

# Selektivnost elektroanalitičke metode za određivanje mesalazina i folne kiseline

---

Lacković, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:163:343961>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

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



**Lucija Lacković**

**Selektivnost elektroanalitičke metode za  
određivanje mesalazina i folne kiseline**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

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

*Zahvaljujem se svojoj mentorici, prof.dr.sc. Biljani Nigović, na trudu, pomoći, strpljivosti i susretljivosti tijekom izvođenja i pisanja ovog diplomskog rada.*

*Hvala svim prijateljima koji su bili uz mene tijekom cijelog studiranja i koji su učinili studentski život zabavnijim i ljepšim.*

*Najviše zahvaljujem svojoj obitelji i Antunu jer su bili moja najveća podrška i motivacija od samog početka studiranja.*

*Hvala mom tati što je uvijek vjerovao u mene i bio ponosan na mene.*

# SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| 1. UVOD.....  | 1  |
| 1.1. Folna kiselina .....                               | 2  |
| 1.2. Mesalazin.....                                     | 6  |
| 1.3. Elektroanalitičke metode.....                      | 10 |
| 1.3.1. Voltometrija.....                                | 11 |
| 1.3.1.1. Pravokutnovalna voltometrija .....             | 12 |
| 1.3.2. Krute elektrode.....                             | 13 |
| 1.3.2.1. Elektroda od staklastog ugljika.....           | 15 |
| 1.3.3. Nanomaterijali.....                              | 15 |
| 2. OBRAZLOŽENJE TEME.....                               | 18 |
| 3. MATERIJALI I METODE.....                             | 20 |
| 3.1. Kemikalije .....                                   | 21 |
| 3.2. Radni instrumenti .....                            | 22 |
| 3.3. Priprema otopina i suspenzija nanomaterijala ..... | 23 |
| 3.3.1. Britton-Robinson pufer .....                     | 23 |
| 3.3.2. Suspenzije nanomaterijala.....                   | 23 |
| 3.3.3. Otopine folne kiseline i mesalazina .....        | 24 |
| 3.3.4. Otopine za ispitivanje selektivnosti .....       | 25 |
| 3.4. Priprema elektroda i uvjeti mjerenja.....          | 29 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA .....                           | 30 |
| 5. ZAKLJUČCI.....                                       | 46 |
| 6. LITERATURA .....                                     | 48 |
| 7. SAŽETAK/SUMMARY .....                                | 55 |

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

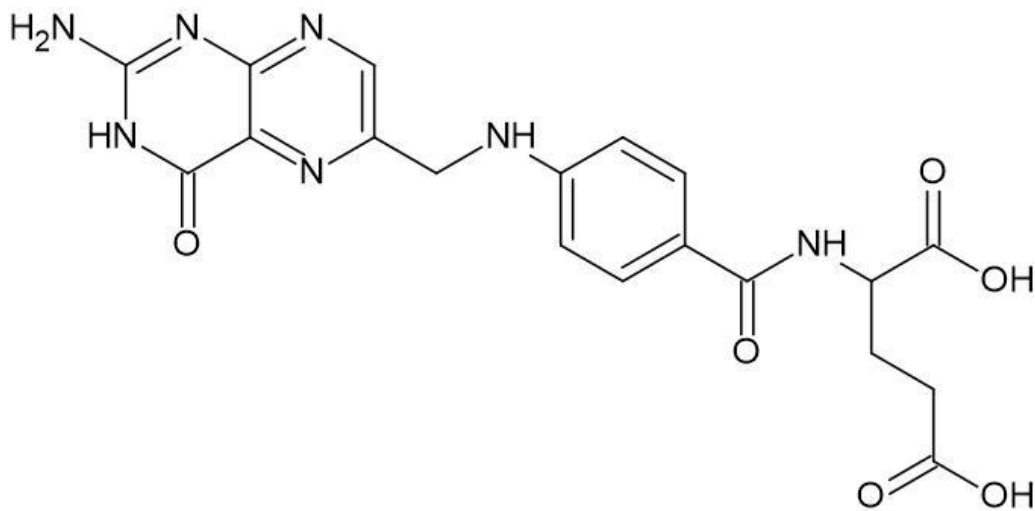
BASIC DOCUMENTATION CARD

# 1. UVOD

## 1.1. Folna kiselina

Folna kiselina jedan je od vitamina B kompleksa (vitamin B9) koji je u velikim količinama prisutan u zelenom lisnatom povrću zbog čega je i dobio naziv folna kiselina (lat. folium = list) (Mitchell i sur., 1941).

U vidu fizikalno-kemijskih karakteristika, folna kiselina ((2-S)-2-[[4-[(2-amino-4-okso-3H-pteridin-6-il)metilamino]benzoil]amino]pentandioična kiselina) (Slika 1) krutina je žute boje, bez mirisa, molekulske formule  $C_{19}H_{19}N_7O_6$  i molekulske mase 441,404 g/mol. Tali se pri  $250^{\circ}C$ , a topljivost u vodi pri  $25^{\circ}C$  iznosi 1,6 mg/L (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).

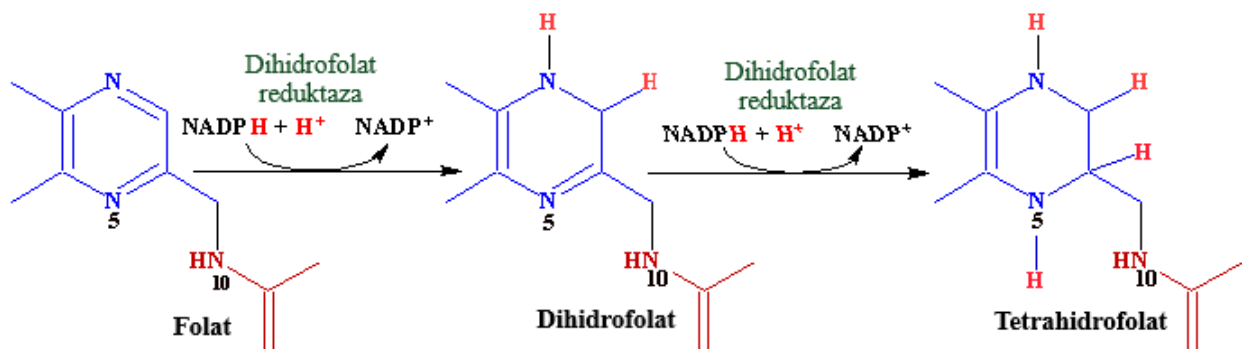


Slika 1. Strukturna formula folne kiseline

Folnu kiselinu otkrili su i izolirali Herschel K. Mitchell, Esmond E. Snell i Roger J. Williams 1941. godine u Lederle Laboratories of the American Cyanamid Company iz nekoliko tona listova špinata. Naredna istraživanja povezala su deficijenciju vitamina B9 s poremećajima novorođenčadi (Lovander i sur., 2018). Početkom 1960-ih deficijencija folne kiseline prepoznata je kao najznačajniji uzrok preventabilnog defekta neuralne cijevi. Ranih 1990-ih dobro dizajnirana randomizirana studija utvrdila je da suplementacija folatom može prevenirati takve defekte, a rezultati su pokazali kako se prevalencija smanjuje za 70% (Lanska, 2010).

Folna kiselina inaktivna je sama po sebi te kako bi u organizmu obavljala svoju funkciju mora se aktivirati redukcijom u kofaktore dihidrofolat (DHF) i tetrahidrofolat (THF) pomoću enzima dihidrofolat reduktaze (DHFR) (Slika 2). Ti kongeneri folne kiseline transportiraju se u stanice pomoću receptor-posredne endocitoze gdje su potrebni za održavanje normalne

eritropoeze (stvaranja crvenih krvnih stanica – eritrocita), sinteze nukleinskih kiselina, interkonverzije aminokiselina, metilacije tRNA. Točnije, folna kiselina esencijalan je kofaktor za enzime uključene u sintezu purina, pirimidina i metionina prije ugrađivanja u DNA ili protein. Aktivacija folne kiseline može biti prekinuta antimetabolitnom terapijom, poput metotreksata, budući da takvi lijekovi djeluju kao inhibitori DHFR za sprječavanje sinteze DNA u stanicama koje se brzo dijele ([www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca)).



Slika 2. Aktivacija folne kiseline do dihidrofolata i tetrahidrofolata (preuzeto s [www.chem.uwec.edu](http://www.chem.uwec.edu))

Folna kiselina posebno je važna tijekom procesa brzog staničnog dijeljenja, kakvi se javljaju tijekom trudnoće, djetinjstva i eritropoeze. Budući da ljudi nisu sposobni sintetizirati folnu kiselinu endogeno, hranom i suplementima nužno je prevenirati deficijenciju ([www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca)). Osim u zelenom lisnatom povrću, prisutna je i u citrusima te mahunarkama i orašastim plodovima ([rarediseases.org](http://rarediseases.org)). Serumske razine folata ispod 5 ng/mL ukazuju na deficijenciju folata, a serumske razine ispod 2 ng/mL najčešće rezultiraju megaloblastičnom anemijom gdje koštana srž stvara neuobičajeno velike, strukturno abnormalne, nezrele eritrocite ([www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca)). U najvećem broju slučajeva, megaloblastična anemija razvija se polako bez simptoma, no naposljetku se javljaju i uključuju umor, bljedilo kože, kratkoću daha, vrtoglavicu, brzi ili nepravilan puls ([rarediseases.org](http://rarediseases.org)). Abnormalne koncentracije folne kiseline povezane su i s reumatoidnim artritismom, Alzheimerovom bolešću i fibromialgijom (Lovander i sur., 2018). Nedovoljne razine folata mogu rezultirati brojnim zdravstvenim stanjima uključujući kardiovaskularne bolesti, megaloblastičnu anemiju, kognitivne deficijencije i defekte neuralne cijevi. Folna kiselina se uobičajeno suplementira tijekom trudnoće kako bi se prevenirao defekt neuralne cijevi te u alkoholičara za prevenciju razvoja neuroloških poremećaja ([www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca)).

Megaloblastična anemija uzrokovana deficijencijom folata povremeno je zabilježena u pacijenata s upalnim crijevnim bolestima i bila je pripisana lošoj prehrani, smanjenoj apsorpciji i povećanom iskorištavanju folata u tkivima (Lindenbaum, 1983). Također, i brojni operativni zahvati kojima se uklanjaju dijelovi crijeva mogu smanjiti apsorpciju vitamina i ostalih važnih nutrijenata. Deficit folne kiseline primijećen je u prosječno 40% odraslih oboljelih od Crohnove bolesti i 60% oboljelih od ulceroznog kolitisa (Vranešić Bender, 2005). Sulfasalazin, sastavljen od salicilata i sulfa lijeka, pomoću intestinalne flore raspada se na aktivne komponente. Široko je korišten u liječenju upalnih crijevnih bolesti i pokazano je da ometa apsorpciju folne kiseline u pacijenata s takvim bolestima (Lindenbaum, 1983). Općenito, suplementacija vitamina preporučljiva je svim oboljelima od upalnih bolesti crijeva, posebice djeci, kako ne bi došlo do zastoja u rastu i razvoju. Folna kiselina jedan je od nutrijenata koji su potrebni za obnavljanje stanica crijeva koje se oštećuju uslijed Crohnove bolesti (Vranešić Bender, 2005).

U hrani, prirodni folat prisutan je primarno u reduciranom, poliglutamatom obliku s metilnom ili formilnom skupinom kao supstituentom na ugljikovom atomu. Obogaćena hrana i suplementi sadrže folnu kiselinu, sintetički, potpuno oksidirani monoglutamatni oblik folata. Prirodni folati iz hrane imaju manju bioraspoloživost, što može biti posljedica parcijalnog otpuštanja iz matriksa hrane, destrukcije u gastrointestinalnom traktu i nepotpune hidrolize glutamata (moguće zbog parcijalne inhibicije dekonjugacije drugim komponentama hrane kao što su organske kiseline). Procijenjena bioraspoloživost folata iz hrane je oko 50% te sintetičke folne kiseline oko 85% kada se uzima s hranom ili 100% ako je uzeta na prazan želudac s vodom (Caudill, 2010).

Folna kiselina prema ATK klasifikaciji lijekova svrstana je u skupinu B03BB01 – Lijekovi s djelovanjem na krv i krvotvorne organe – Lijekovi za liječenje slabokrvnosti – Vitamin B12 i folna kiselina - Folna kiselina i derivati – Folna kiselina. Na hrvatskom tržištu registriran je lijek Folacin proizvođača Jadran Galenski laboratorij koji sadrži 5 mg folne kiseline u obliku tableta. Namijenjen je za liječenje megaloblastične anemije uzrokovane deficitom folata zbog pothranjenosti, hepatobilijarnih bolesti, upalnih bolesti crijeva (Crohnova bolest, ulcerozni kolitis), malapsorpcije te povećane potrebe za folatnom kiselinom (trudnoća). Koristi se i u profilaksi deficita folata u kroničnim hemolitičkim stanjima ili pri bubrežnoj dijalizi. Može se i prepisati za prevenciju defekta neuralne cijevi novorođenčeta u žena koje planiraju trudnoću te su u rizičnoj skupini, kao i kod dugotrajnog liječenja antagonistima folatne kiseline (metotreksatom ili kombinacijom sulfametoksazola i trimetoprima), antikonvulzivima



(fenitoin, fenobarbiton). U liječenju megaloblastične anemije primjenjuje se jedna tableta dnevno tijekom 4 mjeseca, kod upalnih bolesti crijeva do 3 tablete dnevno. Rizničnim trudnicama preporučuje se uzimanje jedne tablete dnevno tijekom prva tri mjeseca trudnoće za prevenciju defekata neuralne cijevi, dok se kod planirane trudnoće preporučuje uzimati folatnu kiselinu i 4 tjedna prije trudnoće. Ulazi u interakcije s antikonvulzivima, tj. može smanjiti plazmatsku koncentraciju fenobarbitona, fenitoina i primidona, i time povećati mogućnost nastanka epileptičnih napada. Dobro se podnosi te su nuspojave rijetke. Folna kiselina brzo se apsorbira iz proksimalnog dijela tankog crijeva, a vršna koncentracija u plazmi dostiže se unutar 60 minuta nakon primjene (mediately.co). Derivati folne kiseline raspodjeljuju se po svim tkivima, ali primarno se skladište u jetri (www.drugbank.ca). Jetra sadrži oko 50% tjelesnih zaliha folata, što iznosi između 6 i 14 miligrama. Ukupne tjelesne zalihe folata iznose otprilike 12-28 miligrama. Otprilike dvije trećine folata u plazmi vezano je za proteine (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov). Izlučuje se urinom, glomerularnom filtracijom. Najveći dio metabolita pojavljuje se u urinu unutar 6 sati. Mali dio oralno primijenjenog lijeka također je pronađen u fecesu. Folna kiselina izlučuje se i putem mlijeka u dojilja (www.drugbank.ca).

