstva i mogućnosti voltometrijske tehnike.

Krute elektrode počele su se razvijati 50-ih godina 20. stoljeća. Postoji mnogo vrsta, ovisno o materijalu od kojeg je građena njihova površina. Primjerice, elektroda od staklastog ugljika (eng. glassy-carbon, GC), platinska elektroda, zlatna elektroda te dijamantna elektroda. Naravno, površina elektrode može biti dodatno modificirana čime se dodatno utječe na performanse tehnike. Dodatan parametar jest promjer površine elektrode pa tako postoje elektrode rađene od istog materijala, ali različitog promjera, primjerice 1 mm, 2 mm odnosno 3 mm. Također, mogu biti različitih oblika, primjerice planarne ili okrugle te raznih dimenzija.

Radna elektroda mora imati velik omjer signal-šum te mora davati reproducibilne rezultate. Odabir elektrode ovisi o redoks svojstvima ispitivanog lijeka te pozadinskoj struji unutar raspona potencijala pri kojem se vrši mjerenje. Elektroda također mora biti elektrokemijski inertna tijekom širokog raspona potencijala, mora imati visok prednapon za razvoj vodika i kisika, nisku pozadinsku struju te mogućnost jednostavne regeneracije površine (Uslu i Ozkan, 2007).

Nedostatak krutih elektroda je ovisnost njihovog odgovora o stanju površine elektrode. One zahtjevaju obradu prije upotrebe i poliranje kako bi se dobili reproducibilni rezultati. Poliranje se često koristi za metalne elektrode dok se razne kemijske, elektrokemijske i termičke procedure koriste za aktivaciju ugljikovih elektroda (Wang, 2000).

### 1.3.1 DIJAMANTNA ELEKTRODA S PRIMJESAMA BORA

Dijamantna elektroda vrsta je ugljikove elektrode. Općenito, ugljikove elektrode možemo podijeliti na homogene i heterogene, a dijamantna elektroda spada u homogene.

Iako je dijamant poznati izolator, dijamant s primjesama bora pokazuje elektronska svojstva u rasponu od poluvodiča do polumetala te je jako koristan za elektrokemijska mjerenja. Dijamantna elektroda s primjesama bora (eng. bor-doped diamond electrode, BDDE) ima brojna privlačna svojstva, primjerice velik raspon potencijala, nisku i stabilnu pozadinsku struju, dobar omjer signal-šum, zanemarivu adsorpciju organskih analita, dobru elektrokemijsku reaktivnost bez predobrade, nisku osjetljivost na otopljeni kisik te veliku čvrstoću. (Wang, 2000)

U odnosu na klasične ugljikove materijale i metalne elektrode, BDD elektrode razlikuju se zbog njihove izvanredne kemijske inertnosti i stabilnosti zbog čega se mogu koristiti u ekstremnim kemijskim uvjetima, primjerice u jako kiselom mediju. Također, dijamant nudi prednost nad drugim elektrodama u smislu linearnosti raspona, limita detekcije (LOD), vremena, preciznosti te stabilnosti odgovora (Uslu i Ozkan, 2007).

Primjena detektora u tekućinskim protočnim analizama, a koji se zasnivaju na BDD elektrodama, započela je 1997. godine s protočnom injekcijskom analizom (eng. flow-injection analysis, FIA) etilendiamina i etilenamina s amperometrijskim detektorom. Godine 1999. ista detekcijska ćelija spregnuta je s ionskom kromatografijom nitrata i azida. 1998. godine prve BDD mikroelektrode (BDD $\mu$ E) pokazale su cikličke voltamograme, a 5 godina kasnije korištene su i u kapilarnoj zonskoj elektroforezi, uređajima sa čipovima i u *in vivo/in vitro* uvjetima. Godine 2000. niz BDD $\mu$ E je nagoviješteno, a taj trend minijaturizacije pokazuje i nedavni izvještaj o izradi BDD nano-elektroda (Pecková i sur., 2009).

Kako bi se povećala selektivnost BDD elektrode, intenzivno se istražuje oksidiranje površine te njene druge modifikacije. Tako je razvijena OBDD elektroda, odnosno elektroda sa oksidiranom površinom (eng. O-terminated BDDE). Daljnja biofunkcionalizacija obične i oksidirane dijamantne površine omogućena je uvođenjem karboksilnih i amino skupina. Od 1998. godine, takve funkcionalizirane površine modificirane su s DNA, enzimima i

proteinima, što je otvorilo put ka primjeni dijamantnih senzora u biotehnologiji (Pecková i sur., 2009).

Iako se analitička primjena BDD elektroda može uočiti u analizi i anorganskih i organskih analita, vidljivo je intenzivno istraživanje organskih analita. Neki od lijekova koji su do sada analizirani pomoću cikličke voltametrije (CV), pravokutnovalne voltametrije (SWV), diferencijalnopulsne voltametrije (DPV) te FIA analize s amperometrijskom detekcijom (FIA/AD), navedeni su u Tablici 1. Većinom se radi o analitima koji oksidiraju, međutim primjer kloramfenikola prikazuje i njene mogućnosti u redukcijским analizama. U Tablici 1., osim ako nije drugačije navedeno, LOD se odnosi na ekperimentalne otopine priređene s ultračistom vodom, a omjer signal:šum iznosi 3. Treba istaknuti da su rađena i istraživanja primjene BDD elektrode kao senzora u analizi seruma, kao što je to primjerice u analizi fluvastatina.



Analit	Elektroanalitička tehnika i vrsta elektrolita	LOD ( $\mu\text{mol L}$ )	Literatura
paracetamol	CV, 0.1 M fosfatni pufer, pH 8	10	Wangfuengkanagul i Chailpakul, 2002
	FIA/AD, tankoslojna ćelija (BAS), 0.1 M fosfatni pufer pH 8	0.01, $S:N = 4$	
kaptopril	CV, 0.1 M fosfatni pufer pH 9	25	Siangproh i sur., 2003
	FIA/AD, tankoslojna ćelija (BAS), 0.1 M fosfatni pufer pH 8	0.01	
kloramfenikol	CV, 0.1 M fosfatni pufer pH 6 u 1% etanolu	nema podataka	Chuanuwatanakul i sur., 2008
	FIA/AD, tankoslojna ćelija (BAS), mobilna faza kao u CV	0.03	
klorpromazin	FIA/AD, tankoslojna ćelija laboratorijske izrade (7), 0.1 MKCl + 0.01 M HClO <sub>4</sub>	0,004	Granger i sur., 1999
fluvastatin natrij	DPV, BR pufer pH 10	0.457; 0.710 u serumu	Dogan i sur., 2007
	SWV, BR pufer pH 10	0.481; 0.108 u serumu	
lidokain	SWV, BR pufer pH 2	0,015 <sup>c</sup>	Oliveira i sur., 2007
linkomicin	CV, 0.1 M fosfatni pufer pH 7	40	Boonsong i sur., 2005
	FIA/AD, tankoslojna ćelija (BAS), 0.1 M fosfatni pufer pH 7	0.02	
naproksen	DPV, 0.1 M LiClO <sub>4</sub> u acetonitrilu (CH <sub>3</sub> CN)	0.097	Suryanarayan i sur., 2005
tetraciklin	CV, 0.1 M fosfatni pufer pH 2	nema podataka	Treetepvijit i sur., 2005
	FIA/AD, tankoslojna ćelija (BAS), 0.1 M fosfatni pufer pH 2	0.01	

Tablica 1. Prikaz nekih od lijekova do sada analiziranih pomoću BDD elektrode te odgovarajući LOD

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Febuksostat je lijek od velikog značenja za liječenje bolesnika s hiperuricemijom i gihtom. Budući da je relativno novi lijek na tržištu Europske unije, ali i šire, nema mnogo publiciranih znanstvenih radova iz područja razvoja analitičkih metoda za njegovo određivanje u odnosu na lijekove iz drugih farmakoterapijskih skupina. Najčešće korištene analitičke tehnike za njegovu analizu u farmaceutskim dozirnim oblicima i biološkim tekućinama su tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) i tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (UPLC) spregnute s masenom spektrometrijom ili detekcijom u ultraljubičastom području (Tandel i sur., 2016; Younes i sur., 2016; Wu i sur., 2015; Choudhury i sur., 2014; Lukram i sur., 2013; Wang i sur., 2013). U literaturi su opisane tri elektrokemijske metode, no sve se temelje na redukciji lijeka na živinoj elektrodi, koja je toksična, ili na modificiranim elektrodama čija je priprema vrlo zahtjevna (Habib i sur., 2016; Jain i sur., 2016; Jain i Sinha, 2015).

Cilj ovog rada bio je ispitati mogućnost elektrooksidacija febuksostata na dijamantnoj elektrodi s primjesama bora te primjene voltametrijskih tehnika u ispitivanju elektroanalitičkih svojstava febuksostata. Zatim, optimizirati parametre voltametrijske metode, što uključuje odabir prikladne elektrode, vrste pufera i njegove pH vrijednosti, brzine promjene potencijala kod cikličke voltametrije, a frekvencije i amplitude pulsa kod pravokutno-valne voltametrije te ispitati selektivnost metode.

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

### 3.1 KEMIKALIJE

U izradi ovog rada korištene su sljedeće kemikalije:

- febuksostat, Ph.Eur. standard
- $\text{H}_3\text{PO}_4$  85% (Lach-Ner)
- $\text{CH}_3\text{COOH}$  (Panreac Quimica)
- $\text{H}_3\text{BO}_3$  (Sigma-Aldrich)
- $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (GRAM-MOL)
- NaOH (Sigma-Aldrich)
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Kemika)
- $\text{CH}_3\text{COONa}$  (Kemika)
- askorbinska kiselina (Sigma-Aldrich)
- glukoza, bezvodna (Kemika)
- laktoza, monohidrat (Fluka)
- limunska kiselina, monohidrat (T.T.T.)
- folna kiselina (97%, Sigma-Aldrich)
- mokraćna kiselina (99%, Sigma-Aldrich)
- dopamin (Sigma-Aldrich)
- ketoprofen (Sigma-Aldrich)
- diklofenak (ekstrakcija iz Voltaren forte 50 mg tablete, Pliva)
- ibuprofen (Fluka)
- Adenuric 120 mg filmom obložene tablete, Menarini International Operations Luxembourg S.A.
- ultračista voda

### 3.2 RADNI INSTRUMENTI

Elektroanalitička mjerenja, koja uključuju cikličku i pravokutno-valnu voltametriju, izvedena su na uređaju  $\mu$ Autolab potencio-stat/galvanostat (Eco Chemie) koji je spojen na računalo. Mjerenja se kontroliraju računalnim programom GPES 4.9. Elektrokemijski članak, spojen na potencijometar, sastoji se od tri elektrode: radne, referentne i protuelektrode. Kao referentna elektroda korištena je srebro/srebrov klorid (Ag/AgCl) elektroda, a kao protuelektroda platinska žica. Kao radne elektrode korištene su elektroda od staklastog ugljika (eng. glassy carbon), zlatna elektroda i dijamantna elektroda s primjesama bora (BDDE).