Zbog njezine važnosti u biološkim sustavima, nastala je povećana potreba za razvojem metoda koje bi mjerile folnu kiselinu u farmaceutskim, kliničkim i prehrambenim uzorcima. Neke od razvijenih metoda za određivanje same folne kiseline ili u kombinaciji s drugim lijekovima su: ELISA (Hoegger i sur., 2007), kemiluminiscencija (Anastasopoulos i sur., 2007; Zhang i sur., 2008;), fluorimetrija (Anastasopoulos i sur., 2007; Yu i sur., 2009), HPLC s ultraljubičastim ili elektrokemijskim detektorom (Amidzic i sur., 2005; Chaudhary i sur., 2010; Lebedzińska i sur., 2008), tekućinska kromatografija s tandemskom masenom spektroskopijom (Hannisdal i sur., 2009), kapilarna elektroforeza (Uysal i sur., 2010), mikroemulzijska elektrokinetička kromatografija (Aurora-Prado i sur., 2004) ili upotrebom biosenzora (Caselunghe i Lindeberg, 2000). One omogućuju pouzdanu identifikaciju i kvantifikaciju, odlične su selektivnosti i rezolucije, međutim vrlo su dugotrajne, skupe i složene. S druge strane, elektrokemijske metode poput voltometrije jednostavne su i brzog odgovora, a osjetljivost je usporediva s ostalim metodama. Prvotno su elektrokemijska svojstva folne kiseline bila ispitivana na živinoj elektrodi (Cakir i sur., 1997; Fernandez Alvarez i sur., 1988; Le Gall i van der Berg, 1993; Han i sur., 1991), no kasnije su se počele koristiti i modificirane elektrode (Yardim i Şentürk, 2014) kao što su zlatna elektroda modificirana višestrukim slojevima ugljikovih nanocjevčica (MWNT-GE-multi-walled

carbon nanotube modified gold electrode) (Lovander i sur., 2018), mikroelektroda s cilindričnim ugljikovim vlaknima (O'Shea i sur., 1991), elektroda od ugljikove paste s 1,3-dipropilimidazolbromidom, cinkovim oksidom i ugljikovim nanocjevčicama (Khaleghi i sur., 2016), staklasta ugljikova elektroda s filmom bizmuta (BiF-GCE-bismuth film glassy carbon electrode) (Vladislavić i sur., 2017), ugljikova ionska tekuća elektroda modificirana nanočesticama zlata i grafena (AuNPs-GR-CILE-gold nanoparticles and graphene modified carbon ionic liquid electrode) (Wang i sur., 2015), elektroda od ugljikove paste s nanočesticama zlata (AuNPs-CPE-gold nanoparticles carbon paste electrode) (Arvand i Dehsaraei, 2013), elektroda od staklastog ugljika s filmom olova (plated lead film electrode) (Korolczuk i Tyszczyk, 2007).

## 1.2. Mesalazin

5-aminosalicilati skupina su lijekova koji se već duže vrijeme koriste u terapiji upalnih crijevnih bolesti (IBD) poput ulceroznog kolitisa i Crohnove bolesti. Prvi aminosalicilatni lijek u kliničkoj upotrebi bio je sulfasalazin koji je azo-spoj sulfapiridina i 5-aminosalicilne kiseline (mesalazina). Loše se apsorbira u gornjem dijelu probavnog trakta te dopire do kolona gdje se djelovanjem bakterijskih azoreduktaza reducira i cijepa oslobađajući 5-aminosalicilnu kiselinu i sulfapiridin. Sulfapiridin se apsorbira, dok većina 5-aminosalicilne kiseline ostaje u kolonu i izlučuje se stolicom. 5-aminosalicilna kiselina aktivni je oblik kojemu sulfapiridin služi kao prijenosnik do kolona, dok je sulfapiridin odgovoran za većinu ozbiljnih nuspojava sulfasalazina (Akobeng i sur., 2016). Upotreba sulfasalazina limitirana je razvojem nuspojava povezanim s alergijskim reakcijama i visokim udjelom intolerancije (do 20%) na sulfapiridinsku komponentu (Iacucci i sur., 2010). Spoznaja da je 5-aminosalicilna kiselina aktivni dio sulfasalazina i da je sulfapiridin odgovoran za većinu nuspojava, dovela je do nekoliko istraživanja upotrebe 5-aminosalicilne kiseline kao samostalne molekule za liječenje upalnih bolesti crijeva. 5-aminosalicilna kiselina nezaštićeni je oblik jer se vrlo lako apsorbira već u proksimalnom dijelu tankog crijeva te ne može dospjeti do distalnog crijeva u terapijskim koncentracijama. Napravljeno je nekoliko formulacija 5-aminosalicilne kiseline u kojima se inhibira proksimalna apsorpcija i osigurava dostava do distalnih upalnih dijelova. Postoje dva osnovna načina kojima 5-aminosalicilna kiselina može biti zaštićena: povezivanjem s još jednom molekulom 5-aminosalicilne kiseline ili nekim drugim nosačem te upotrebom odgođenog oslobađanja oralne formulacije 5-aminosalicilne kiseline. Olsalazin je prolijek u kojemu su dvije molekule 5-aminosalicilne kiseline povezane azo vezom, dok je

balsalazid prolijek u kojem je 5-aminosalicilna kiselina povezana azo vezom s biološki inaktivnim nosačem, 4-aminobenzoil-B-alaninom. Kao i kod sulfasalazina, bakterijske azo-reduktaze cijepaju azo vezu u kolonu, oslobađajući 5-aminosalicilnu kiselinu. Formulacije mesalazina odgođenog oslobađanja obložene su ovojnicom dizajniranom za otapanje pri određenom pH, te se različitim ovojnicama može postići oslobađanje pri različitim pH, odnosno u različitim dijelovima crijeva (Akobeng i sur., 2016). Dakle, 5-aminosalicilni spojevi razvijeni su sa sličnom učinkovitošću kao sulfasalazin, ali s manje nuspojava. Mesalazin se općenito bolje podnosi nego sulfasalazin. Glavobolja i gastrointestinalni poremećaji (mučnina, bol u trbuhu) su uobičajene nuspojave mesalazina. Iako većina bolesnika koji su netolerantni prema sulfasalazinu toleriraju mesalazin, oko 10% bolesnika će imati sličan odgovor na mesalazin. Proljev se može pojaviti kod svih oblika 5-ASA lijekova i češći je u početku liječenja te obično prolazi za četiri do osam tjedana (Duvnjak i sur., 2013).

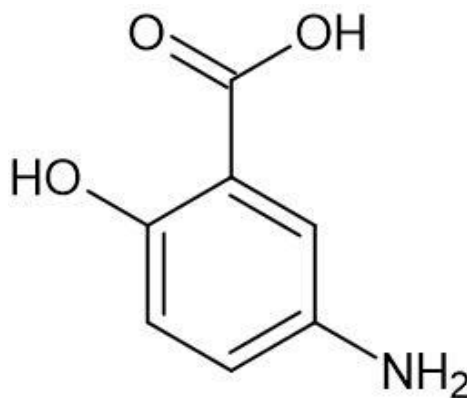
Ulcerozni kolitis i Crohnova bolest kronična su relapsirajuća stanja karakterizirana ponavljanim ciklusima aktivne i utišane bolesti (Iacucci i sur., 2010). Ulcerozni kolitis je upalna bolest nepoznate etiologije koja zahvaća sluznicu debelog crijeva (Duvnjak i sur., 2013). Crohnova bolest je kronična upalna bolest koja može uključivati bilo koji dio gastrointestinalnog trakta. Pridruženi simptomi uključuju abdominalnu bol, dijareju i gubitak na težini (Akobeng i sur., 2016). Njihovo liječenje ima dva glavna cilja: postizanje remisije (kontrola upale koja dovodi do smanjenja simptoma) te očuvanje remisije. Aminosalicilatni lijekovi koriste se u liječenju blagog do umjerenog oblika upalnih bolesti crijeva, no veća učinkovitost pokazala se u liječenju ulceroznog kolitisa. U blagim do umjerenim oblicima ulceroznog kolitisa aminosalicilati induciraju i održavaju remisiju. Kod Crohnove bolesti, ovi lijekovi također mogu biti korisni u kontroli blage upale i simptoma ([www.crohnscolitisfoundation.org](http://www.crohnscolitisfoundation.org)). Prevencija relapsa najveći je problem u upravljanju Crohnovom bolešću (Akobeng i sur., 2016).

Dostupna terapija za Crohnovu bolest uključuje kortikosteroide, aminosalicilate, imunosupresive, antagoniste faktora tumorske nekroze (TNF). Donedavni pristup liječenju bolesnika s upalnim bolestima crijeva uključivao je postupno uvođenje lijekova od onih manje učinkovitosti, ali potencijalno sigurnijih prema sve potentnijim, a time i toksičnijim lijekovima. Međutim, kako su sve učinkovitije terapije dostupne, danas se favorizira ranije uvođenje učinkovitijeg lijeka kako bi se preveniralo dugotrajno oštećivanje crijeva. Iako je algoritam terapije napredovao, aminosalicilati su ostali jedni od najprepisivanijih skupina lijekova za liječenje Crohnove bolesti i koriste se za indukciju i održavanje remisije (Ma i sur.,

2018). Mesalazin je u prvoj liniji liječenja upalnih crijevnih bolesti te je ostao glavni u liječenju blagog do umjerenog ulceroznog kolitisa, međutim, njegova upotreba u Crohnoj bolesti je upitna (Iacucci i sur., 2010). Meta analize randomiziranih studija nisu pronašle dokaze da je oralna terapija mesalazinom superiornija u odnosu na placebo niti u indukciji, niti u održavanju remisije. Unatoč ovim saznanjima, nekoliko kohortnih studija baziranih na populaciji iz Sjeverne Amerike i Europe pokazalo je da otprilike 40-60% pacijenata s Crohnovom bolesti u terapiji ima aminosalicilate (Ma i sur., 2018).

Prednosti mesalazina su da je generalno dobro toleriran i siguran za dugotrajnu uporabu s fleksibilnim doziranjem (Iacucci i sur., 2010). Pretpostavlja se da mesalazin igra ulogu u zaštiti od razvoja kolorektalnog karcinoma u pacijenata koji boluju od upalnih bolesti crijeva (Abdolmohammad-Zadeh i Kohansal, 2012).

U vidu fizikalno-kemijskih karakteristika, mesalazin (5-amino-2-hidroksibenzojeva kiselina) (Slika 3) krutina je bijele do blijedo roze boje, bez mirisa, molekulske formule  $C_7H_7NO_3$  i molekulske mase 153,14 g/mol. Tali se pri 283 °C, a topljivost u vodi pri 25 °C iznosi 122 mg/L. U prisutnosti svjetla je nestabilan jer svjetlo katalizira raspadanje mesalazina (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).



Slika 3. Struktura mesalazina

Mesalazin je protuupalni lijek. Iako mehanizam djelovanja mesalazina nije u potpunosti razjašnjen, vjeruje se da djeluje putem lokalnog protuupalnog učinka na upaljene epitelne stanice crijeva, a ne sistemski. U upaljenom crijevnom tkivu dolazi do pojačane migracije leukocita, produkcije metabolita arahidonske kiseline i citokina te formiranja slobodnih radikala (mediately.co). Moguće je da mesalazin smanjuje upalu blokiranjem ciklooksgenaze i inhibicijom stvaranja prostaglandina u kolonu, da veže slobodne radikale te da inhibira

aktivaciju nuklearnog faktora kappa B (NF $\kappa$ B) i posljedično smanjenje produkcije proupalnih citokina ([www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca)).

Mesalazin prema ATK klasifikaciji lijekova svrstan je u skupinu A07EC02 – Lijekovi s djelovanjem na probavni sustav i mijenu tvari – Lijekovi za suzbijanje proljeva, lijekovi za liječenje upalnih stanja probavnog sustava i lijekovi s antiinfektivnim djelovanjem u probavnom sustavu – Intestinalni antiinflamatorni lijekovi – Aminosalicilna kiselina i derivati – Mesalazin ([mediately.co](http://mediately.co)). Na hrvatskom tržištu registrirani su pripravci mesalazina dvaju proizvođača: Ferring proizvodi mesalazin nezaštićenog imena Pentasa, a Dr. Falk Pharma proizvodi mesalazin nezaštićenog imena Salofalk. Mesalazin dolazi u obliku pripravaka za oralnu i rektalnu primjenu. Za oralnu primjenu registrirane su želučanootporne granule i tablete te granule i tablete s produljenim, a dolazi u dozama od 250 do 2000 mg. Za rektalnu primjenu registrirani su čepići u dozama od 250 do 1000 mg i suspenzije za rektum u dozama od 1 i 4 g ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)). Oralni pripravci mogu se koristiti za liječenje upalnih bolesti crijeva koje zahvaćaju bilo koji dio crijeva, a rektalni se koriste samo za liječenje upala koje zahvaćaju donje dijelove crijeva ([ibdmedicationguide.org](http://ibdmedicationguide.org)). Rektalna primjena dozvoljava dostavu visoke doze lijeka na mjesto koje zahtjeva liječenje i zaobilazi sistemsku izloženost, a može se koristiti i u kombinaciji s oralnom terapijom za dodatno poboljšanje simptoma. Kombinacija rektalne i oralne terapije vjerojatno je učinkovitija od samo oralne ([www.crohnscolitisfoundation.org](http://www.crohnscolitisfoundation.org)). Primijenjen oralno ili rektalno, samo se mali dio mesalazina apsorbira, ostatak ostaje u crijevu i djeluje lokalno, reducira crijevnu upalu, dijareju, rektalno krvarenje i bol u trbuhu ([pubchem.ncbi.nlm.nih.gov](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)). Mesalazin se metabolizira predsistemički u crijevnoj sluznici i sistemski u jetri acetilacijom N-acetiltransferazom (NAT) u svoj primarni metabolit N-acetil-5-aminosalicilnu kiselinu. I mesalazin i acetyl-mesalazin se izlučuju urinom i fecesom. Urinom se uglavnom izlučuje acetyl-mesalazin ([mediately.co](http://mediately.co)). Nakon oralne primjene mesalazin i metabolit prelaze u majčino mlijeko i placentu. Međutim, njihove koncentracije u mlijeku te amnijskoj tekućini i pupčanoj vrpici vrlo su niske ([pubchem.ncbi.nlm.nih.gov](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)). Mesalazin se može uzimati s hranom ili bez hrane jer nema utjecaja na apsorpciju mesalazina ([www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca)).

Terapijska važnost mesalazina zahtijevala je razvoj analitičkih metoda za određivanje u dozirnim oblicima u skladu sa standardima dobre proizvodnje. Lijek od 2000. godine ima monografiju u Američkoj farmakopeji (USP) i službena metoda za njegovo određivanje je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) s tetrabutilamonij hidrogen sulfatom u mobilnoj fazi kao ionskim parom (Chandra i sur., 2011). Neke od drugih razvijenih metoda

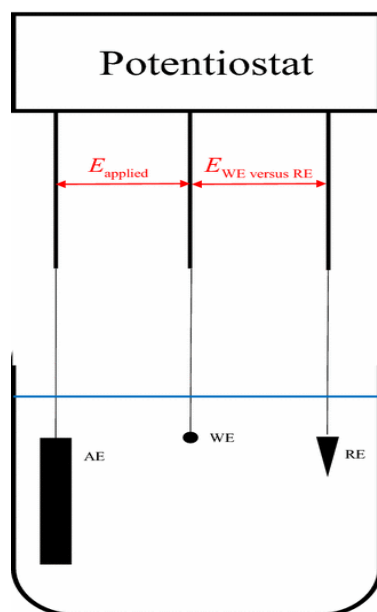
koje se mogu koristiti i za određivanje mesalazina u biološkim uzorcima uključuju voltametriju (Nigović i Šimunić, 2003; Nigović i sur., 2009), spektrofotometriju (Alasha Abdalla i Elbashir, 2014), spektrofluorometriju (Cui i sur., 2004; Lianidou i Ioannou, 1996) i HPLC s ultraljubičastim (Chungi i sur., 1989; Nobilis i sur., 2006), fluorescentnim (Bystrowska i sur., 2000; Hussain i sur., 1998), masenim (Orioli i sur., 2004; Pastorini i sur., 2008) i elektrokemijskim detektorom (Palumbo i sur., 2005).

### 1.3. Elektroanalitičke metode

Elektroanalitičke metode čine skupinu analitičkih metoda kod kojih se podatak o koncentraciji, aktivitetu ili drugom termodinamičkom svojstvu određivane molekulske vrste dobiva u ovisnosti o električnom naponu, struji ili naboju. Prema signalu pobude, čija je posljedica odvijanje elektrokemijske reakcije na radnoj elektrodi, i mjerenoj varijabli iz koje se dobiva željeni analitički ili drugi podatak o ispitivanoj otopini, dijele se na: potenciometriju, voltametriju, kronoamperometriju, elektrogravimetriju, kronopotenciometriju, kulometriju i konduktometriju (Nigović i Behetić, 2007). Svim elektrokemijskim metodama zajedničko je da je kemijski signal (koncentracija ili količina analita) pretvoren u fizikalni signal (napon, struja, radijacija, toplina, tlak...) koji je zatim pretvoren u prikladan električni signal i obrađen pomoću elektroničkog instrumenta. Ono što metode čini jednostavnim je da osim elektroda ne zahtijevaju drugi detektor. Često se koriste za detekciju tvari nakon odvajanja kromatografijom, kapilarnom elektroforezom i protočnom injekcijskom analizom. Prednost elektrokemijskih metoda je da zahtijevaju relativno malu količinu uzorka (Hauser, 1998). Elektrokemijski senzori posebno su privlačni zbog svoje izvanredne detekcije, jednostavnosti i niske cijene (Uslu i Ozkan, 2007). Elektroanalitičke metode koriste se u mnogim farmakopejskim postupcima u određivanju sadržaja ljekovitih i pomoćnih tvari. Potenciometrijski se određuje sadržaj onečišćenja u farmaceutskim tvarima (primjerice jodida u diosminu). Potenciometrijskim mjerenjem pH vrijednosti ograničavaju se kiselina ili lužnata onečišćenja u ljekovitim i pomoćnim tvarima koja potječu iz postupka proizvodnje ili nastaju u razgradnji tvari. Amperometrijskom titracijom određuje se točka ekvivalencije u postupku određivanja vode u ljekovitim tvarima Karl-Fischerovom titracijom (primjerice, u ispitivanju čistoće cefaleksina, betametazonacetata, ciprofloksacin hidroklorida, itd.). Konduktometrijski se određuje čistoća farmaceutske vode mjerenjem njezine vodljivosti i čistoća farmaceutskih tvari (primjerice određivanje onečišćenja ionskim spojevima u heparinu male molekulske mase) (Nigović i Behetić, 2007).

### 1.3.1. Voltometrija

Voltometrija je naziv za sve tehnike koje mjere struju kao funkciju električnog potencijala. Prvu voltometrijsku tehniku razvio je 1922. Jaroslav Heyrovsky i nazvao ju polarografija. Jedno su vrijeme voltometrija i polarografija korišteni kao sinonimi, no danas se polarografijom smatra isključivo voltometrija s kapajućom živinom elektrodom (Scholz, 2015). Prikaže li se grafički ovisnost struje o potencijalu, dobiva se voltamogram. Osnovne su jedinice modernog voltometrijskog instrumenta, osim računala, potenciostat i elektrokemijski članak. U voltometrijskim mjerenjima koriste se tri elektrode, radna elektroda na kojoj se odvija redoks reakcija, pomoćna ili protuelektroda te referentna elektroda. Reakcije redukcije najčešće se proučavaju na kapajućoj ili statičnoj živinoj elektrodi, visećoj živinoj kapi ili živinoj film elektrodi. Krute elektrode rabe se za oksidacijske procese. Postoji više vrsta krutih elektroda, npr. staklasta ugljikova elektroda, grafitna elektroda impregnirana voskom, ugljikova, platinska, zlatna elektroda, itd. (Nigović i Behetić, 2007). Referentna elektroda ima poznati i stalni električni potencijal te se koristi za kontrolu potencijala radne elektrode tako što se mjeri napon između njih (Scholz, 2015). Zadaća je potenciostata nametnuti potencijal i izmjeriti jakost struje (Slika 4). Potencijal se mjeri između radne i referentne elektrode, a struja između radne i pomoćne elektrode. (Nigović i Behetić, 2007).

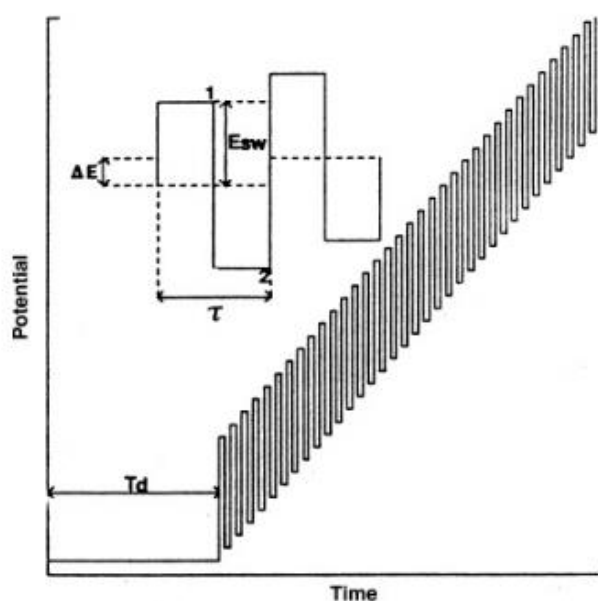


Slika 4. Elektrokemijski članak s tri elektrode i potenciostatom (Scholz, 2015),  $E_{\text{applied}}$ -primijenjeni napon, WE-radna elektroda, RE-referentna elektroda, AE-pomoćna elektroda

Voltametrijske metode primjenjuju se u kvantitativnoj analizi organskih i anorganskih tvari u vodenim i nevodnim medijima, za određivanje redoks potencijala, istraživanje kinetike i mehanizma redoks reakcija, kao i za elektrokemijsku detekciju eluiranih analita u tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti (HPLC). Najčešće primjenjivane voltametrijske metode su: ciklička voltametrija, diferencijalna pulsna voltametrija, pravokutnovalna voltametrija i stripping voltametrija (metoda otapanja pretkoncentriranog analita), kao i različite vrste polarografije (Nigović i Behetić, 2007).

### 1.3.1.1. Pravokutnovalna voltametrija

Pravokutnovalna voltametrija (engl. *square-wave voltammetry*, SWV) voltametrijska je tehnika u kojoj odziv nastaje nakon primjene pravokutnovalnih pulseva na stepeničasti signal potencijala između radne i referentne elektrode. Jakost struje mjeri se dvaput tijekom svakog ciklusa, jednom na kraju polaznog pulsa, a zatim na kraju pulsa suprotnog smjera (Slika 5. u trenucima 1 i 2) (Nigović i Behetić, 2007).

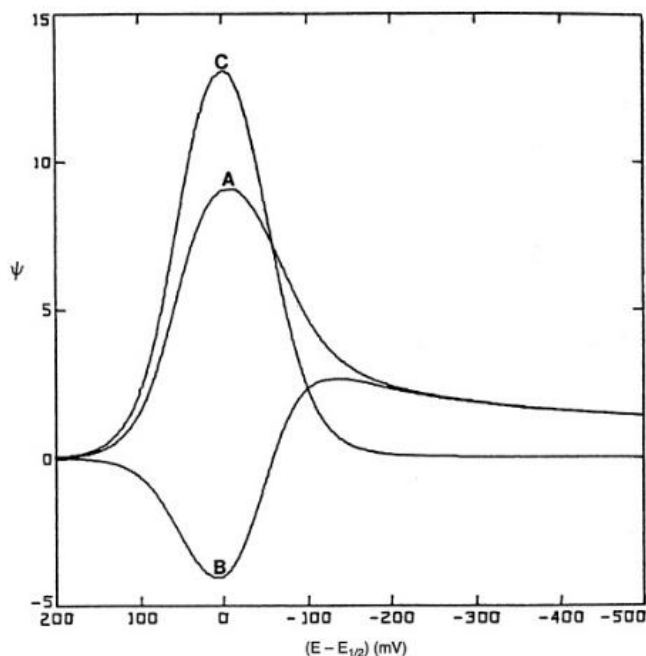


Slika 5. Prikaz pobudnog signala u pravokutnovalnoj voltametriji (Wang, 2000)

Za reverzibilnu reakciju redukcije veličina pulsa dovoljna je da se oksidacija produkta stvorenog na polaznom pulsu dogodi za vrijeme pulsa suprotnoga smjera, stoga se tehnika može primjenjivati i za istraživanje mehanizama prijenosa elektrona. Polazni puls proizvodi



katodnu struju, a povratni puls stvara anodnu struju. Razlika tih struja razmjerna je koncentraciji analita u otopini pa se može koristiti u kvantifikaciji analita, a potencijal maksimuma može se upotrijebiti za potvrdu identiteta analita (Slika 6) (Nigović i Behetić, 2007).



Slika 6. Pravokutnovalni voltamogram reverzibilnog prijenosa elektrona. Krivulja A: polazna struja. Krivulja B: povratna struja. Krivulja C: razlika struja A i B (Wang, 2000)

Najveća je prednost pravokutnovalne voltometrije njezina velika brzina. Frekvencije od 1 do 100 ciklusa u sekundi dopuštaju upotrebu ekstremno brzih promjena potencijala. Vrijeme analize time se skraćuje te cijeli voltamogram može biti snimljen za nekoliko sekundi, dok je kod diferencijalne pulsne voltometrije potrebno nekoliko minuta. Pravokutnovalna voltometrija pogodna je za brza, jednostavna i točna određivanja lijekovitih tvari u farmaceutskim ili biološkim uzorcima (Nigović i Behetić, 2007).

### 1.3.2. Krute elektrode

Krute elektrode počele su se koristiti u elektroanalitičkoj kemiji prije otprilike 50 godina. U voltometrijskim tehnikama koriste se kao radne elektrode. Na izvođenje voltometrijskih tehnika snažno utječu svojstva materijala radne elektrode kao što su kemijska i fizikalna svojstva površine elektrode, primijenjeni potencijal, adsorpcija i slojevi aplicirani na

elektrodnu površinu kako bi se unaprijedila detekcija. Krute elektrode su široko korištene u elektroanalitičkim metodama te su vrlo praktični materijali. Iako je teško osigurati reproducibilnost njihovih površina, krute elektrode imaju određene prednosti u odnosu na živine elektrode. Njihova popularnost raste vjerojatno zahvaljujući tome što se oksidacija mnogih organskih molekula ne može proučavati na živinoj elektrodi zbog njezinog ograničavajućeg raspona anodnog potencijala. Općenito, prednost krutih elektroda je što su materijali od kojih su izrađeni mehanički stabilniji i osiguravaju veći anodni raspon od živinih elektroda. Također, rukovanje krutim elektrodama puno je lakše (Uslu i Ozkan, 2007).

Na izvođenje voltametrijskih postupaka značajno utječe materijal radne elektrode. Izbor radne elektrode ovisi o oksidacijsko-reducirajućem ponašanju ispitivanog spoja i pozadinske struje u području potencijala potrebnog za mjerenje. Raspon potencijala, reproducibilnost površine, mehanička svojstva, cijena, dostupnost, električna vodljivost i toksičnost su kriteriji za odabir materijala krute elektrode. Najčešće korištene su elektrode od staklastog ugljika, platinske i zlatne elektrode. Srebro, nikal, bizmut i bakar također se mogu koristiti za neke specifične eksperimente. Krute elektrode mogu se izraditi u različitim oblicima kao što su tubularne, prstenaste, planarne, u makro i mikro veličini. Analitički kemičari naučili su kontrolirati reproducibilnost i osmislili su nekoliko postupaka obrade površine i derivatizacije kako bi unaprijedili selektivnost i osjetljivost. Krute elektrode lakše su za korištenje pri višim temperaturama i u većem rasponu tlaka. Njihova mala veličina i smanjena toksičnost ih čini vjerojatnim za *in vivo* primjene za proučavanje biokemijskih procesa s minimalnim oštećenjem tkiva (Uslu i Ozkan, 2007).