Tijekom pripreme pufera, pH vrijednost izmjerena je pomoću Mettler Toledo pH-metra s kombiniranom staklenom elektrodom. Prije samog mjerenja potrebno je kalibrirati pH-metar korištenjem dva standardna pufera, pH vrijednosti  $\text{pH}_1 = 4 \pm 0.01$  i  $\text{pH}_2 = 7 \pm 0.01$ .

Prilikom izrade ispitivanih otopina, za bolje otapanje, korištena je ultrazvučna kupelj Elma<sup>®</sup> S 30 H Elmasonic.

Sve kemijske supstancije vagane su na analitičkoj vagi Mettler Toledo AG245.

### 3.3. UVJETI MJERENJA

Ciklički voltamogrami snimljeni su na elektrodi od staklastog ugljika u rasponu potencijala od 0 V do +2 V te na dijamantnoj elektrodi sa primjesama bora u rasponu potencijala od 0 V do +1,7 V, uz variranje brzine promjene potencijala od 25 mV/s do 2000 mV/s u svrhu optimizacije parametara metode.

Pravokutno-valni voltamogrami snimljeni su na dijamantnoj elektrodi s primjesama bora u rasponu potencijala od 0.8 V do +1,6 V uz frekvenciju od 300 Hz, amplitudu pulsa 50 mV i porast potencijala 4 mV.

### 3.4 PRIPREMA OTOPINA

#### 3.4.1 Otopina febuksostata

##### 3.4.1.1. Matična otopina

Potrebno je pripremiti matičnu otopinu (eng. stock solution) koncentracije  $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ . To se izvrši vaganjem 3,163 mg febuksostata na analitičkoj vagi koji se zatim kvantitativno prenese u tikvicu volumena 10,0 mL. Tikvica se nadopuni 96% etanolom do oznake te se ostavi u ultrazvučnoj kupelji 10 minuta kako bi se poboljšalo otapanje febuksostata. Matična otopina čuva se u hladnjaku.

##### 3.4.1.2. Radne otopine

Za dobivanje radnih otopina koristi se određeni volumen matične otopine koji se razrijedi Britton-Robinson puferom (u daljnjem tekstu BR pufer) u tikvici volumena 20,0 mL do oznake (Tablica 2.). Kao optimalna pH vrijednost BR pufera za pripremu radnih otopina odabran je pH 5.

Volumen matične otopine	Volumen BR pufera	Koncentracija radne otopine
1,0 mL	19,0 mL	$5 \times 10^{-5} \text{ M}$
2,0 mL	18,0 mL	$1 \times 10^{-4} \text{ M}$

Tablica 2. Izrada radnih otopina odgovarajućih koncentracija

#### 3.4.2 Izrada Britton-Robinson pufera

Britton-Robinson pufer izrađuje se iz tri komponente: 0,5 M fosforne kiseline, 0,5 M acetatne 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 acetatna kiselina priredi se pipetiranjem 2,87 mL acetatne 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.

Dodavanjem 0,2 M natrijevog hidroksida podešava se pH vrijednost BR pufera.

### 3.4.3 Izrada otopina za ispitivanje interferencije

U izradi otopina za interferencije korištene su askorbinska kiselina, folna kiselina, dopamin, glukoza, laktoza, mokraćna kiselina, limunska kiselina, ketoprofen, ibuprofen i diklofenak.

- a) askorbinska kiselina, folna kiselina, dopamin, glukoza, laktoza, mokraćna kiselina i limunska kiselina

Masa odvage kvantitativno se prenese u tikvicu određenog volumena (tikvica 1) te se nadopuni ultračistom vodom do oznake. Zatim se od toga uzme 2,0 mL, prenese u tikvicu volumena 20,0 mL (tikvica 2), doda 200  $\mu$ L matične otopine febuksostata te se BR puferom nadopuni do oznake (Tablica 3.).

Interferencija	Masa odvage	Volumen tikvice 1	Koncentracija u tikvici 2
askorbinska kiselina	0,106 g	20,0 mL	$3 \times 10^{-3}$ M
glukoza	0,108 g	20,0 mL	$3 \times 10^{-3}$ M
laktoza	0,216 g	20,0 mL	$3 \times 10^{-3}$ M
limunska kiselina	0,126 g	20,0 mL	$3 \times 10^{-3}$ M
folna kiselina	0,022 g	20,0 mL	$2,5 \times 10^{-4}$ M
dopamin	0,009 g	5,0 mL	$9,49 \times 10^{-4}$ M
mokraćna kiselina	0,0084 g	5,0 mL	$1 \times 10^{-3}$ M

Tablica 3. Priprema otopina askorbinske kiseline, glukoze, laktoze, limunske kiseline, folne kiseline, dopamina i mokraćne kiseline za ispitivanje interferencija



b) ibuprofen, ketoprofen i diklofenak

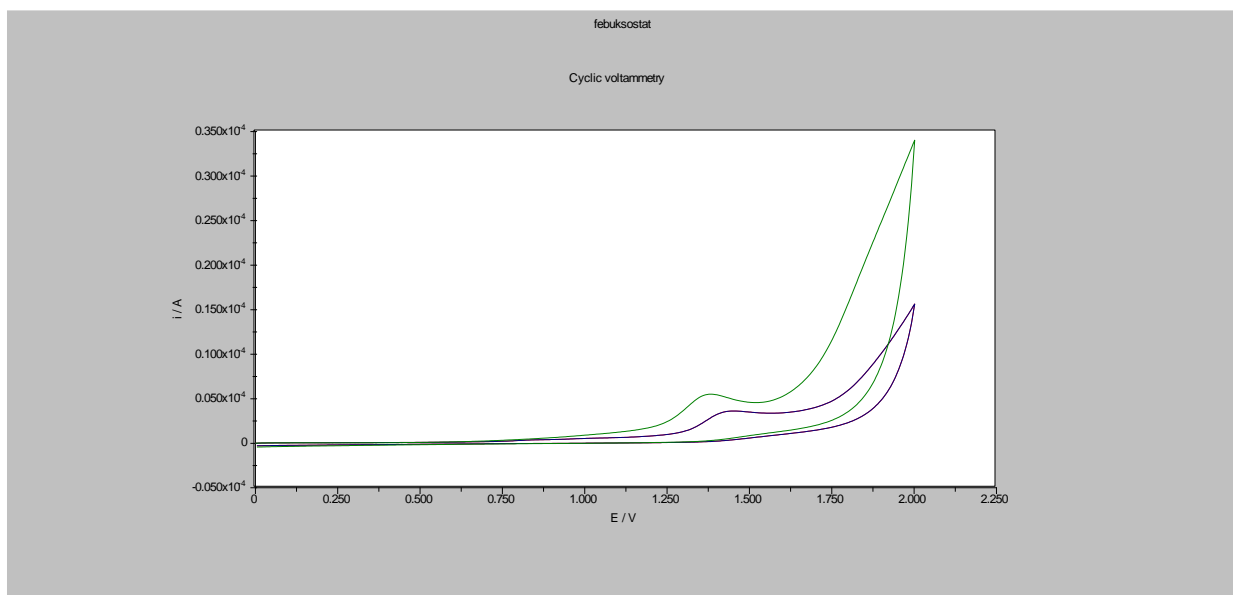
Masa odvage kvantitativno se prenese u tikvicu određenog volumena (tikvica 1) te se nadopuni otapalom do oznake. Zatim se od toga uzme 200,0  $\mu\text{L}$ , prenese u tikvicu volumena 20,0 mL (tikvica 2), doda 200,0  $\mu\text{L}$  matične otopine febuksostata te se BR puferom nadopuni do oznake (Tablica 4.).

Interferencija	Masa odvage	Volumen tikvice 1	Koncentracija u tikvici 2
ketoprofen	0,0013 g	5,0 mL	$1 \times 10^{-5}$ M
ibuprofen	0,0041 g	20,0 mL	$1 \times 10^{-5}$ M
diklofenak	0,0064 g	20,0 mL	$1 \times 10^{-5}$ M

Tablica 4. Priprema otopina ketoprofena, ibuprofena i diklofenaka za ispitivanje interferencija

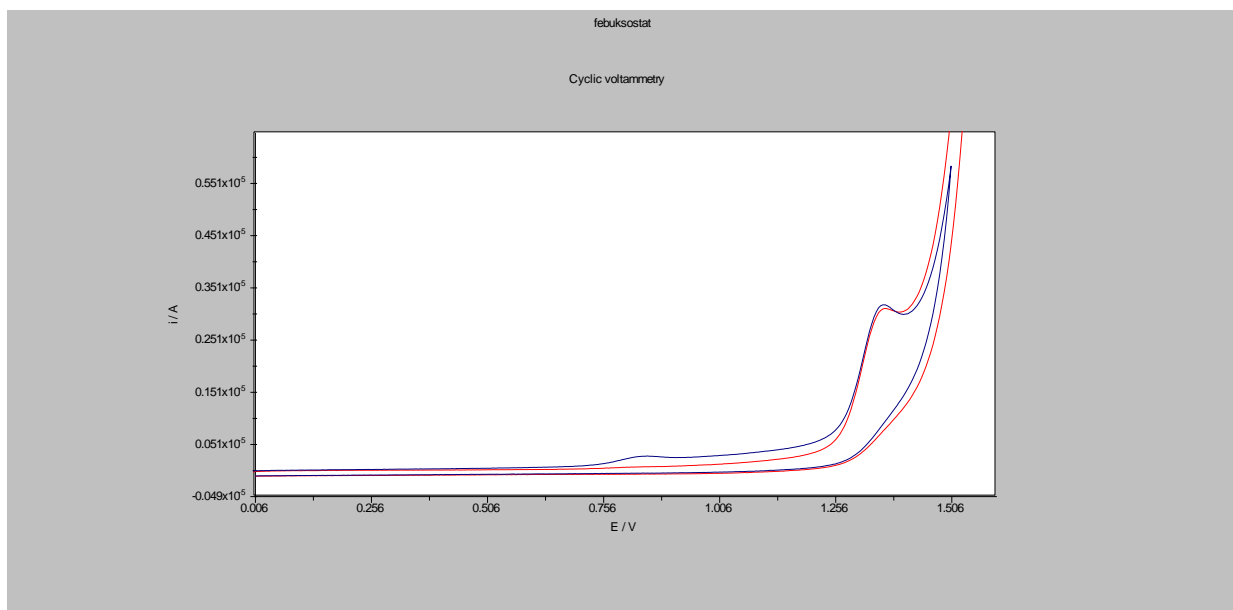
## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