Elektrokemijska inertnost u širokom rasponu potencijala, visok prenapon za razvoj vodika i kisika, niska pozadinska struja i mogućnost lake regeneracije površine elektrode, čimbenici su koji osiguravaju visoku osjetljivost, točnost, reproducibilnost, te niske granice detekcije i određivanja. Obrada površine može se koristiti za unaprjeđenje voltametrijskih odgovora od interesa (Uslu i Ozkan, 2007). U voltametrijskim analizama lijekova upotrebljavaju se modificirane vrste elektrode koje povećavaju osjetljivost i selektivnost. Površina elektrode može se promijeniti elektrokemijskom aktivacijom, primjenom ultrazvuka ili kemijskim načinima. Primjena modificiranih elektroda jako je dobra u složenim biološkim uzorcima. Primjerice, elektrokemijski aktivirana elektroda od staklastog ugljika (oksidacijom kod visokih potencijala) preporučuje se za određivanje azitromicina u urinu, a sefadksom obrađena ugljikova elektroda primjenjuje se za analizu glibenklamida u serumu s granicom detekcije od  $4 \times 10^{-10}$  M (Nigović i Behetić, 2007).

### 1.3.2.1. Elektroda od staklastog ugljika

Ugljikove elektrode mogu se podijeliti na homogene (elektrode od staklastog ugljika, grafitne mikroelektrode, dijamantne elektrode, fulereni, ugljikove nanocjevčice) i heterogene (elektrode od ugljikove paste i modificirane elektrode od ugljikove paste). Ugljikove elektrode su općenito povoljnije cijene i dostupne su u raznim oblicima. Imaju sporiju kinetiku što omogućuje koristan široki raspon potencijala pogotovo u anodnom smjeru. Materijali elektroda baziranih na ugljiku sadrže šesteročlani aromatski prsten i  $sp^2$  hibridizaciju, a dobra električna vodljivost osigurana je višim stupnjem delokalizacije elektrona zajedno sa slabim Van der Waalsovima vezama. Različite predobrade elektroda igraju važnu ulogu u povećanju brzine prijenosa elektrona. Elektrode temeljene na ugljiku ne stupaju u interakcije s analitom i spojevima nastalima tijekom elektrolize, zbog čega je isključena mogućnost sistemskih pogrešaka nastalih zbog interakcija (Uslu i Ozkan, 2007).

Staklasti ugljik materijal je koji kombinira svojstva stakla i normalnog industrijskog ugljika. Elektrode od staklastog ugljika popularne su zbog odličnih električnih i mehaničkih svojstava, širokog raspona potencijala, kemijske inertnosti, relativno dobre reproducibilnosti, niske cijene, niske pozadinske struje i prikladne su za detekciju raznih spojeva. Za razliku od ostalih ne-grafitnih ugljika, staklasti ugljik nepropustan je za plinove. Vrlo je otporan na kiseline. Staklasti ugljik ima nisku gustoću, nisku termalnu ekspanziju, visoku korozivnu otpornost i visoku termalnu i električnu vodljivost. Gotovo sve elektrode od staklastog ugljika uspješno se poliraju malim česticama aluminijske (0,05  $\mu\text{m}$ ) na glatkoj tkanini za poliranje. Predobrada površine je nužna za stvaranje aktivne i reproducibilne površine takve elektrode te poboljšava njezinu analitičku izvedbu. Neki od dodatnih postupaka aktivacije elektrode uključuju elektrokemijske i kemijske procese, zagrijavanje u vakuumu ili tretman laserom (Usku i Ozkan, 2007).

### 1.3.3. Nanomaterijali

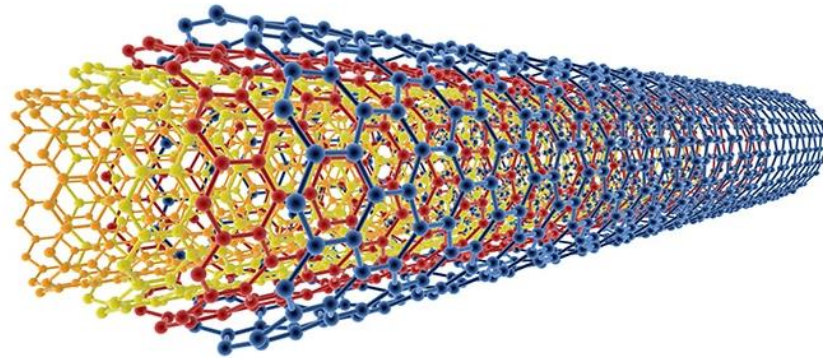
Nanomaterijali su kemijske tvari ili materijali građeni od čestica veličine između 1 i 100 nanometara (nm) u barem jednoj dimenziji. Zbog veće specifične površine po volumenu, nanomaterijali mogu imati drugačije karakteristike od onih koje taj isti materijal ima bez osobina na nanoskali. Stoga se fizikalno-kemijska svojstva nanomaterijala mogu razlikovati

od svojstava masivnijih tvari ili većih čestica. Brojni proizvodi koji sadržavaju nanomaterijale nalaze se na europskom tržištu (npr. baterije, premazi, antibakterijska odjeća, kozmetika, prehrambeni proizvodi) (echa.europa.eu). Pojava nanotehnologije i nanomaterijala otvorila je nove mogućnosti u razvoju i unaprjeđenju analitičkih uređaja. Svojstva nanostrukturnih materijala, poput visokog omjera površine i volumena, njihova sposobnost funkcionalizacije, povoljna elektronička i toplinska svojstva te elektrokatalitički učinak privukli su značajnu pozornost za dizajn novih elektrokemijskih senzorskih sustava (Merkoçi i sur., 2010).

Primjena nanomaterijala neizmjenjivo je pridonijela razvoju modificiranih elektroda za elektroanalizu lijekova. Nanomaterijali, u usporedbi s drugim materijalima koji se koriste za analizu lijekova, imaju zanimljiva električna, magnetska, elektronička, optička, kemijska i elektrokemijska svojstva. Veliki omjer površine i volumena, visoka vodljivost, elektrokatalitička aktivnost i biokompatibilnost čine ih idealnim modifikatorom gdje proizvode sinergistički učinak koji pomaže u određivanju farmaceutskih, biomedicinskih i ljekovitih spojeva u tragovima (Srivastava i sur., 2019). Nanomaterijali se primjenjuju u elektroanalizi radi poboljšanja imobilizacije enzima, antigena i nukleinskih kiselina na površinama elektroda, a pospješuju i reakcije prijenosa elektrona te pojačavaju analitički signal (Merkoçi i sur., 2010). Neki od nanomaterijala su: ugljikove nanocjevčice (CNTs), grafen, ugljikova nanovlakna, kvantne točke, nanočestice metala (zlata, srebra, bakra, platine, cink oksida, željezovog oksida i dr.), nanokompoziti na bazi polimera. Ugljikove nanocjevčice zanimljiv su materijal za modifikaciju u obliku cijevi i postoje dvije vrste: višeslojne ugljikove nanocjevčice (MWCNTs) i jednoslojne ugljikove nanocjevčice (SWCNTs) (Srivastava i sur., 2019).

Višeslojne ugljikove nanocjevčice (eng. *multi-walled carbon nanotubes*, MWCNTs) poseban su oblik ugljikovih nanocjevčica u kojem se više jednostrukih ugljikovih nanocjevčica (eng. *single-walled carbon nanotubes*, SWCNTs) gnijezde jedna unutar druge (Slika 7.) (www.ossila.com). Višeslojne ugljikove nanocjevčice imaju jedinstvenu strukturu  $sp^2$  hibridizacije te pripadaju vrsti šupljih grafitnih nanomaterijala (Wang i sur., 2018). Hibridizacija ugljika  $sp^2$  tvori slojevitou strukturu koja ima slabe Van der Waalove veze van ravnine i jake veze unutar ravnine. Višeslojne ugljikove nanocjevčice (MWCNTs) izrađene su od cilindara s uređenim razmakom između slojeva, oko središnje udubine. Broj slojeva određuje unutarnji i vanjski promjer MWCNTs. Unutarnji promjer varira od 0,4 nm pa do nekoliko nanometara, a vanjski promjer varira od 2 nm do 20–30 nm. MWCNTs su u oba vrha obično zatvoreni strukturom kupole. Aksijalna duljina MWCNTs razlikuje se od 1  $\mu\text{m}$

do nekoliko centimetara. Promjeri jednostrukih ugljikovih nanocjevčica (SWCNTs), slično, razlikuju se od 0,4 do 2–3 nm, a njihova se duljina nalazi u rasponu mikrometra (Samadishadlou i sur., 2018). Zbog veće površine, veće brzine prijenosa elektrona, veće katalitičke aktivnosti i dobre biološke kompatibilnosti, široko se koriste u elektroanalitičkoj kemiji (Wang i sur., 2018).



Slika 7. Struktura višeslojnih ugljikovih nanocjevčica (www.azonano.com)

Osobine MWCNTs i SWCNTs općenito su slične. U MWCNTs, zahvaljujući svojoj višeslojnoj strukturi, vanjski zidovi ne samo da su u stanju zaštititi unutarnje CNTs od kemijskih interakcija s vanjskim otopinama, nego također pružaju visoka svojstva vlačne čvrstoće. Zbog  $sp^2$  veze između ugljikovih atoma, CNTs imaju veću vlačnu čvrstoću od primjerice čelika. Izvješteno je da ova veza sadrži više snage u odnosu na dijamantsku  $sp^3$  vezu. S druge strane, elastičnost je još jedno izvanredno svojstvo CNTs. Nanocjevčica izložena raznim silama može izdržati različite deformacije bez oštećenja i vratit će joj izvornu konstrukciju. Međutim, elastičnost nanocjevčice je ograničena, a izlaganjem vrlo moćnim silama moguće je plastično deformirati. Podnose visoke temperature, do 750 °C pri normalnom atmosferskom tlaku i 2800 °C u vakuumu i pokazuju izvrsnu toplinsku vodljivost (Samadishadlou i sur., 2018).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Upalne bolesti crijeva, poput Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa kronična su relapsirajuća stanja karakterizirana ponavljanim ciklusima aktivne i utišane bolesti. Cilj njihova liječenja je postizanje i održavanje remisije, odnosno stanja bez simptoma. Aminosalicilatni lijekovi, skupina kojoj pripada mesalazin, koriste se u liječenju blagih do umjerenih oblika upalnih crijevnih bolesti.

U pacijenata s upalnim crijevnim bolestima često je zabilježen deficit brojnih vitamina koja se pripisuje smanjenoj apsorpciji, među kojima je i folna kiselina. Nizak status folne kiseline (vitamin B9) javlja se prosječno kod 40-60% odraslih oboljelih. Tome doprinose i lijekovi koji se istovremeno koriste jer mogu smanjiti njezinu apsorpciju. Zbog toga se suplementacija folnom kiselinom preporučuje svim oboljelima od upalnih bolesti crijeva u dozi od 15 mg dnevno, posebno kod djece koji su u aktivnoj fazi rasta i razvoja.

Važno je pratiti koncentracije folne kiseline i mesalazina u organizmu kako bi se i individualno odredile doze suplementa za pojedinog pacijenta. Stoga je razvijena nova elektroanalitička metoda za njihovo istovremeno određivanje, točnije voltametrijska metoda koja se zasniva na oksidaciji oba lijeka. Voltometrija je jednostavna, jeftina i brza tehnika kojom se mogu analizirati uzorci farmaceutskih oblika, ali i biološki uzorci.

Cilj ovog rada bio je novorazvijenoj metodi ispitati selektivnost, odnosno ispitati utjecaj određenih spojeva koji su prisutni u biološkim uzorcima, poput anorganskih soli i organskih spojeva na oksidacijske vrhove folne kiseline i mesalazina te ustanoviti mogu li se u njihovoj prisutnosti ta dva lijeka određivati te tako pretpostaviti njezinu moguću upotrebu na biološkim uzorcima. Također, ispitana je i moguća primjena novorazvijenog senzora u simultanom određivanju drugih aminosalicilatnih lijekova s folnom kiselinom i/ili mesalazinom. Na kraju su ispitane interferencije pomoćnih tvari različitih uzoraka farmaceutskih oblika na oksidacijske vrhove mesalazina i folne.

### 3. MATERIJALI I METODE



### 3.1. Kemikalije

Za izradu ovog diplomskog rada korištene su sljedeće supstancije:

1. Borna kiselina,  $H_3BO_3$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
2. Fosfatna kiselina (85%),  $H_3PO_4$  (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
3. Octena kiselina (99,5%),  $CH_3COOH$  (Alkaloid Skopje, Skopje, Makedonija)
4. Natrijev hidroksid,  $NaOH$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
5. Ultračista voda (dobivena pomoću Milli-Q sustava, Millipore, Bradford, SAD)
6. Folna kiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
7. Mesalazin (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
8. Višeslojne ugljikove nanocjevčice modificirane amino skupinama (US Research Nanomaterials, Inc., Houston, SAD)
9. Kitozan (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
10. Natrijev klorid,  $NaCl$  (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
11. Kalijev nitrat,  $KNO_3$  (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
12. Kalcijev klorid dihidrat,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
13. Natrijev hidrogenkarbonat,  $NaHCO_3$  (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
14. Glukoza, bezvodna (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
15. Mokraćna kiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
16. Askorbinska kiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
17. Dopamin hidroklorid (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
18. Sulfasalazin (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
19. N-acetilmesalazin (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
20. Dinatrijeva sol olsalazina (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
21. Balsalazid (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
22. Pentasa 500mg tablete (Ferring GmbH, Kiel, Njemačka)
23. Salofalk 500mg tablete (Würth, Zagreb, Hrvatska)
24. Mesalazin 500mg tabletten (Kohlpharma GmbH, Merzig, Njemačka)
25. Folacin 5mg tablete (JGL, Rijeka, Hrvatska)

## 3.2. Radni instrumenti

Analitička vaga Mettler Toledo AB-204-S korištena je za vaganje svih supstancija za izradu otopina, te nanomaterijala za izradu suspenzije.