Prvo mjerenje otopine febeksostata rađeno je na elektrodi od staklastog ugljika cikličkom voltametrijom. Matična otopina koncentracije  $1 \times 10^{-3}$  M razrijeđena je u Britton-Robinson puferu (u daljnjem tekstu BR pufer) pH vrijednosti 6 uz dodatak 10% etanola kako bi koncentracija febeksostata iznosila  $1 \times 10^{-4}$  M. Rađena su dva mjerenja u rasponu potencijala od 0 V do 2 V. Potencijal strujnog vrha oksidacije febeksostata iznosi je  $E_p=1.38$  V. U drugom mjerenju jasno se uočava (Slika 6.) smanjenje struje oksidacije lijeka i pomak potencijala oksidacije ka pozitivnijim vrijednostima ( $E_p=1.46$  V). Iz toga se može zaključiti kako se tijekom mjerenja lijek adsorbira na površinu elektrode što utječe na rezultate mjerenja. Zbog toga je potrebno nakon svakog mjerenja polirati površinu elektrode kako bi se dobili reproducibilni rezultati.



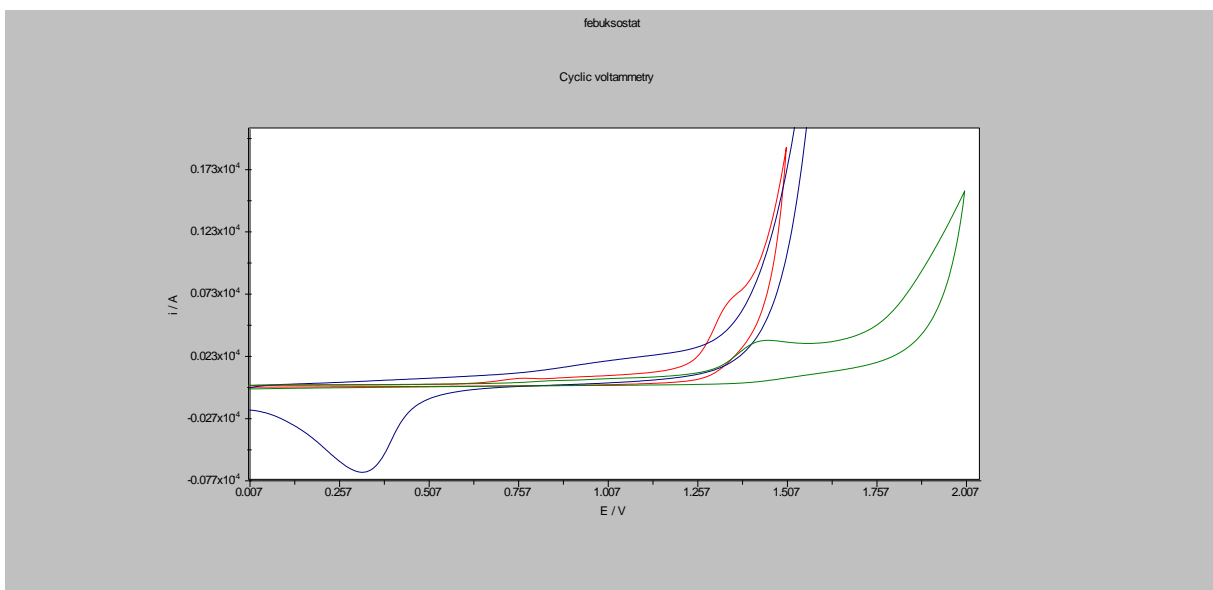
Slika 6. Ciklički voltamogram febeksostat ( $c=1 \times 10^{-4}$  M) zabilježen u BR puferu pH 6 + 10% etanola na elektrodi od staklastog ugljika: prvo mjerenje (zeleno) i drugo mjerenje (plavo)

Ciklički voltamogram snimljen je i na BDDE u rasponu potencijala od 0 do 1,6 V. U oba mjerenja uočava se strujni vrh (Slika 7) pri potencijalu 1,35 V. U drugom mjerenju pojavljuje se i drugi strujni vrh pri potencijalu 0,78 V. Iz toga bi se moglo zaključiti kako viši potencijal oksidacije (1,35 V) odgovara oksidaciji samog lijeka, a niži potencijal (0,78 V) dolazi od oksidacije produkta oksidacije febeksostata.



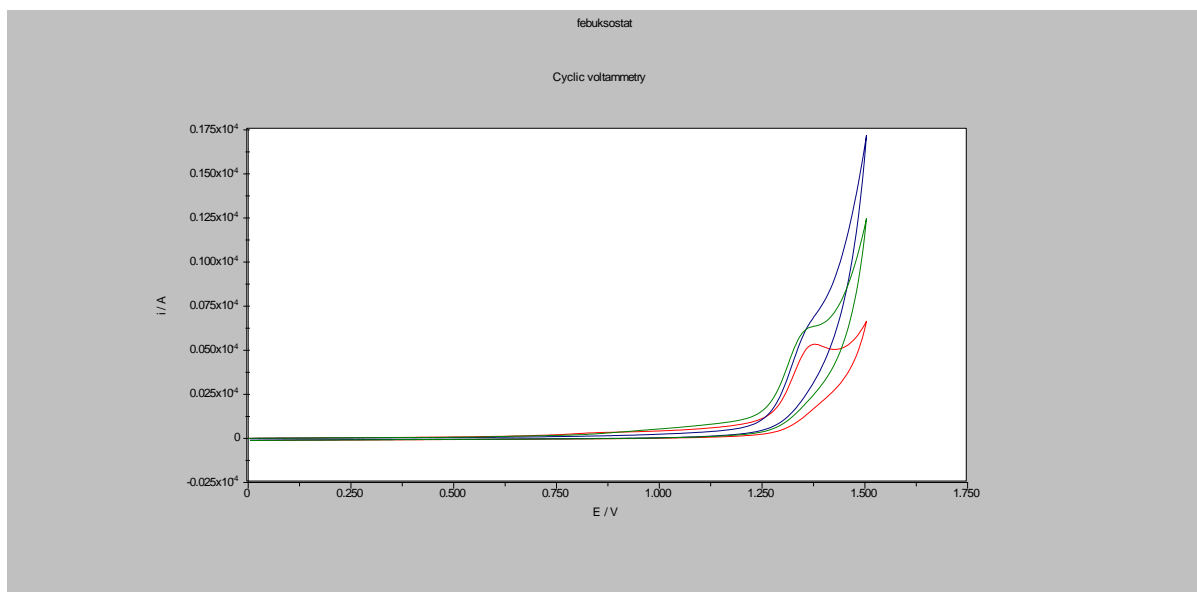
Slika 7. Ciklički voltamogram febeksostata ( $c=1 \times 10^{-4}$  M) zabilježen u BR puferu pH 6 + 10% etanola na BDD elektrodi uz strujne vrhove pri potencijalima  $E_p = + 0,78$  V i  $E_p = + 1,35$  V: prvo mjerenje (crveno) i drugo mjerenje (plavo)

Kako bi se odabrala najbolja elektroda za daljnja ispitivanja, cikličkom voltametrijom ispitan je potencijal oksidacije febeksostata na različitim elektrodama. Upotrebljene su GC elektroda, BDD elektroda i zlatna elektroda. Na slici 8. vide se rezultati ispitivanja. Na zlatnoj elektrodi oksidacija lijeka uopće se ne odvija, za razliku od GC i BDD elektrode. Između GC i BDD elektrode za daljnje ispitivanje odabrana je BDD elektroda jer je oksidacija febeksostata bolje mjeriva. Iz voltamograma se također može zaključiti kako je oksidacija febeksostata ireverzibilan proces jer u povratnom skenu, prema negativnijim vrijednostima potencijala, nema povratnog vrha redukcije.



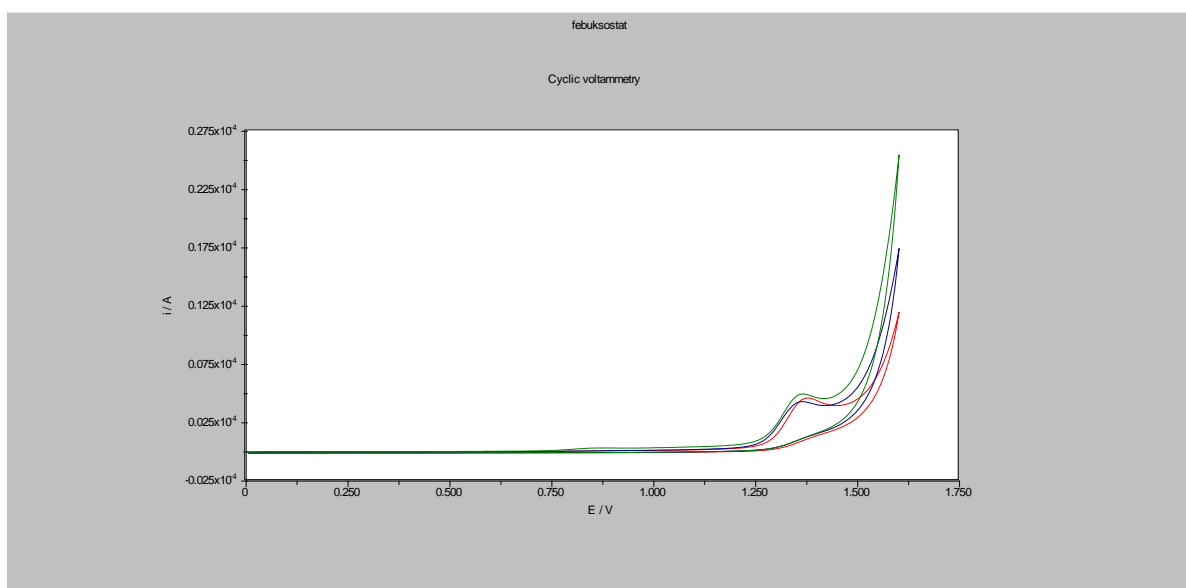
Slika 8. Ciklički voltamogram febuksostata ( $c=1 \times 10^{-4}$  M) zabilježen u BR puferu pH 6 + 10% etanola: mjerenje na BDD elektrodi (crveno), mjerenje na elektrodi od staklastog ugljika (zeleno) i mjerenje na zlatnoj elektrodi (plavo)

U svrhu optimizacije metode bilo je nužno odabrati prikladan pH pufera koji će se koristiti pri daljnjim ispitivanjima. Priređeni su BR puferi sljedećih pH vrijednosti: pH = 4.5, pH = 5, pH=6, pH = 7 i pH = 8. Budući da lužnatiji pH u procesu oksidacije vrh potencijala pomiče prema pozitivnijim vrijednostima, za mjerenja je pogodniji kiseli pH kako bi se izbjeglo preklapanje vrha oksidacije febuksostata sa vrhom oksidacije produkta oksidacije febuksostata. Osim toga struja vrha vala pokazuje više vrijednosti u kiselijim otopinama. Međutim, febuksostat se taloži već oko pH = 4 pa pH pufera koji će se koristiti ne smije biti ni prenizak kako ne bi došlo do taloženja lijeka iz otopina koje se ispituju. Pomoću voltamograma prikazanog na slici 9. odabran je pH pufera vrijednosti 5 zbog najbolje definiranog strujnog vrha i najniže struje osnovnog elektrolita.



Slika 9. Ciklički voltamogram febeksostata ( $c=1 \times 10^{-4}$  M) zabilježen u: BR puferu pH 5 (crveno), BR puferu pH 6 (zeleno) i BR puferu pH 7 (plavo)

Nužno je bilo ispitati potencijalnu prikladnost ostalih pufera, a ne samo BR pufera koji se koristio u prethodnim voltametrijskim mjerenjima. U tu svrhu ispitan je utjecaj dva pufera koja se vrlo često koriste, a to su acetatni i fosfatni pufer.

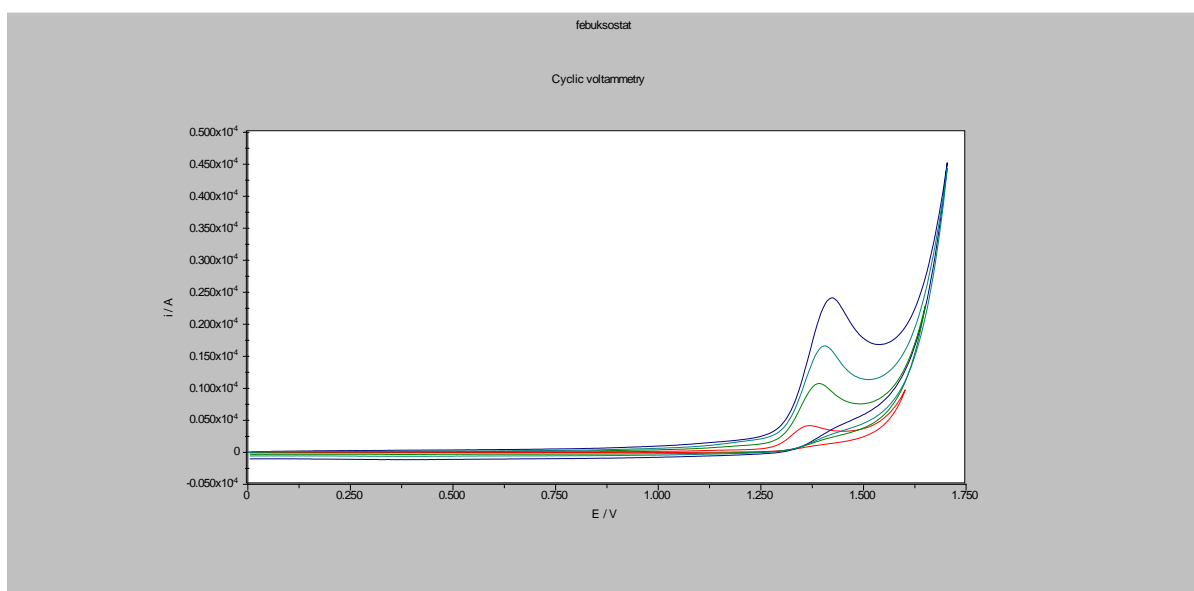


Slika 10. Ciklički voltamogram febeksostata ( $c=1 \times 10^{-4}$  M) zabilježen u: BR puferu pH 5 (crveno), fosfatnom puferu (plavo) i acetatnom puferu (zeleno)

Iz mjerenja (Slika 10.) uočava se kako se i u acetatnom i fosfatnom puferu oksidacija odvija i bilježi. Također, vrsta pufera ne utječe značajno na visinu strujnog vrha niti na potencijal

oksidacije. Međutim, u BR puferu je izmjerena najniža struja osnovnog elektrolita. Posljedično, BR pufer odabran je kao pufer za nastavak mjerenja.

Kao sljedeći korak u optimizaciji metode ispitana je prikladna brzina promjene potencijala na struju vrha vala te su rađena mjerenja pri različitim brzinama promjene potencijala od 100 mV/s pa sve do 2000 mV/s, a u rasponu potencijala od 0 V do 1,70 V (Slika 11). Porastom brzine promjene potencijala raste i struje, a potencijal strujnog vrha pomiče se prema pozitivnijim vrijednostima što je u skladu s ireverzibilnim procesima oksidacije. Struja vrha vala pokazuje linearnu ovisnost o drugom korijenu brzine promjene potencijala što ukazuje da se radi o difuzijski kontroliranom redoks procesu u kojem se febuksostat oksidira.



Slika 11. Ciklički voltamogram febuksostata ( $c=1 \times 10^{-4}$  M) zabilježen u BR puferu pH 5 + 10% etanola na BDD elektrodi uz variranje brzine promjene potencijala: mjerenje pri 100 mV/S (crveno), mjerenje pri 500 mV/S (zeleno), mjerenje pri 1000 mV/S (tirkizno) i mjerenje pri 2000 mV/s (plavo)

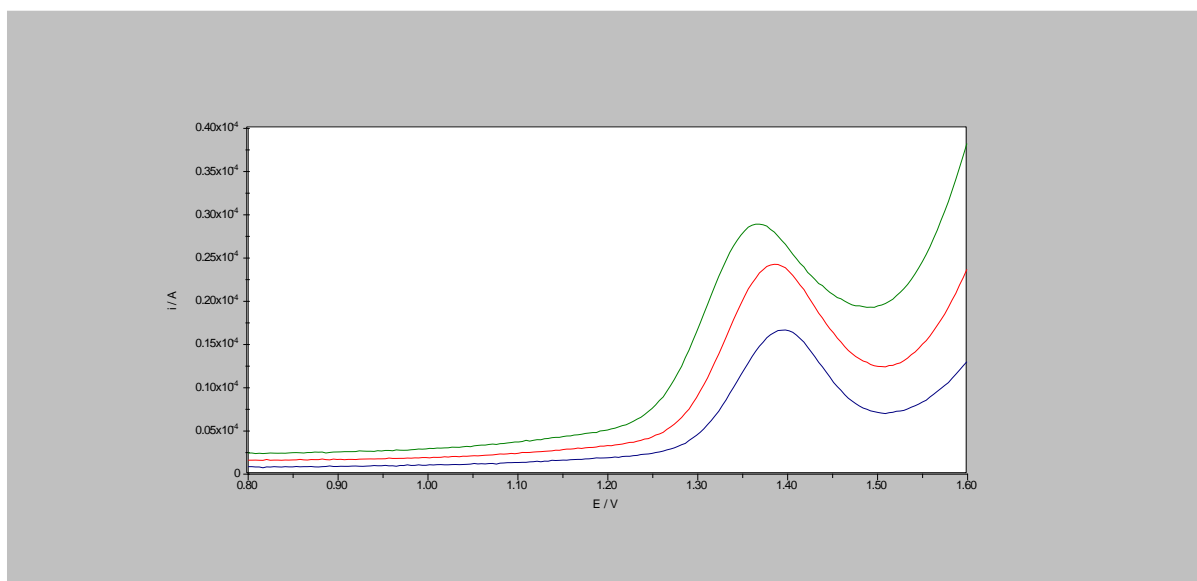
Prilikom optimizacije frekvencije u pravokutnovalnoj voltametrij, ona je mijenjana u rasponu od 20 Hz do 500 Hz. Odabrana je frekvencija od 300 Hz za sva daljnja ispitivanja budući da se upravo pri toj frekvenciji dobila najviša struja vrha uz najbolji oblik pika.

Sljedeći parametar koji je valjalo optimizirati jest amplituda pulsa. Izvršena su mjerenja na BDD elektrodi pravokutnovalnom voltametrijom s primjenom pulsa različite amplitude te su dobiveni sljedeći rezultati (Tablica 5.):

Amplituda pulsa	Struja	Voltamogram
25 mV	11.8 $\mu\text{A}$	plavo
50 mV	15.8 $\mu\text{A}$	crveno
75 mV	16.4 $\mu\text{A}$	zeleno

Tablica 5. Utjecaj promjene amplitude pulsa pravokutnovalne voltametrije na jakost struje.

Unatoč većoj jakosti struje dobivenoj s amplitudom pulsa od 75 mV, optimalnom se pokazala amplituda od 50 mV (Slika 12.) jer je bolje definiran voltametrijski odgovor i niža je pozadinska struja osnovnog elektrolita (Slika 13.).