Za podešavanje pH Britton-Robinsonovog pufera na optimalnu vrijednost korišten je pH-metar s kombiniranom staklenom elektrodom (Mettler Toledo) koji se prije upotrebe kalibrira dvjema standardnim otopinama pufera čiji su pH:  $pH_1=4,00\pm 0,01$  te  $pH_2 = 7,00\pm 0,01$ .

Sporije otapanje supstancija olakšala je upotreba ultrazvučne kupelji (Elma S 30H Elmasonic) te je također omogućila homogenizaciju suspenzije nanomaterijala.

Sva elektroanalitička mjerenja napravljena su pomoću potenciostata  $\mu$ -Autolab (Eco Chemie), čija su mjerenja upravljana računalnim programom GPES 4.9. Na potenciometar je spojen elektrokemijski članak koji se sastoji od radne elektrode, referentne elektrode i pomoćne elektrode. Kao radna elektroda upotrijebljena je staklasta ugljikova elektroda čija je površina modificirana višeslojnim ugljikovim nanocjevčicama s vezanim amino skupinama suspendiranim u 0,5%-tnom kitozanu u 1%-tnoj octenoj kiselini. Ulogu referentne elektrode imala je srebro/srebrov klorid (Ag/AgCl) elektroda, a ulogu pomoćne elektrode platinska elektroda.

### 3.3. Priprema otopina i suspenzija nanomaterijala

#### 3.3.1. Britton-Robinson pufer

Britton-Robinson (BR) pufer smjesa je triju kiselina koncentracije 0,5 M: borne ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), octene ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) i fosfatne ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) koje se priređuju na sljedeći način:

- a) 0,5 M borna kiselina priprema se vaganjem 3,0915 g borne kiseline, kvantitativnim prenošenjem pomoću praščića, te otapanjem pomoću ultračiste vode u odmjernoj tikvici od 100,0 mL.
- b) 0,5 M octena kiselina priprema se pipetiranjem 2,87 mL 99,5%-tne octene kiseline pomoću graduirane pipete u odmjernu tikvicu od 100,0 mL te nadopunjavanjem ultračistom vodom do oznake.
- c) 0,5 M fosfatna kiselina priprema se pipetiranjem 3,37 mL 85%-tne fosfatne kiseline pomoću graduirane pipete u odmjernu tikvicu od 100,0 mL te nadopunjavanjem ultračistom vodom do oznake.

U odmjernu tikvicu od 250,0 mL pipetira se po 20,0 mL svake od pripremljenih kiselina te se nadopuni ultračistom vodom do oznake. Tako dobiveni BR pufer ima vrijednost pH 1,8, a željeni pH za analizu podešava se miješanjem BR pufera i određenog volumena 0,2 M otopine NaOH. Kao optimalna pH vrijednost BR pufera za pripremu radnih otopina odabran je pH 6.

0,2 M otopina NaOH pripremljena je vaganjem 2,0 g NaOH, kvantitativnim prenošenjem pomoću praščića za vaganje u odmjernu tikvicu od 250,0 mL te nadopunom ultračistom vodom do oznake.

#### 3.3.2. Suspenzija nanomaterijala

Kao nanomaterijal korištene su višeslojne ugljikove nanocjevčice s vezanim amino skupinama. Na analitičkoj vagi izvaže se u praščić 1,0 mg višeslojnih ugljikovih nanocjevčica s vezanim amino skupinama, te zatim kvantitativno prenese u tikvicu volumena 5,0 mL. U tu tikvicu je zatim dodan 1,0 mL otopine 0,5%-tnog kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini koja služi za homogeno suspendiranje nanomaterijala pa koncentracija nanomaterijala u suspenziji iznosi 1 mg/mL.

10,0 mL 1%-tne octene kiseline priprema se razrjeđivanjem 100  $\mu$ L 99,5%-tne octene kiseline i 9,9 mL ultračiste vode, dok se 0,5%-tna otopina kitozana u 1%-tnoj octenoj kiselini priprema miješanjem 1%-tnog kitozana u 1%-tnoj octenoj kiselini i 1%-te otopine octene kiseline u jednakim omjerima.

Pripravljena suspenzija nanomaterijala zatvorena je čepom koji se učvrsti parafilmom, stavi u ultrazvučnu kupelj i homogenizira pola sata. Suspenzija nanomaterijala čuva se u hladnjaku na 4 °C gdje je i zaštićena od svjetlosti. Prije svake upotrebe suspenzija nanomaterijala se homogenizira pola sata u ultrazvučnoj kupelji.

### 3.3.3. Otopine folne kiseline i mesalazina

#### 3.3.3.1. Matične otopine

Kao matične otopine korištene su otopine folne kiseline i mesalazina koncentracija  $1 \times 10^{-3}$  M.

Matična otopina folne kiseline ( $M_r = 441,404$  g/mol) pripremljena je vaganjem 4,414 mg krutine folne kiseline na analitičkoj vagi u praščiću za vaganje, te potom kvantitativno preneseno u odmjernu tikvicu od 10,0 mL. Kako bi prijenos zaista bio kvantitativan, praščić se isprao ultračistom vodom u tikvicu. Za olakšavanje otapanja folne kiseline dodane su dvije kapi NaOH pa je tikvica stavljena u ultrazvučnu kupelj kako bi se folna kiselina što brže otopila. Nakon toga se tikvica nadopunila ultračistom vodom do oznake te izmućkala. Matična otopina folne kiseline čuvana je u hladnjaku na 4 °C gdje je ujedno zaštićena od svjetlosti.

Matična otopina mesalazina ( $M_r = 153,137$  g/mol) pripremljena je vaganjem 1,5 mg krutine mesalazina na analitičkoj vagi u praščiću za vaganje te potom kvantitativno preneseno u odmjernu tikvicu od 10,0 mL. Kako bi prijenos zaista bio kvantitativan, praščić se isprao ultračistom vodom u tikvicu, a tikvica potom nadopunjena do oznake ultračistom vodom i stavljena u ultrazvučnu kupelj kako ne bi zaostale neotopljene čestice. Matična otopina mesalazina čuvana je u hladnjaku na 4 °C gdje je ujedno zaštićena od svjetlosti.

#### 3.3.3.2. Radna otopina

Za dobivanje radne otopine folne kiseline i mesalazina koriste se određeni volumeni matičnih otopina koji se prenesu u odmjernu tikvicu od 20,0 mL i potom se tikvica nadopuni Britton-

Robinson puferom pH 6 do oznake. Kako je željena koncentracija folne kiseline u radnoj otopini  $5 \times 10^{-5}$  M, volumen matične otopine folne kiseline koji treba pipetirati je 1,0 mL. Željena koncentracija mesalazina u radnoj otopini je  $2,5 \times 10^{-5}$  M, pa matične otopine mesalazina treba pipetirati 0,5 mL.

### 3.3.4. Otopine za ispitivanje selektivnosti

Kao otopine za ispitivanje selektivnosti korištene su otopine različitih anorganskih soli, organskih spojeva, lijekova/metabolita te gotovih farmaceutskih oblika.

Za pripremu otopina anorganskih soli i organskih spojeva različitih koncentracija, potrebno je na analitičkoj vagi odvagati odgovarajuću masu ispitivane supstancije u prašić za vaganje, kvantitativno prenijeti u odmjernu tikvicu odgovarajućeg volumena, te nadopuniti ultračistom vodom do oznake. Iznimka je mokraćna kiselina kojoj se za pospješivanje otapanja dodaju par kapi NaOH, a nakon otapanja u ultrazvučnoj kupelji nadopuni se ultračistom vodom do oznake. U Tablici 1. prikazane su mase odvaganih krutina, volumeni odmernih tikvica u kojima su otopine pripravljene te koncentracije tvari u tim otopinama. U iduće dvije kolone prikazani su alikvoti koji su dodavani pripremljenoj radnoj otopini folne kiseline i mesalazina te koncentracije tvari u radnoj otopini.

Tablica 1. Priprema otopina anorganskih soli/organskih spojeva za ispitivanje selektivnosti

|  | <u>masa</u><br><u>odvagane</u><br><u>krutine</u> | <u>volumen</u><br><u>pripremljene</u><br><u>otopine</u> | <u>koncentracija</u><br><u>otopine</u> | <u>aliquoti</u> | <u>koncentracije</u><br><u>u radnoj</u><br><u>otopini</u> |
|--|--|---|--|-----------------|---|
| NaCl (Mr=59,44)                                      | 2,972 g  | 10 mL   | 5 M                                    | 200 $\mu$ L     | $5,0 \times 10^{-2}$ M                                    |
| KNO <sub>3</sub><br>(Mr=101,103)                     | 1,011 g  | 10 mL   | 1 M                                    | 1 mL            | $5,0 \times 10^{-2}$ M                                    |
| CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O<br>(Mr=147,008) | 0,3675 g   | 5 mL  | 0,5 M                                  | 2 mL            | $5,0 \times 10^{-2}$ M                                    |
| NaHCO <sub>3</sub><br>(Mr=84,007)                    | 0,210 g  | 5 mL  | 0,5 M                                  | 2 mL            | $5,0 \times 10^{-2}$ M                                    |

|  |          |       |                      |   |   |
|--|----------|-------|----------------------|---|---|
| glukoza<br>(Mr=180,156)                | 1,3512 g | 5 mL  | 1,5 M                | 200 $\mu$ L,<br>400 $\mu$ L   | $1,5 \times 10^{-2}$ M,<br>$3,0 \times 10^{-2}$ M   |
| mokraćna<br>kiselina<br>(Mr=168,1103)  | 0,0168 g | 20 mL | $5 \times 10^{-3}$ M | 30 $\mu$ L,<br>60 $\mu$ L,<br>70 $\mu$ L,<br>100 $\mu$ L,<br>200 $\mu$ L,<br>300 $\mu$ L                              | $7,5 \times 10^{-6}$ M,<br>$1,5 \times 10^{-5}$ M,<br>$1,75 \times 10^{-5}$ M,<br>$2,5 \times 10^{-5}$ M,<br>$5,0 \times 10^{-5}$ M,<br>$7,5 \times 10^{-5}$ M  |
| askorbinska<br>kiselina<br>(Mr=176,12) | 0,0660 g | 10 mL | 0,0375 M             | 5 $\mu$ L,<br>10 $\mu$ L,<br>15 $\mu$ L,<br>20 $\mu$ L,<br>30 $\mu$ L,<br>50 $\mu$ L                                  | $9,0 \times 10^{-6}$ M,<br>$1,8 \times 10^{-5}$ M,<br>$2,8 \times 10^{-5}$ M,<br>$3,6 \times 10^{-5}$ M,<br>$5,5 \times 10^{-5}$ M,<br>$9,3 \times 10^{-5}$ M   |
| dopamin<br>hidroklorid<br>(Mr=189,64)  | 0,0038 g | 5 mL  | $4 \times 10^{-3}$ M | 10 $\mu$ L,<br>20 $\mu$ L,<br>30 $\mu$ L,<br>40 $\mu$ L,<br>60 $\mu$ L,<br>80 $\mu$ L,<br>120 $\mu$ L,<br>200 $\mu$ L | $2,0 \times 10^{-6}$ M,<br>$4,0 \times 10^{-6}$ M,<br>$6,0 \times 10^{-6}$ M,<br>$8,0 \times 10^{-6}$ M,<br>$1,2 \times 10^{-5}$ M,<br>$1,6 \times 10^{-5}$ M,<br>$2,4 \times 10^{-5}$ M,<br>$4,0 \times 10^{-5}$ M |

Osim anorganskih soli i organskih spojeva, ispitane su i interferencije s drugim lijekovima i metabolitom mesalazina (N-acetilmesalazin). Izrađene su otopine tih spojeva koncentracija  $2,5 \times 10^{-3}$  M u odmjernim tikvicama od 5,0 mL. U Tablici 2. prikazane su mase odvaganih krutina koje su jednakim postupkom otopljene u ultračistoj vodi u tikvici. Iznimka je N-acetilirani metabolit mesalazina koji se otapa u metanolu. Također su u istoj tablici prikazani alikvoti koji su dodani radnoj otopini folne kiseline i mesalazina te konačne koncentracije tih tvari u radnim otopinama.

Tablica 2. Priprema otopina lijekova/metabolita za ispitivanje selektivnosti

|  | <u>masa</u><br><u>odvagane</u><br><u>krutine</u> | <u>volumen</u><br><u>pripremljene</u><br><u>otopine</u> | <u>koncentracija</u><br><u>otopine</u> | <u>aliquoti</u>                             | <u>koncentracije</u><br><u>u radnoj</u><br><u>otopini</u>                     |
|--|--|---|--|---|---|
| sulfasalazin<br>(Mr=398,394)                 | 0,0050 g   | 5 mL  | $2,5 \times 10^{-3}$ M                 | 100 $\mu$ L,<br>200 $\mu$ L,<br>400 $\mu$ L | $1,25 \times 10^{-5}$ M,<br>$2,5 \times 10^{-5}$ M,<br>$5,0 \times 10^{-5}$ M |
| N-acetilmesalazin<br>(Mr=195,174)            | 0,0024 g   | 5 mL  | $2,5 \times 10^{-3}$ M                 | 80 $\mu$ L,<br>160 $\mu$ L,<br>240 $\mu$ L  | $1,0 \times 10^{-5}$ M,<br>$2,0 \times 10^{-5}$ M,<br>$3,0 \times 10^{-5}$ M  |
| dinatrijeva sol<br>olsalazina<br>(Mr=346,21) | 0,0043 g   | 5 mL  | $2,5 \times 10^{-3}$ M                 | 100 $\mu$ L,<br>200 $\mu$ L,<br>400 $\mu$ L | $1,25 \times 10^{-5}$ M,<br>$2,5 \times 10^{-5}$ M,<br>$5,0 \times 10^{-5}$ M |
| balsalazid<br>(Mr=401,29)                    | 0,0050 g   | 5 mL  | $2,5 \times 10^{-3}$ M                 | 200 $\mu$ L,<br>400 $\mu$ L,<br>600 $\mu$ L | $2,5 \times 10^{-5}$ M,<br>$5,0 \times 10^{-5}$ M,<br>$7,5 \times 10^{-5}$ M  |

Kako bi se ispitala moguća interferencija pomoćnih tvari u gotovim farmaceutskim oblicima napravljene su otopine triju vrsta tableta mesalazina (Pentasa, Salofalk, Mesalazin-Kohlpharma) i jedne vrste tableta folne kiseline (Folacin).