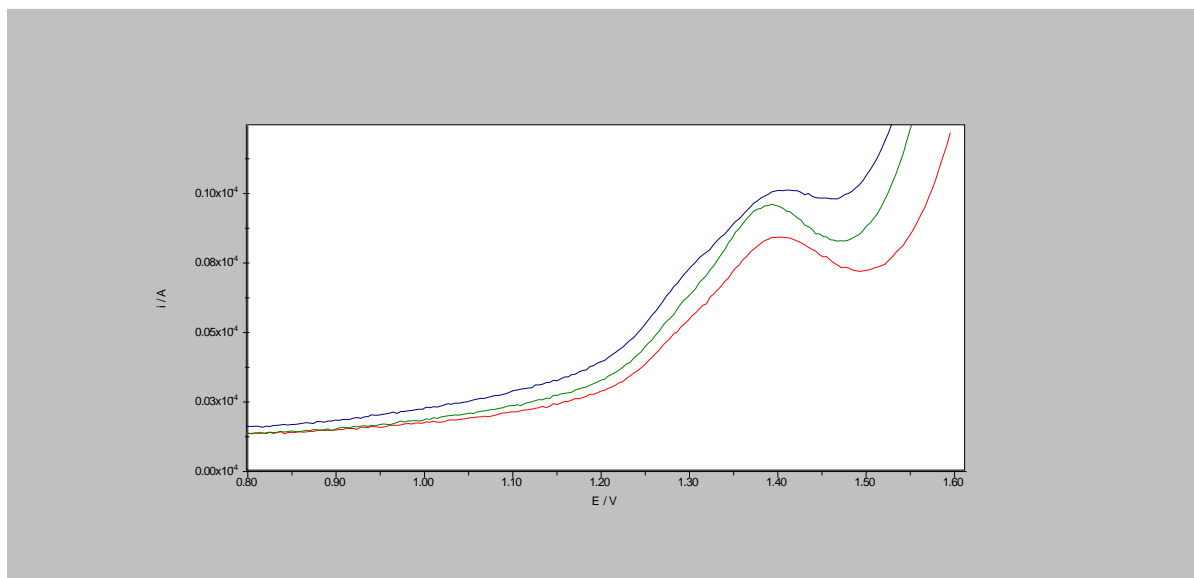


Slika 12. Pravokutnovalni voltamogram febuksostata ( $c=1 \times 10^{-4}$  M) zabilježen u BR puferu pH 5 + 10% etanola na BDD elektrodi uz frekvenciju od 300 Hz i  $\Delta E_p = 4$  mV: mjerenje pri amplitudi pulsa od 25 mV (plavo), 50 mV (crveno) i 75 mV (zeleno)

Zbog slabe topljivosti febuksostata u vodi ispitan je utjecaj udjela etanola u puferu na voltametrijski odgovor lijeka. Mjerenje je izvršeno pravokutnovalnom voltametrijom na BDD elektrodi otopine febuksostata u samom puferu te u seriji otopina u puferu sa porastom udjela etanola. Uočeno je da povećanjem udjela etanola u osnovnom elektrolitu zapravo dolazi do slabije definiranog voltametrijskog odgovora (Slika 13.). Iz toga se dolazi do zaključka da nije

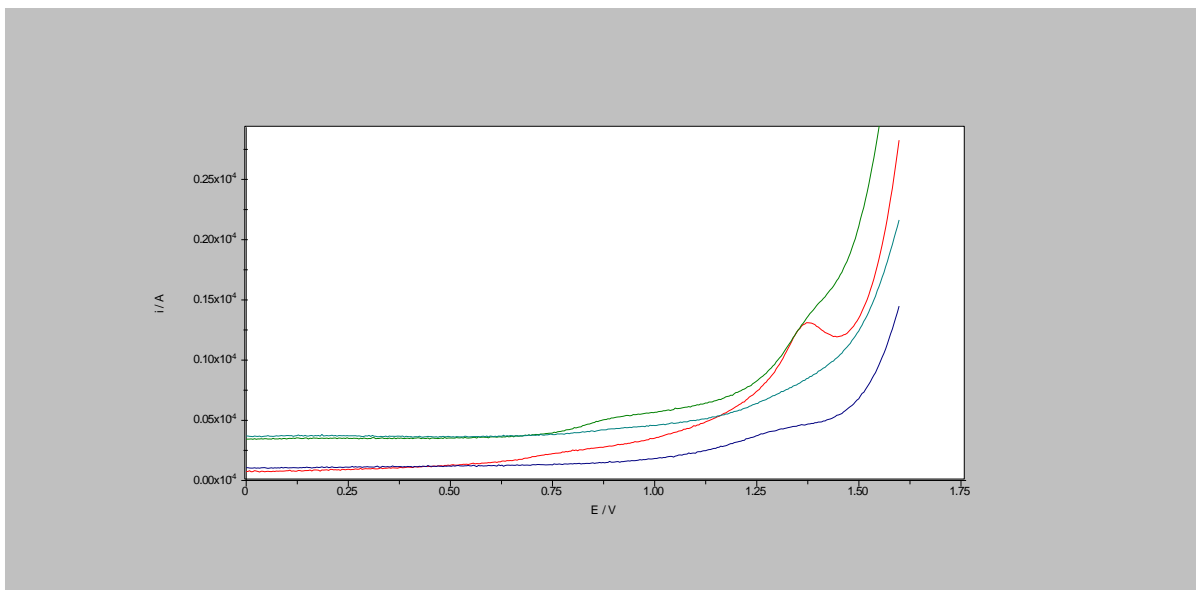


potrebno dodavati etanol u osnovni elektrolit i da je topljivost febuksostata postignuta u otopini pufera pri korištenim niskim koncentracijama u voltametrijskim mjerenjima.



Slika 13. Pravokutnovalni voltamogram febuksostata ( $c=1 \times 10^{-5}$  M) zabilježen na BDD elektrodi pri frekvenciji od 300 Hz: mjerenje u BR puferu pH 5 (crveno), u BR puferu pH 5 uz dodatak 5% etanola (zeleno) i u BR puferu pH 5 uz dodatak 10% etanola (plavo)

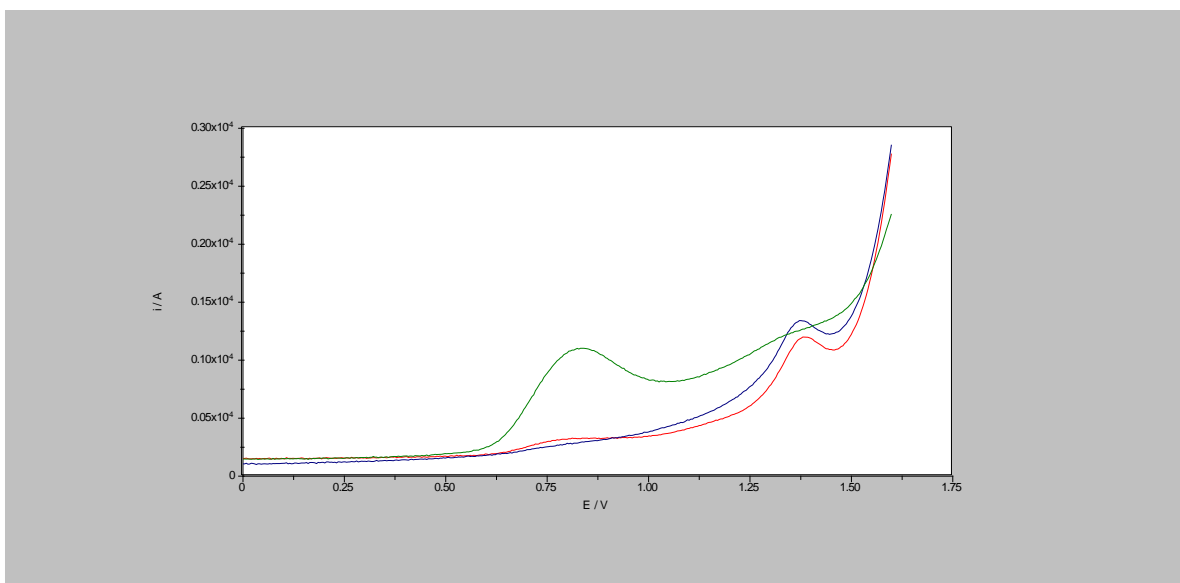
Važan parametar u ispitivanju metode je i vrijeme korištenja BDD elektrode odnosno koliko puta je elektroda upotrebljena. Naime, nakon određenog niza snimanja voltamograma lijeka, unatoč mehaničkom čišćenju elektrode nakon svakog mjerenja, ipak je značajno slabije definiran voltametrijski odgovor na duže korištenoj elektrodi u odnosu na voltametrijski odgovor na novoj elektrodi (Slika 14.).



Slika 14. Pravokutnovalni voltamogram febuksostata ( $c=1 \times 10^{-5}$  M) zabilježen u BR puferu pH 5 na novoj BDD elektrodi (crveno) i na duže korištenoj BDD elektrodi (zeleno) te samog osnovnog elektrolita (plavo - nova elektroda i tirkizno - duže korištena elektroda)

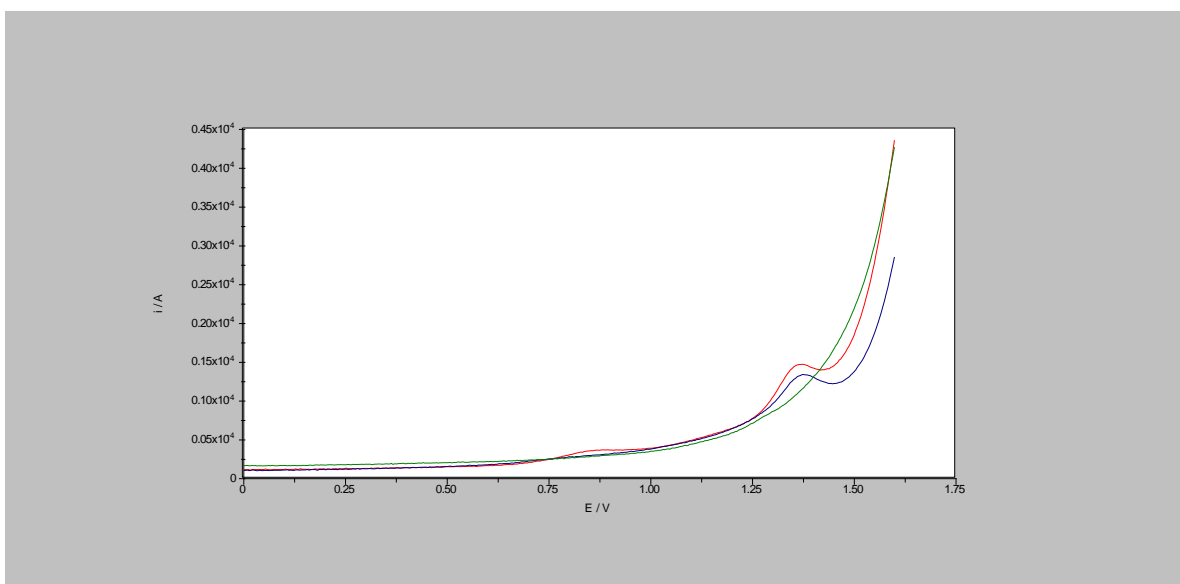
Također, provedeno je ispitivanje selektivnosti voltametrijske metode za određivanje febuksostata na BDD elektrodi. Obzirom da bolesnici s hiperuricemijom u terapiji uzimaju i nesteroidne protuupalne lijekove, bilo je važno ispitati i njihovu potencijalnu interferenciju s analizom febuksostata. Na isti način kako je pripremljena otopina febuksostata, priređene su i otopine ibuprofena, diklofenaka i ketoprofena, odnosno u BR puferu pH vrijednosti 5, u koncentraciji od  $1 \times 10^{-5}$  M. Snimljeni su voltamogrami samih otopina nesteroidnih protuupalnih lijekova kako bi se definirala njihova mogućnost oksidacije pri uvjetima oksidacije febuksostata te na kojim vrijednostima potencijala se to događa. Zatim su snimljeni voltamogrami priređenih otopina u omjeru koncentracija febuksostata i nesteroidnog protuupalnog lijeka 1:1.

Uočeno je da se diklofenak oksidira, međutim na različitom potencijalu od febuksostata (Slika 15.). Diklofenak će se oksidirati pri nižem potencijalu od febuksostata, već pri  $E_p = 0.828$  V dok će se febuksostat oksidirati pri potencijalu  $E_p = 1.382$  V. Zato nema interferencije diklofenaka na voltametrijski odgovor febuksostata.



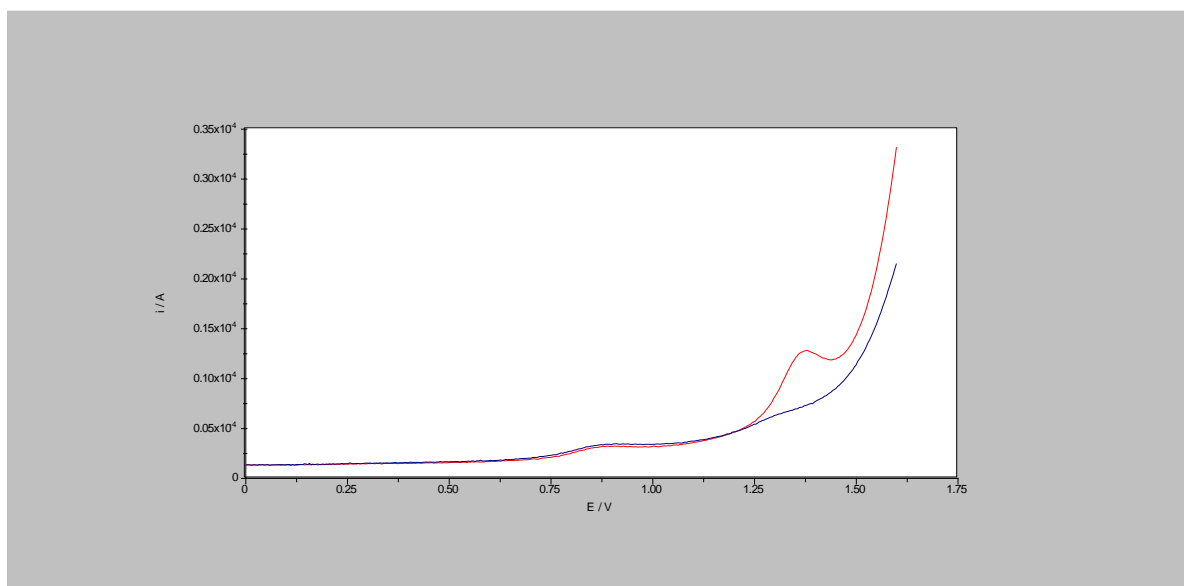
Slika 15. Pravokutnovalni voltamogram zabilježen u BR puferu pH 5 na BDD elektrodi:  
 febuksostat ( $c=1 \times 10^{-4}$  M, plavo), diklofenak ( $c=1 \times 10^{-4}$  M, zeleno), otopina  
 febuksostat:diklofenak 1:1 ( $c=1 \times 10^{-5}$  M, crveno)

Za razliku od diklofenaka, uočeno je da se ibuprofen uopće ne oksidira na BDD elektrodi pri korištenim uvjetima (Slika 16.) te zato nema interferencije na voltametrijski odgovor febuksostata.



Slika 16. Pravokutnovalni voltamogram zabilježen u BR puferu pH 5 na BDD elektrodi:  
 febuksostat ( $c=1 \times 10^{-4}$  M, plavo), ibuprofen ( $c=1 \times 10^{-4}$  M, zeleno), otopina  
 febuksostat:ibuprofen 1:1 ( $c=1 \times 10^{-5}$  M, crveno)

Isto kao ibuprofen, ni ketoprofen se ne oksidira pri danim uvjetima na BDD elektrodi (Slika 17.). Zato ni on ne pokazuje interferenciju sa voltametrijskim odgovorom febeksostata.



Slika 17. Pravokutnovalni voltamogram zabilježen u BR puferu pH 5 na BDD elektrodi: ketoprofen ( $c=1 \times 10^{-4}$  M, plavo), otopina febeksostat:ketoprofen 1:1 ( $c=1 \times 10^{-5}$  M, crveno)

Pored ispitivanja prethodno navedenih lijekova kao potencijalnih interferencija, ispitan je i utjecaj supstancija navedenih u Tablici 6:

Supstancija	Omjer koncentracije otopine febeksostata i ispitivane supstancije	Koncentracija
askorbinska kiselina	1:300	$3 \times 10^{-3}$ M
glukoza	1:300	$3 \times 10^{-3}$ M
laktoza	1:300	$3 \times 10^{-3}$ M
limunska kiselina	1:300	$3 \times 10^{-3}$ M
folna kiselina	1:25	$2,5 \times 10^{-4}$ M
dopamin	1:95	$9,49 \times 10^{-4}$ M
mokraćna kiselina	1:100	$1 \times 10^{-3}$ M

Tablica 6. Supstancije korištene za ispitivanje interferencija i njihove koncentracije

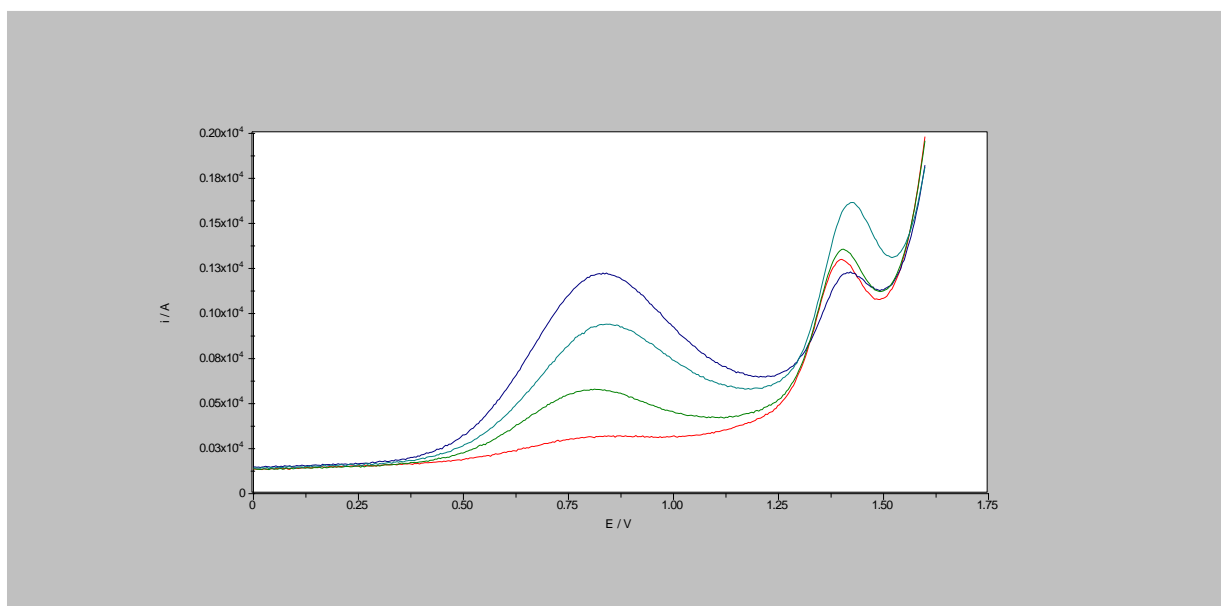
Prvo mjerenje izvršeno je s otopinom askorbinske kiseline (omjer 1:300) te je uočeno da ona interferira s voltametrijskim odgovorom febeksostata. Naime, askorbinska kiselina oksidira se

na  $E_p = 0.808$  V. U tu svrhu napravljen je koncentracijski niz otopina askorbinske kiseline kako bi se utvrdila granična koncentracija pri kojoj ona ne interferira s voltametrijskim određivanjem febuksostata (Tablica 7.).