Za pripremu otopine u odmjerne tikvici od 10,0 mL u kojoj je koncentracija mesalazina jednaka  $5 \times 10^{-3}$  M, Mr=153,135, potrebna je masa mesalazina 7,657 mg. Izvagana je masa jedne tablete koja sadrži 500 mg mesalazina, zatim je tableta izmrvljena i homogenizirana u tarioniku pomoću pistila, a potom izvagana u praščić za vaganje ona količina tablete kojoj odgovara masa aktivne tvari od 7,657 mg. Ta količina je pomoću praščića kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu od 10,0 mL i nadopunjena do oznake ultračistom vodom.

Isti postupak vrijedi za pripremu otopine tablete folne kiseline. Za pripremu 5,0 mL otopine folne kiseline koncentracije  $1 \times 10^{-3}$  M, Mr=441,404, potrebna je masa folne kiseline 2,2 mg.

Folacin tableta sadrži 5 mg folne kiseline, te je nakon postupka vaganja cijele tablete, usitnjavanja i homogeniziranja, izvagana u praščić ona količina tablete koja sadrži 2,2 mg folne kiseline. Zbog boljeg otapanja, odmjerna tikvica je nadopunjena s 2,5 mL NaOH i 2,5 mL ultračiste vode. U Tablici 3. prikazane su mase pojedinih tableta, te mase tableta koje sadrže odgovarajuću masu aktivnih tvari (mesalazina i folne kiseline).

Za mjerenja potrebno je napraviti radnu otopinu za svaku tabletu filtriranjem gore opisanih pripremljenih uzoraka tableta. 100  $\mu$ L filtrata pripremljenog uzorka tableta mesalazina otpipetirano je u odmjernu tikvicu od 20,0 mL te je nadopunjeno BR puferom pH 6 do oznake. Koncentracija mesalazina u radnoj otopini iznosi  $2,5 \times 10^{-5}$  M. Jednako tako, otpipetiran je 1,0 mL filtrata pripremljenog uzorka tablete folne kiseline u odmjernu tikvicu od 20,0 mL i nadopunjeno je BR puferom do oznake, te je koncentracija folne kiseline u tako pripremljenoj otopini  $5 \times 10^{-5}$  M.

Tablica 3. Priprema otopina gotovih farmaceutskih oblika mesalazina i folne kiseline

| <u>gotovi farmaceutski oblik</u> | <u>masa jedne tablete:</u> | <u>masa tablete koja sadrži:</u>  |
|----------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|
|                                  |                            | <u>a) 0,007657 g mesalazina</u>   |
| Pentasa tbl                      | 0,7432 g                   | 0,0114 g                          |
| Salofalk tbl                     | 0,8378 g                   | 0,0128 g                          |
| Mesalazin (Kohlpharma) tbl       | 0,8940 g                   | 0,0137 g                          |
|                                  |                            | <u>b) 0,0022 g folne kiseline</u> |
| Folacin tbl                      | 0,1959 g                   | 0,0862 g                          |



### 3.4. Priprema elektroda i uvjeti mjerenja

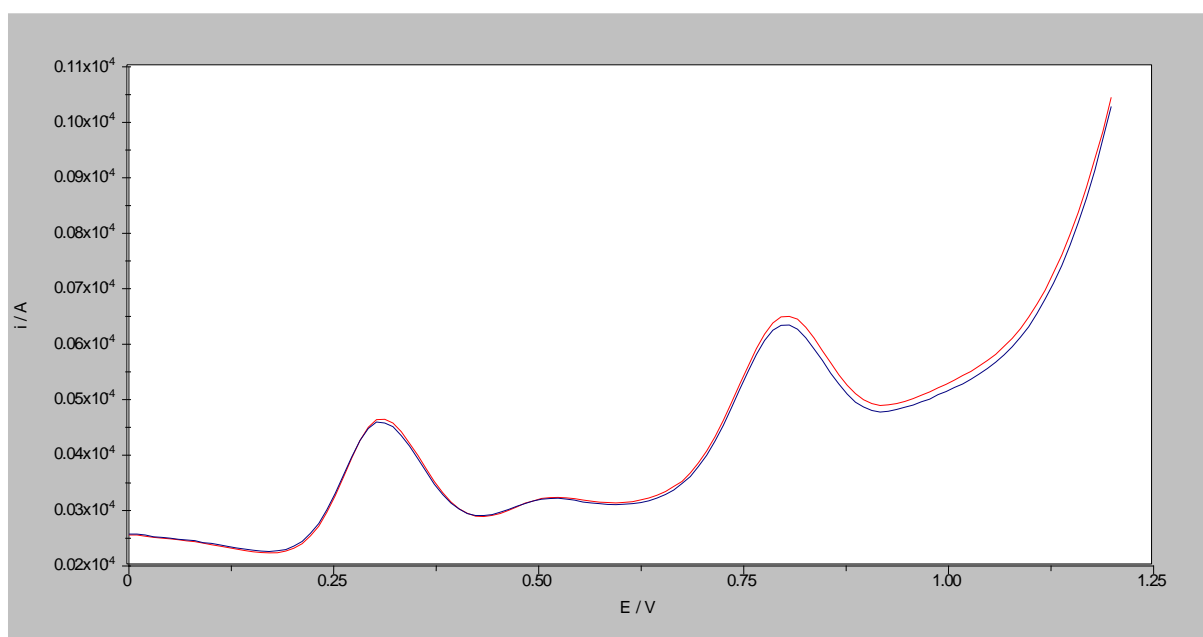
Kako bi se snimili pravokutnovalni voltamogrami smjese mesalazina i folne kiseline s nizom različitih spojeva potrebno je pripremiti elektrodu za mjerenje. Staklastu ugljikovu elektrodu je potrebno prije mjerenja polirati na krpici posutom prahom aluminijevog oksida ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) te staviti u ultrazvučnu kupelj kako na njoj površini ne bi zaostale čestice aluminijevog oksida i potom isprati deioniziranom vodom. Tako pripremljenoj i posušenoj elektrodi se potom modificira površina nanošenjem 5  $\mu\text{L}$  suspenzije nanomaterijala koja je prethodno homogenizirana u ultrazvučnoj kupelji. Nakon što se nanese sloj u potpunosti posuši, elektroda je spremna za korištenje. Elektrodu je prvo potrebno uroniti u otopinu Britton-Robinson pufera pH 6 uz frekvenciju od 100 Hz, amplitudu pulsa 40 mV i porast potencijala 10 mV, koji su optimalni parametri razvijene metode, te su snimljena dva voltamograma kako bi se ustalilo očitavanje jakosti struje. Potom se elektroda uranja u pripremljene radne otopine smjese mesalazina, folne kiseline i pojedinačno svakog analita za kojeg se ispituje interferencija na voltametrijske odgovore mesalazina i folne kiseline. Po završetku svake analize, elektroda se nanovo uranja u otopinu Britton-Robinson pufera, snimi dva voltamograma kako bi se očistila od eventualno adsorbiranog analita i kako on ne bi utjecao na daljnje rezultate mjerenja.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U pravokutnovalnom voltamogramu otopine mesalazina i folne kiseline, zabilježenom u BR puferu pH vrijednosti 6 na elektrodi od staklastog ugljika modificiranoj ugljikovim nanocjevčicama s vezanim amino skupinama u kitozanu kao biopolimeru, vidljiva su dva dobro definirana strujna vrha koja odgovaraju oksidaciji mesalazina na 0,33 V i oksidaciji folne kiseline na 0,81 V. Kako bi se utvrdila selektivnost nove elektroanalitičke metode za istovremeno određivanje mesalazina i folne kiseline na prethodno razvijenom nanosenzoru, potrebno je ispitati utjecaj potencijalno interferirajućih drugih molekula na struju oksidacije tih lijekova. Ukoliko postoji interferencija druge molekule s određivanjem mesalazina i/ili folne kiseline, tada se jakost struje vrha oksidacije mesalazina/folne razlikuje više od 5% od njihove jakosti struje vrha oksidacije dobivene nakon dodatka molekule za koju se ispituje interferencija.

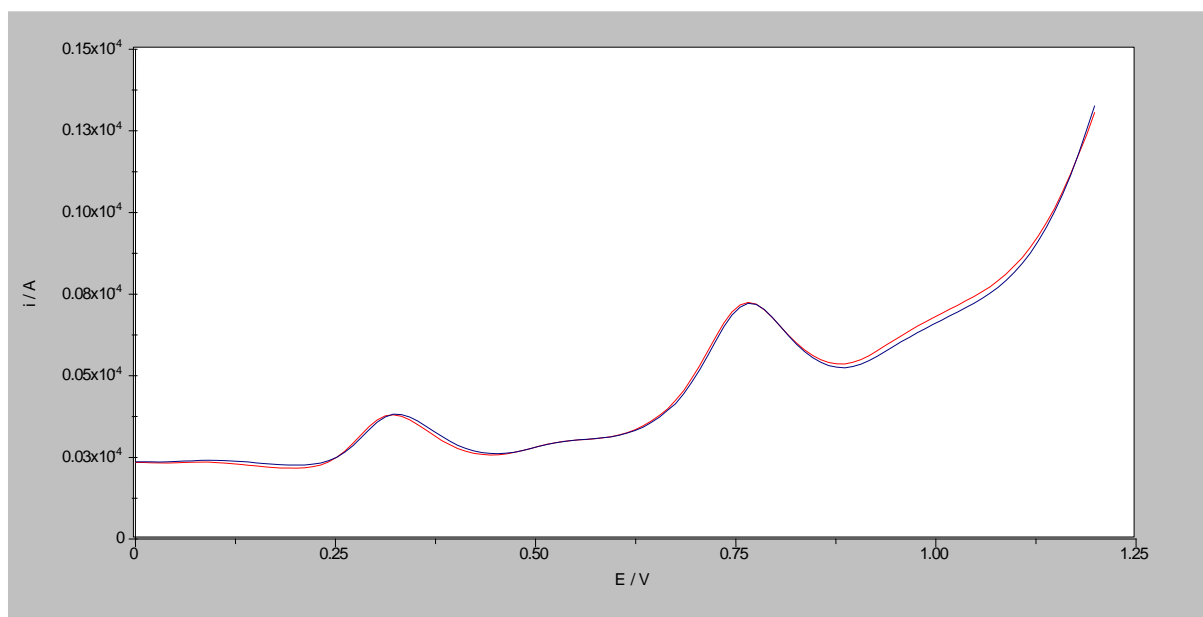
Snimljeni su pravokutnovalni voltamogrami smjese mesalazina i folne kiseline s otopinama različitih anorganskih soli, organskih spojeva i lijekova/metabolita u različitim koncentracijama u odnosu na stalne koncentracije mesalazina i folne kiseline.

Prvo su ispitane interferencije anorganskih soli: NaCl, KNO<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O te NaHCO<sub>3</sub> koje su u radnim otopinama imale koncentraciju 5×10<sup>-2</sup> M, odnosno 1000 puta veću koncentraciju od folne kiseline, čija je koncentracija u radnoj otopini 5×10<sup>-5</sup> M.



Slika 8. Pravokutnovalni voltamogrami otopine mesalazina i folne kiseline koncentracije 5×10<sup>-5</sup> M (crveno) i iste otopine s dodanim NaHCO<sub>3</sub> koncentracije 5×10<sup>-2</sup> M (plavo)

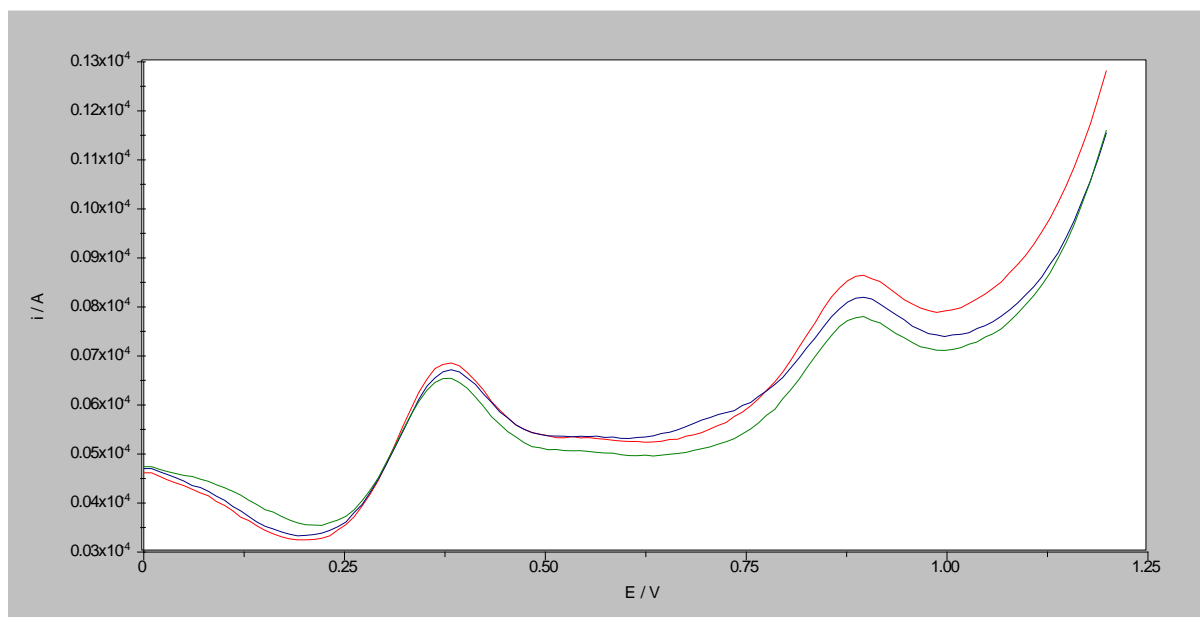
Na slici 8. i slici 9. prikazani su pravokutnovalni voltamogrami smjese mesalazina i folne kiseline prije i poslije dodanih  $\text{NaHCO}_3$ , odnosno  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , a slični voltamogrami dobiveni su i dodatkom  $\text{NaCl}$  te  $\text{KNO}_3$ . Budući da se voltamogrami prije i poslije dodatka potencijalno interferirajuće soli gotovo preklapaju, ne opažaju se interferencije ispitivanih anorganskih soli s određivanjem mesalazina i folne kiseline na novorazvijenom nanosenzoru.