Omjer febuksostata i askorbinske kiseline	Interferencija prisutna
1:30	Da
1:20	Ne
1:10	Ne
1:3	Ne

Tablica 7. Koncentracijski niz otopina askorbinske kiseline i interferencija s voltametrijskim određivanjem febuksostata

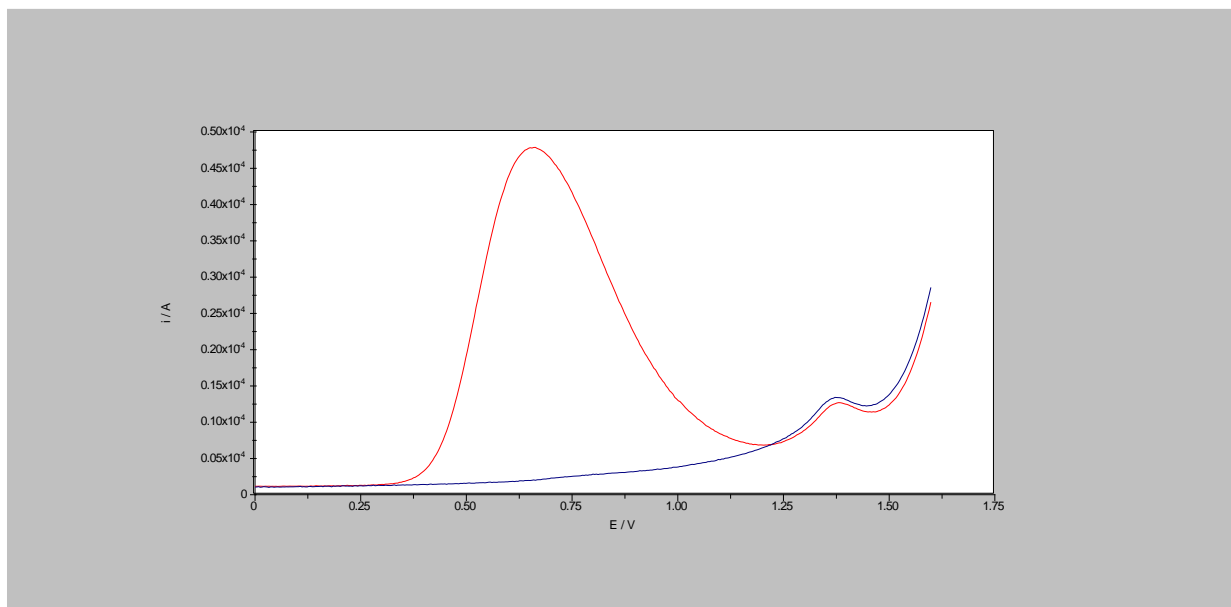
Iz voltamograma prikazanog na Slici 18. može se uočiti da askorbinska kiselina pokazuje interferenciju s voltametrijskim odgovorom febuksostata iznad omjera 1:20.



Slika 18. Pravokutnovalni voltamogram zabilježen u BR puferu pH 5 na BDD elektrodi: otopina febuksostat ( $c=1 \times 10^{-5}$  M) : askorbinska kiselina u omjeru 1:3 (crveno), 1:10 (zeleno), 1:20 (tirkizno) i 1:30 (plavo)

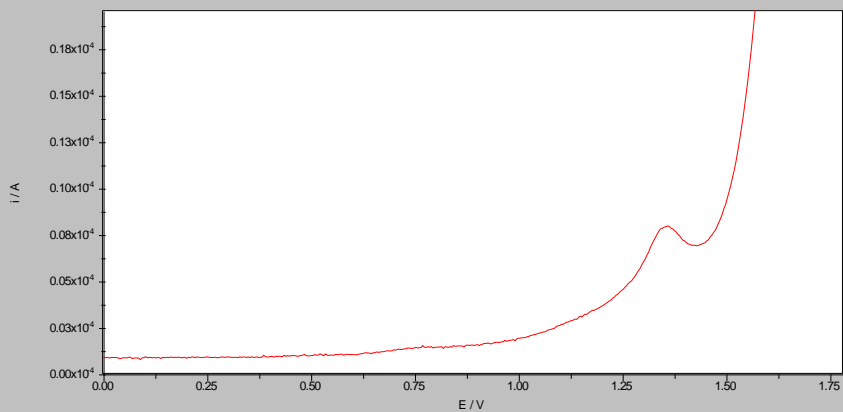
Od ostalih ispitivanih supstancija uočeno je da glukoza, laktoza, limunska kiselina, dopamin i mokraćna kiselina ne interferiraju s voltametrijskim određivanjem febuksostata.

Primjerice, mokraćna kiselina se oksidira, ali pri  $E_p = 0.652$  V. Budući da se febeksostat oksidira pri  $E_p = 1.382$  V mokraćna kiselina ne interferira (u omjeru 1:100) s voltametrijskim odgovorom febeksostata (Slika 19.).



Slika 19. Pravokutnovalni voltamogram zabilježen u BR puferu pH 5 na BDD elektrodi: febeksostat ( $c=1 \times 10^{-5}$  M, plavo), otopina febeksostat ( $c=1 \times 10^{-5}$  M) : mokraćna kiselina 1:100 (crveno)

Za ispitivanje selektivnosti bilo je potrebno još ispitati i utjecaj pomoćnih tvari iz gotovog oblika lijeka, filmom obloženih tableta. Priređena je otopina ispitivane filmom obložene tablete u koncentraciji  $1 \times 10^{-5}$  M u BR puferu pH vrijednosti 5. Međutim, iz voltamograma prikazanog na Slici 20. jasno se vidi kako nema nikakvih interferencija pomoćnih tvari iz navedenog dozirnog oblika febeksostata.



Slika 20. Pravokutnovalni voltamogram otopine tableta febuksostata Adenuric 120 mg, Berlin-Chemie, ( $c=1 \times 10^{-5}$  M, pufer BR pH 5)

## 5. ZAKLJUČAK

Voltametrijske tehnike pokazale su se vrlo učinkovite u istraživanju elektroanalitičkih svojstava febeksostata. BDD elektroda pokazala je bolje značajke u odnosu na GC i zlatnu elektrodu u istraživanju oksidacije febeksostata i definiranju njegovog voltametrijskog odgovora. Ipak, zbog adsorpcije lijeka na BDD elektrodu, potrebno je između mjerenja polirati površinu elektrode kako bi se osigurala reproducibilnost rezultata.

Kao prikladan osnovni elektrolit u ispitivanju oksidacije febeksostata pokazao se Britton-Robinson pufer pH vrijednosti 5, bez dodatka etanola. Struja vrha vala u cikličkoj voltametriji pokazuje linearnu ovisnost o drugom korijenu brzine promjene potencijala u rasponu od 25 do 2000 mV/s što ukazuje da se radi o difuzijski kontroliranom redoks procesu u kojem se febeksostat oksidira. U pravokutnovalnoj voltametriji optimalna vrijednost frekvencije iznosila je 300 Hz, a amplituda pulsa 50 mV.

S redoks potencijalom febeksostata ne interferiraju nesteroidni protuupalni lijekovi, ipuprofen, ketoprofen i diklofenak, koji se često koriste u terapiji bolesnika sa gihtom. Također, nisu zabilježene niti interferencije s analitima kao što su dopamin, glukoza i mokraćna kiselina, a koji su u ovom ispitivanju bili u koncentracijama iznad onih uobičajenih u ljudskom organizmu. To ukazuje na mogućnosti razvoja selektivne voltametrijske metode za analizu febeksostata na BDD elektrodi te ostavlja prostor za istraživanje potencijalne primjene ove tehnike u analizi seruma ili urina tih bolesnika. Dobra selektivnost pokazana je i analizom dozirnog oblika febeksostata jer nisu zamijećene interferencije pomoćnih tvari.



## 6. LITERATURA

- Adenuric: EPAR – Sažetak za javnost, 2015, [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu), pristupljeno: 15.12.2016
- Adenuric: Sažetak opisa svojstava lijeka, [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu), pristupljeno 15.12.2016
- Boonsong K, Chuanuwatanakul S, Wangfuengkanagul N, Chailapakul O. Electroanalysis of lincomycin using boron-doped diamond thin film electrode applied to flow injection system. *Sens Actuators B Chem*, 2005,108, 627–632.
- Brooks MA, Tsai EW. *Electrochemistry in Pharmaceutical Analysis*. U: *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*. Kissinger PT, Heinemann WR, urednici, New York-Basel, Marcel Dekker Inc, 1996, str. 769-812.
- Choudhury H, Gorain B, Das A, Ghosh B, Pal T. Development and Validation of a Sensitive HPLC-MS/MS-ESI Method for Determination of Febuxostat: Application to Pharmacokinetic Study. *Curr Anal Chem*, 2014, 10, 528-536.
- Chuanuwatanakul S, Chailapakul O, Motomizu S. Electrochemical analysis of chloramphenicol using boron-doped diamond electrode applied to a flow-injection system. *Anal Sci*, 2008, 24, 493–498.
- Dogan B, Tuncel S, Uslu B, Ozkan SA. Selective electrochemical behavior of highly conductive boron-doped diamond electrodes for fluvastatin sodium oxidation. *Diam Relat Mater*, 2007, 16, 1695–1704.
- European Pharmacopoeia 8th ed. Strasbourg, Council of Europe, 2014.
- Fizikalno-kemijska svojstva: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB04854>, pristupljeno: 20.04.2017.
- Fizikalno-kemijska svojstva: [www.rxlist.com/uloric-drug.htm](http://www.rxlist.com/uloric-drug.htm), pristupljeno: 20.04.2017.
- Furst DE, Ulrich RW, Prakash S. *Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs, Disease-Modifying Antirheumatic Drugs, Nonopioid Analgesics, & Drugs Used in Gout*. U: *Basic & Clinical Pharmacology*. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ, urednici, New York, Mc Graw-Hill, 2012, str. 651-653.
- Granger MC, Xu JS, Strojek JW, Swain GM. Polycrystalline diamond electrodes: Basic properties and applications as amperometric detectors in flow injection analysis and liquid chromatography. *Anal Chim Acta*, 1999, 397, 145–161.

Hrvatski zavod za zdravstveno osiguranje, dopunska lista lijekova, [www.hzzo.hr](http://www.hzzo.hr), pristupljeno: 1.4.2017.

Habib IHI, Rizk MS, Abou El-Alaminb MM, Imam GS. Cathodic Stripping Voltammetric Determination of Febuxostat in Pharmaceutical Dosage Form and Plasma Samples, *Port Electrochim Acta*, 2016, 34, 343-353.

Jain R, Sinha A, Dhanjai, Karolia P, Khan AL. Zinc Oxide Nanoflowers Based Graphene Nanocomposite Platform for Catalytic Studies of Febuxostat. *Int J Electrochem Sci*, 2016, 11, 10223-10237.

Jain R, Sinha A. Multi-walled carbon nanotubes-aluminium titanate nanocomposite sensor for electrocatalytic quantification of non-purine xanthine oxidase inhibitor febuxostat. *Sci Lett J*, 2015, 4, 151-155.