Slika 9. Pravokutnovalni voltamogrami otopine mesalazina koncentracije  $2,5 \times 10^{-5}$  M i folne kiseline koncentracije  $5 \times 10^{-5}$  M (crveno) i iste otopine s dodanim  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  koncentracije  $5 \times 10^{-2}$  M (plavo)

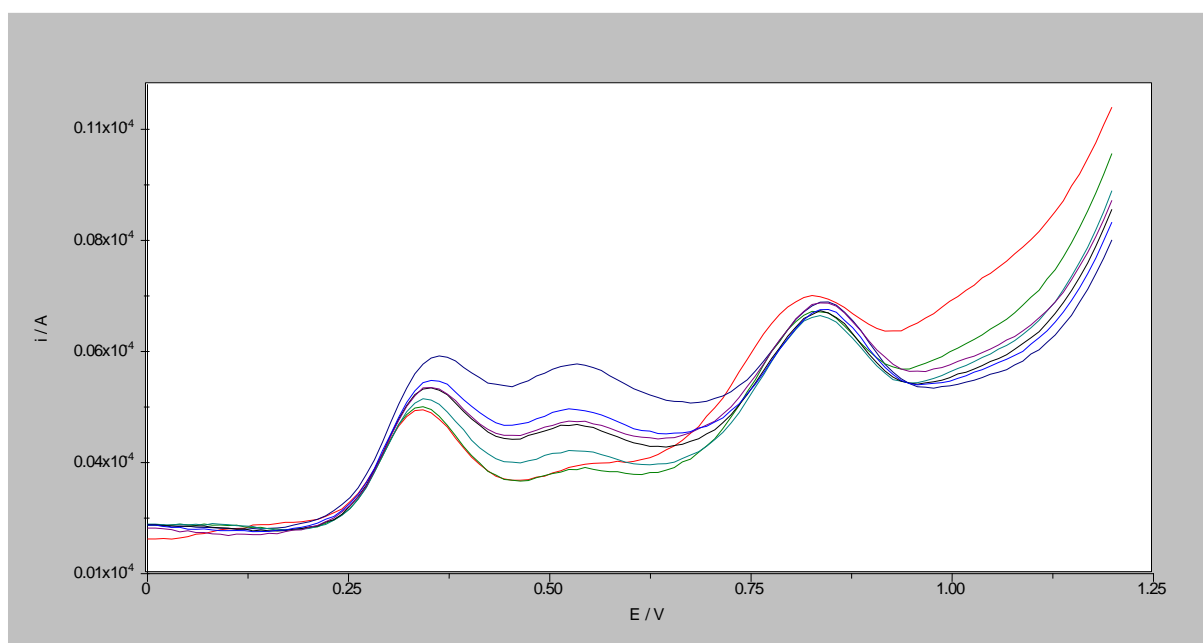
Zatim su ispitane interferencije s različitim organskim spojevima (glukoza, askorbinska kiselina, mokraćna kiselina, dopamin hidroklorid).

Smjesi mesalazina i folne kiseline dodana je glukoza u 300 te 600 puta većoj koncentraciji od koncentracije lijekova te je snimljen pravokutnovalni voltamogram prikazan na slici 10. Glukoza ne utječe niti na strujni vrh oksidacije mesalazina, niti na strujni vrh oksidacije folne kiseline dobiven upotrebom nanosenzora.



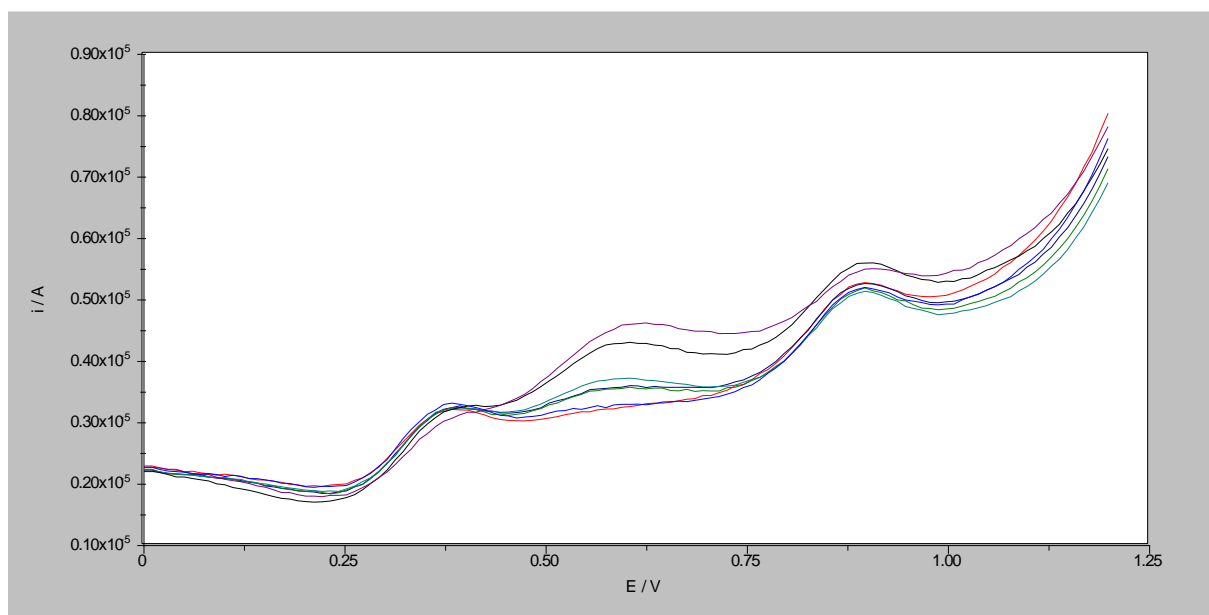
Slika 10. Pravokutnovalni voltamogrami otopine mesalazina i folne kiseline koncentracija  $5 \times 10^{-5}$  M (crveno) i iste otopine s dodanom glukozom u koncentracijama  $1,5 \times 10^{-2}$  M (zeleno) i  $3,0 \times 10^{-2}$  M (plavo)

Slika 11. pokazuje snimljene pravokutnovalne voltamograme radne otopine mesalazina i folne kiseline bez i s dodanom askorbinskom kiselinom u različitim koncentracijama. Primijećena je interferencija askorbinske kiseline na strujni vrh oksidacije mesalazina pri koncentraciji  $1,8 \times 10^{-5}$  M, a na strujni vrh oksidacije folne kiseline pri  $9,3 \times 10^{-5}$  M. Također, na slici 11. može se vidjeti dodatan vrh oksidacije pri potencijalu 0,534 V koji odgovara oksidaciji askorbinske kiseline na korištenom nanosenzoru.



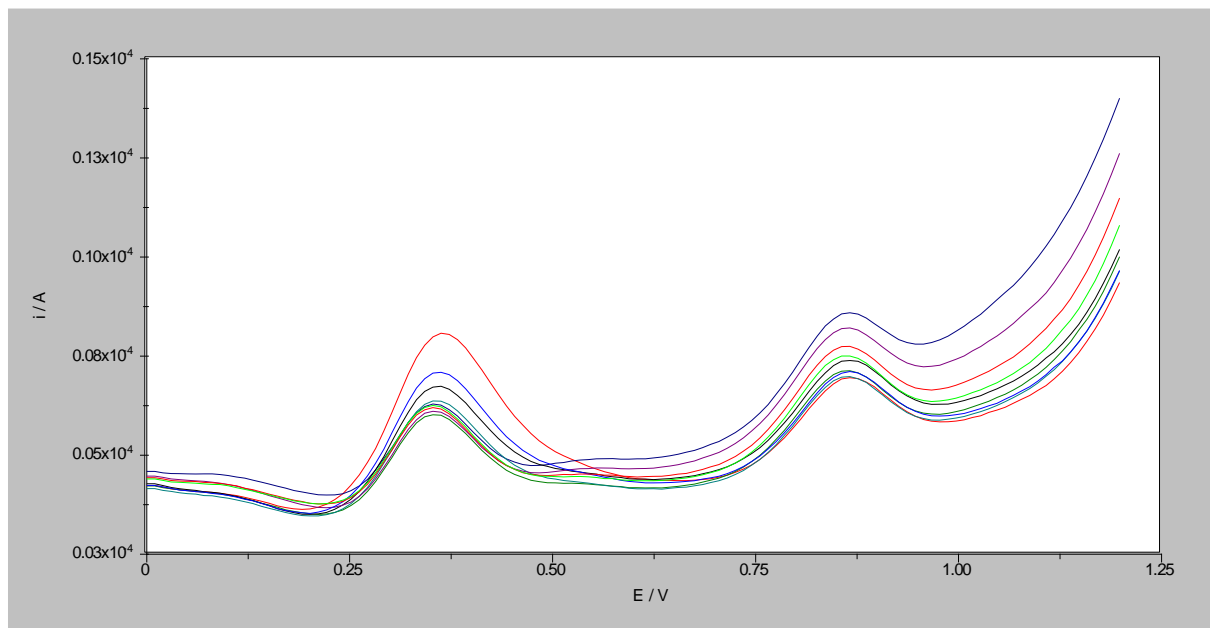
Slika 11. Pravokutnovalni voltamogrami otopine mesalazina koncentracije  $2,5 \times 10^{-5}$  M i folne kiseline koncentracije  $5 \times 10^{-5}$  M (crveno) i iste otopine s dodanom askorbinskom kiselinom u koncentracijama  $9,0 \times 10^{-6}$  M (zeleno),  $1,8 \times 10^{-5}$  M (tirkizno),  $2,8 \times 10^{-5}$  M (crno),  $3,6 \times 10^{-5}$  M (ljubičasto),  $5,5 \times 10^{-5}$  M (svjetlo plavo),  $9,3 \times 10^{-5}$  M (tamno plavo)

Snimljeni su pravokutnovalni voltamogrami smjese mesalazina i folne kiseline prije i poslije dodatka različitih koncentracija mokraćne kiseline te su prikazani na slici 12. Primijećena je interferencija mokraćne kiseline na strujni vrh oksidacije mesalazina pri koncentraciji  $5 \times 10^{-5}$  M, a na strujni vrh oksidacije folne kiseline pri  $7,5 \times 10^{-5}$  M. Opažen je novi oksidacijski vrh pri potencijalu 0,635 V koji odgovara oksidaciji mokraćne kiseline.



Slika 12. Pravokutnovalni voltamogrami otopine mesalazina koncentracije  $2,5 \times 10^{-5}$  M i folne kiseline koncentracije  $5 \times 10^{-5}$  M (crveno) i iste otopine s dodanom mokraćnom kiselinom u koncentracijama  $7,5 \times 10^{-6}$  M (plavo),  $1,5 \times 10^{-5}$  M (tamno plavo),  $1,75 \times 10^{-5}$  M (zeleno),  $2,5 \times 10^{-5}$  M (tirkizno),  $5,0 \times 10^{-5}$  M (crno),  $7,5 \times 10^{-5}$  M (ljubičasto)

Na slici 13. prikazani su pravokutnovalni voltamogrami smjese mesalazina i folne kiseline snimljeni prije i poslije dodatka različitih koncentracija dopamin hidroklorida. Primijećena je interferencija dopamin hidroklorida na strujni vrh oksidacije mesalazina pri koncentraciji  $1,6 \times 10^{-5}$  M, dok na strujni vrh oksidacije folne kiseline dopamin hidroklorid ne pokazuje interferenciju. Novi oksidacijski vrh opažen pri potencijalu 0,355 V odgovara oksidaciji dopamin hidroklorida.

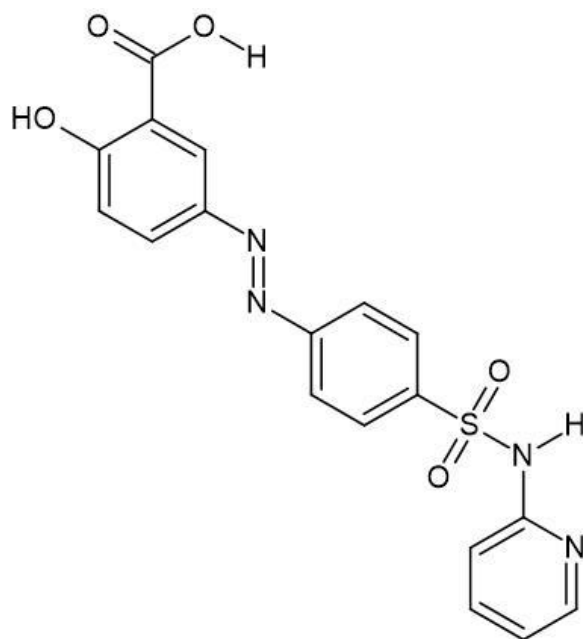


Slika 13. Pravokutnovalni voltamogrami otopine mesalazina koncentracije  $2,5 \times 10^{-5}$  M i folne kiseline koncentracije  $5 \times 10^{-5}$  M (crveno, niže struje) i iste otopine s dodanim dopamin hidrokloridom u koncentracijama  $2,0 \times 10^{-6}$  M,  $4,0 \times 10^{-6}$  M,  $6,0 \times 10^{-6}$  M,  $8,0 \times 10^{-6}$  M,  $1,2 \times 10^{-5}$  M,  $1,6 \times 10^{-5}$  M (crno),  $2,4 \times 10^{-5}$  M (plavo) i  $4,0 \times 10^{-5}$  M (crveno, više struje)

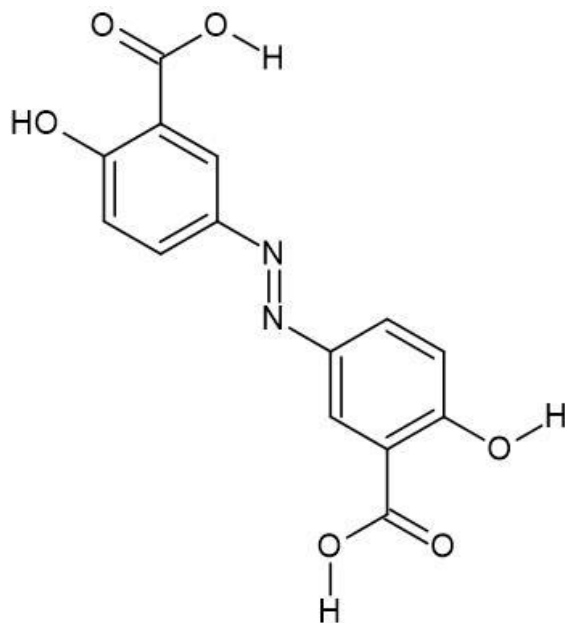
Od organskih spojeva interferencije s mesalazinom pokazuju askorbinska kiselina, mokraćna kiselina i dopamin hidroklorid, a s folnom kiselinom pokazuju askorbinska i mokraćna kiselina. Međutim, interferencije su uočene za koncentracije koje su više od onih endogeno očekivanih u biološkom uzorku.