Kounaves SP. Voltammetric Techniques. U: Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry. Settle FA, urednik, Upper Saddle River, Prentice Hall PTR, 1997.

Lukram O, Parmar S, Hande A. Determination of febuxostat in human plasma using ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Drug Test Anal*, 2013, 5, 492-499.

Nigović B, Behetić S. Elektroanalitika u farmaciji. *Farm Glas*, 2007, 3, 63.

Nigović B, Komorsky-Lovrić Š, Šimunić B. *Electroanal*, 2005, 17, 81–89.

Oliveira RTS, Salazar-Banda GR, Ferreira VS, Oliveira SC, Avaca LA. Electroanalytical determination of lidocaine in pharmaceutical preparations using boron-doped diamond electrodes. *Electroanal*, 2007, 19, 1189–1194.

Pecková K, Musilová J, Barek J. Boron-Doped Diamond Film Electrodes - New Tool for Voltammetric Determination of Organic Substances. *Crit Rev Anal Chem*, 2009, 39, 148 – 172.

Siangproh W, Ngamukot P, Chailapakul O. Electrochemical determination of captopril at boron-doped diamond thin film electrode applied to a flow injection system. *Sens Actuators B Chem*, 2003, 91, 60-66.

Singh JA, Akhras KS, Shiozawa A. Comparative effectiveness of urate lowering with febuxostat versus allopurinol in gout: analyses from large U.S. managed care cohort. *Arthritis Res Ther*, 2015, 17, 120.

Struktura febuksostata: [http://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bget?drug:D01206](http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?drug:D01206), pristupljeno: 20.04.2017.

Suryanarayan V, Zhang Y, Yoshihara S, Shirakashi T. Voltammetric assay of naproxen in pharmaceutical formulations using boron-doped diamond electrode. *Electroanal*, 2005, 17, 925–932.

Tandel D, Shah P, Patel K, Thakkar V, Patel K, Gandhi, T. Salting-Out Assisted Liquid-Liquid Extraction for Quantification of Febuxostat in Plasma Using RP-HPLC and Its Pharmacokinetic Application. *J Chromatogr Sci*, 2016, 54, 1827-1833.

Treetepvijit S, Chuanuwatanakul S, Einaga Y, Sato R, Chailapakul O. Electroanalysis of tetracycline using nickelimplanted boron-doped diamond thin film electrode applied to flow injection system. *Anal Sci*, 2005, 21, 531–535.

Uređaj 797 VA Computrace, <http://www.metrohm.com/>, pristupljeno 20.1.2017.

Uslu B, Ozkian SA. Solid Electrodes in Electroanalytical Chemistry: Present Applications and Prospects for High Throughput Screening of Drug Compounds. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2007, 10, 495-513.

Wang J. Analytical Electrochemistry. New-York, Wiley-VCH, 2000.

Wang HD, Deng P, Chen XY, Guo LX, Zhong DF. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of febuxostat in human plasma. *Biomed Chrom*, 2013, 27, 34-38.

Wangfuengkanagul N, Chailapakul O. Electrochemical analysis of acetaminophen using a boron-doped diamond thin film electrode applied to flow injection system. *J Pharm Biomed Anal*, 2002, 28, 841-847.

Wu YL, Mao ZS, Liu YP, Wang X, Di X. Simultaneous determination of febuxostat and its three active metabolites in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application to a pharmacokinetic study in Chinese healthy volunteers. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 114, 216-221.

Younes KM, El-Kady EF, Elzanfaly ES. Determination of Febuxostat in Human Plasma Using RP-LC-UV Method. *J Chromatogr Sci*, 2016, 54, 1022-1027.

## **7. SAŽETAK/SUMMARY**

## 7.1 SAŽETAK

Febuksostat je snažan, nepurinški, selektivni inhibitor ksantin oksidaze koji se koristi u liječenju hiperuricemije te u pacijenata koji se liječe od leukemije, a u kojih postoji rizik od sindroma lize tumora.

U ovom radu istraživala se mogućnost primjene voltametrije u njegovoj analizi na dijamantnoj elektrodi s primjesama bora te optimizacija parametara cikličke i pravokutnovalne voltametrijske metode.

Febuksostat se ireverzibilno oksidira pri potencijalu od +1,35 V. Od ispitanih elektroda najboljom se pokazala BDD elektroda kojoj treba nakon svakog mjerenja polirati površinu kako bi se osigurala reproducibilnost rezultata. Prikladan osnovni elektrolit je Britton-Robinsonov pufer pH vrijednosti 5. Struja vrha vala u cikličkoj voltametriji pokazuje linearnu ovisnost o drugom korijenu brzine promjene potencijala u rasponu od 25 do 2000 mV/s što ukazuje da se radi o difuzijski kontroliranom redoks procesu. U pravokutnovalnoj voltametriji optimalna vrijednost frekvencije iznosila je 300 Hz uz amplitudu pulsa 50 mV.

Nesteroidni protuupalni lijekovi, koji se često koriste kao terapija za smanjenje boli u ovih bolesnika, ne interferiraju s voltametrijskim ispitivanjem febuksostata. Isto je pokazano i s nekim drugim analitima koji se mogu naći u njihovom serumu odnosno urinu bolesnika, a što su primjerice mokraćna kiselina, glukoza i dopamin. Dobra selektivnost pokazana je i analizom dozirnog oblika febuksostata jer nisu zamijećene interferencije pomoćnih tvari.

## 7.2 SUMMARY

Febuxostat is a strong, non-purine, selective inhibitor of xanthin oxidase which is used in treatment of hyperuricemia and in patients who are receiving treatment for leukemia and are at risk of developing tumor lysis syndrome.

This research investigated possible application of voltammetric techniques in its analysis on boron-doped diamond electrode as well as optimization of parameters of cyclic and square-wave voltammetry.

Febuxostat oxidizes irreversibly at potential of +1,35 V. From all electrodes that were examined, the best proved to be BDD electrode whichs surface needs to be polished after each measurement to ensure the reproducibility of obtained results. The appropriate basic electrolyte is Britton-Robins buffer with pH value of 5. The wave peak current in cyclic voltammetry shows linear dependence to square root of potential change speed within range from 25 to 2000 mV/s, which suggests that redox-process is diffusion-controlled. In square-wave voltammetry the convenient frequency is 300 Hz with pulse amplitude of 50 mV.

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, which are often used as pain-reducing agents in these patients, do not interfere with voltammetric analysis of febuxostat. The same is demonstrated with some other analytes which can be found in their serum or urine, such as uric acid, glucose and dopamine. Good selectivity is proven with analysis of finished-dosage form of febuxostat since no interference of excipients was observed.

## 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 nove elektroanalitičke metode za određivanje febuksostata

Ivona Milanović

#### SAŽETAK

Febuksostat je snažan, nepurinski, selektivni inhibitor ksantin oksidaze koji se koristi u liječenju hiperuricemije te u pacijenata koji se liječe od leukemije, a u kojih postoji rizik od sindroma lize tumora.

U ovom radu istraživala se mogućnost primjene voltametrije u njegovoj analizi na dijamantnoj elektrodi s primjesama bora te optimizacija parametara cikličke i pravokutnovalne voltametrijske metode.

Febuksostat se ireverzibilno oksidira pri potencijalu od +1,35 V. Od ispitanih elektroda najboljom se pokazala BDD elektroda kojoj treba nakon svakog mjerenja polirati površinu kako bi se osigurala reproducibilnost rezultata. Prikladan osnovni elektrolit je Britton-Robinsonov pufer pH vrijednosti 5. Struja vrha vala u cikličkoj voltametriji pokazuje linearnu ovisnost o drugom korijenu brzine promjene potencijala u rasponu od 25 do 2000 mV/s što ukazuje da se radi o difuzijski kontroliranom redoks procesu. U pravokutnovalnoj voltametriji optimalna vrijednost frekvencije iznosila je 300 Hz uz amplitudu pulsa 50 mV.

Nesteroidni protuupalni lijekovi, koji se često koriste kao terapija za smanjenje boli u ovih bolesnika, ne interferiraju s voltametrijskim ispitivanjem febuksostata. Isto je pokazano i s nekim drugim analitima koji se mogu naći u njihovom serumu odnosno urinu bolesnika, a što su primjerice mokraćna kiselina, glukoza i dopamin. Dobra selektivnost pokazana je i analizom dozirnog oblika febuksostata jer nisu zamijećene interferencije pomoćnih tvari.

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

Rad sadrži: 42 stranice, 20 grafičkih prikaza, 7 tablica i 35 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: febuksostat, ciklička voltametrija, pravokutno-valna voltametrija, dijamantna elektroda s primjesama bora

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.  
**Doc. dr. sc. Miranda Sertić**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta  
**Doc. dr. sc. Sandra Jurić**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: svibanj 2017.

## 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 novel electroanalytical method for determination of febuxostat

Ivona Milanović

#### SUMMARY

Febuxostat is a strong, non-purine, selective inhibitor of xanthin oxidase which is used in treatment of hyperuricemia and in patients who are receiving treatment for leukemia and are at risk of developing tumor lysis syndrome.

This research investigated possible application of voltammetric techniques in its analysis on boron-doped diamond electrode as well as optimization of parameters of cyclic and square-wave voltammetry.

Febuxostat oxidizes irreversibly at potential of +1,35 V. From all electrodes that were examined, the best proved to be BDD electrode which surface needs to be polished after each measurement to ensure the reproducibility of obtained results. The appropriate basic electrolyte is Britton-Robins buffer with pH value of 5. The wave peak current in cyclic voltammetry shows linear dependence to square root of potential change speed within range from 25 to 2000 mV/s, which suggests that redox-process is diffusion-controlled. In square-wave voltammetry the convenient frequency is 300 Hz with pulse amplitude of 50 mV.

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, which are often used as pain-reducing agents in these patients, do not interfere with voltammetric analysis of febuxostat. The same is demonstrated with some other analytes which can be found in their serum or urine, such as uric acid, glucose and dopamine. Good selectivity is proven with analysis of finished-dosage form of febuxostat since no interference of excipients was observed.

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

Thesis includes: 42 pages, 20 figures, 7 tables and 35 references. Original is in Croatian language.

Keywords: febuxostat, cyclic voltammetry, square-wave voltammetry, boron-doped diamond 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.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: May 2017.