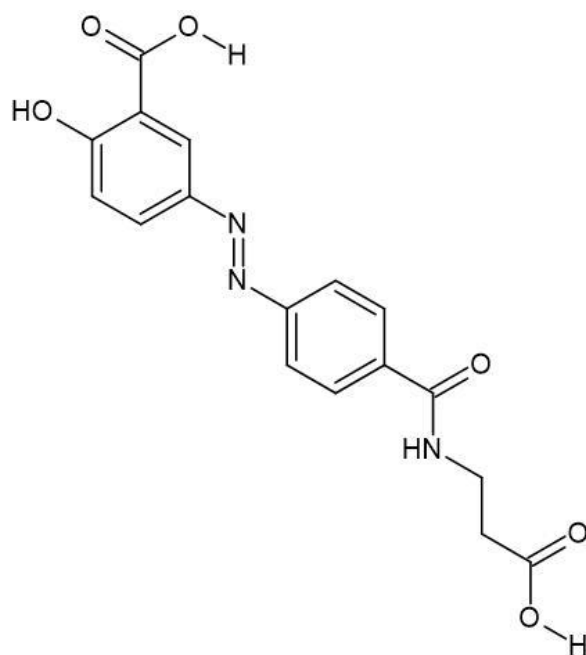
Ispitana je interferencija drugih aminosalicilatnih lijekova (sulfasalazin, dinatrijeva sol olsalazina, balsalazid) kao i metabolit mesalazina (N-acetilmesalazin). Sulfazalazin, olsalazin i balsalazid su kao i mesalazin lijekovi koji se koriste u liječenju kroničnih upalnih bolesti crijeva uključujući i Crohnovu bolest. Njihove strukture prikazane su na slikama 14., 15. i 16.



Slika 14. Struktura sulfasalazina

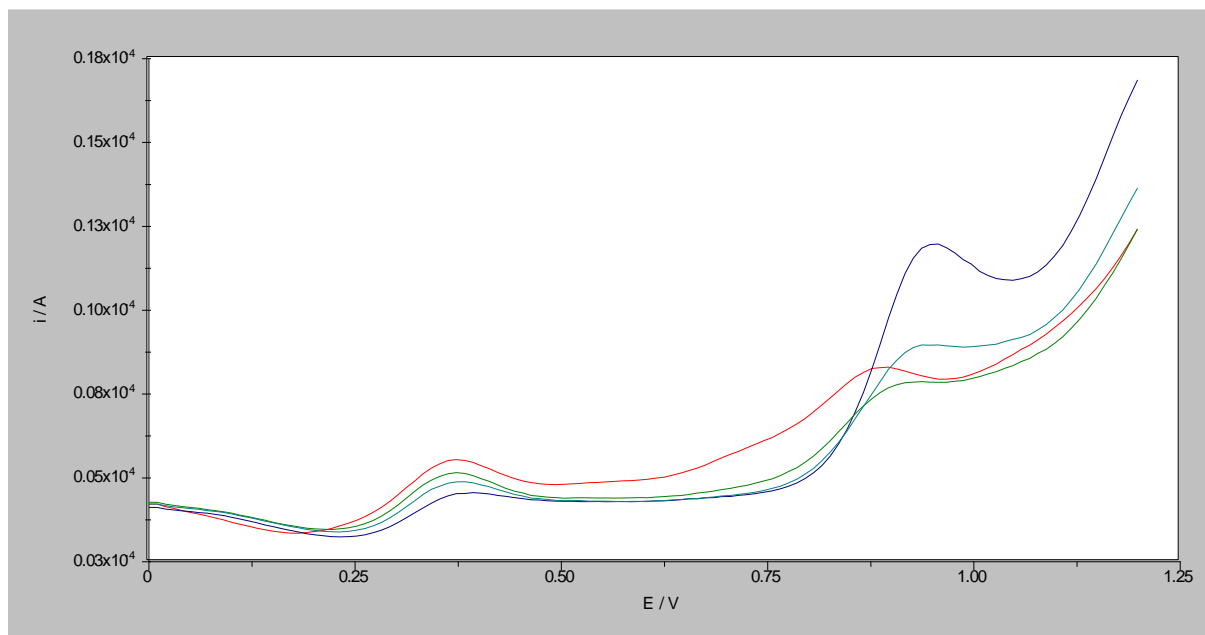


Slika 15. Struktura olsalazina



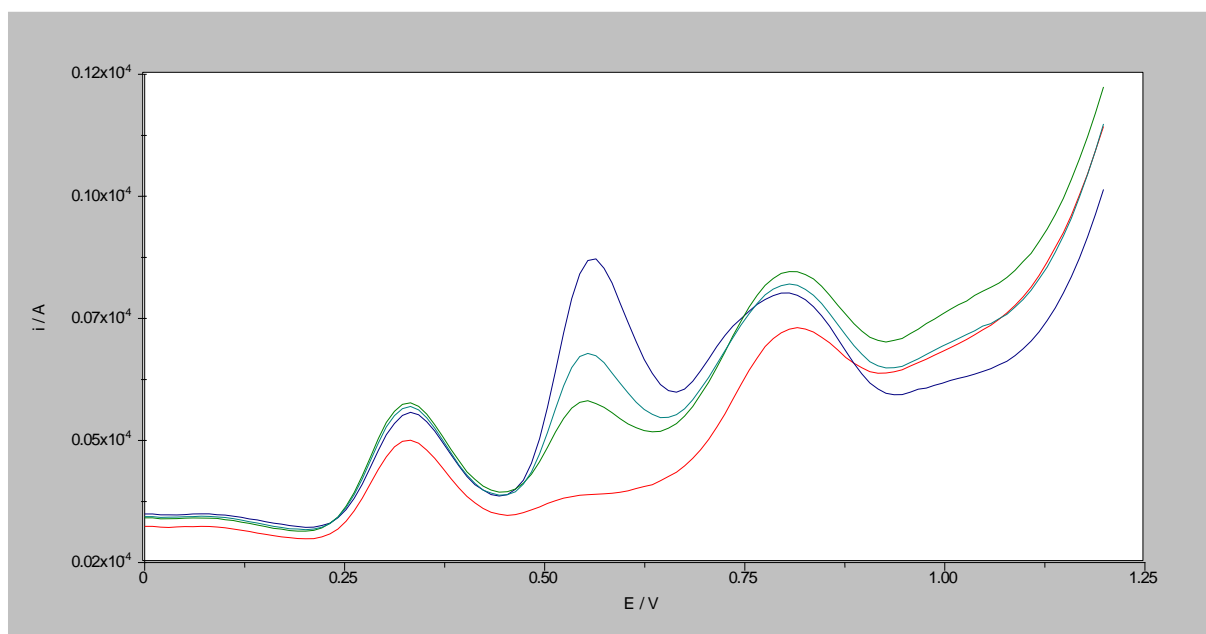
Slika 16. Struktura balsalazida

Na slici 17. prikazani su snimljeni pravokutnovalni voltamogrami smjese mesalazina i folne kiseline prije i poslije dodatka sulfasalazina u različitim koncentracijama. Primijećene su interferencije na strujni vrh oksidacije folne kiseline već pri koncentraciji  $1,25 \times 10^{-5}$  M, a na strujni vrh oksidacije mesalazina pri koncentraciji  $5 \times 10^{-5}$  M. Oksidacija sulfasalazina na nanosenzoru događa se pri potencijalu 0,95 V.



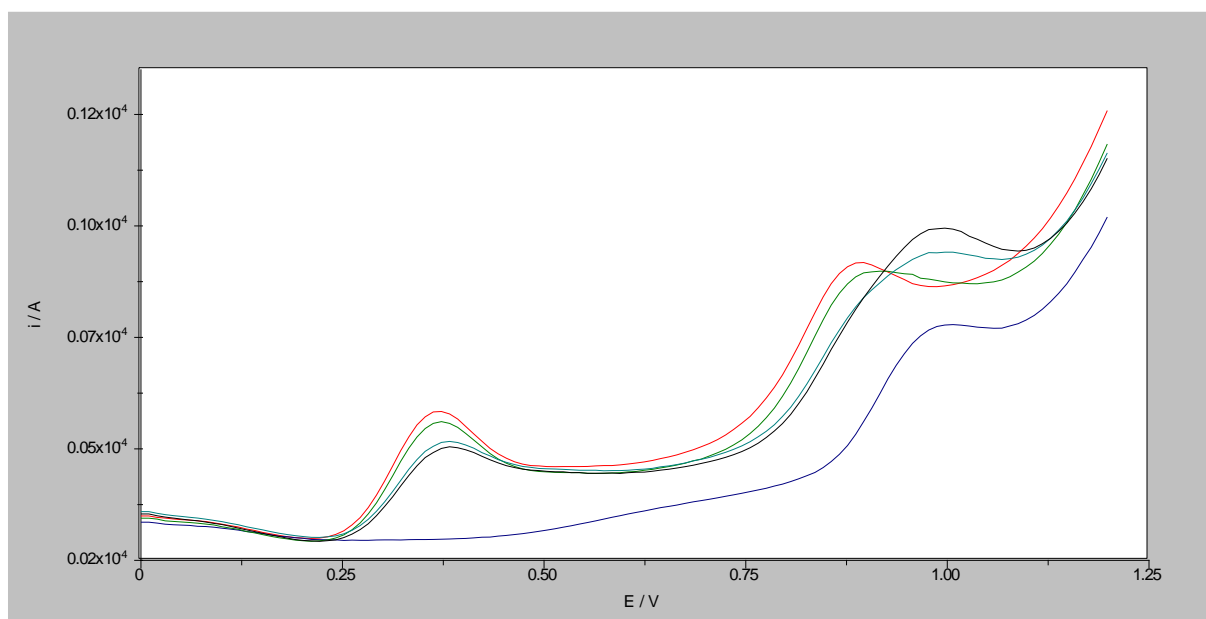
Slika 17. Pravokutnovalni voltamogrami otopine mesalazina koncentracije  $2,5 \times 10^{-5}$  M i folne kiseline koncentracije  $5 \times 10^{-5}$  M (crveno) i iste otopine s dodanim sulfasalazinom u koncentracijama  $1,25 \times 10^{-5}$  M (zeleno),  $2,5 \times 10^{-5}$  M (tirkizno),  $5,0 \times 10^{-5}$  M (plavo)

Na slici 18. prikazani su snimljeni pravokutnovalni voltamogrami smjese mesalazina i folne kiseline prije i poslije dodatka dinatrijeve soli olsalazina u različitim koncentracijama. Nisu primijećene interferencije na strujni vrh oksidacije mesalazina, dok na strujni vrh oksidacije folne kiseline olsalazin interferira pri koncentraciji  $5 \times 10^{-5}$  M. Novi oksidacijski vrh pri potencijalu 0,55 V odgovara olsalzinu. Iz ovog mjerenja može se zaključiti da bi novorazvijeni senzor bio prikladan i za razvoj metode za simultano određivanje olsalazina i mesalazina.



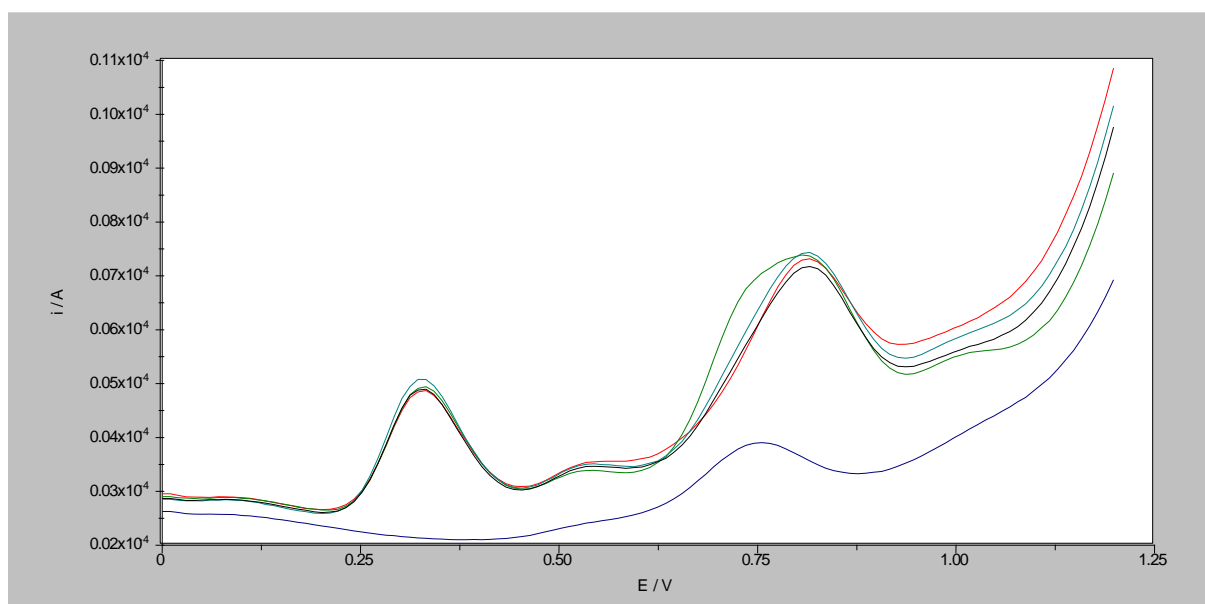
Slika 18. Pravokutnovalni voltamogrami otopine mesalazina koncentracije  $2,5 \times 10^{-5}$  M i folne kiseline koncentracije  $5 \times 10^{-5}$  M (crveno) i iste otopine s dodanom dinatrijevom soli olsalazina koncentracije  $1,25 \times 10^{-5}$  M (zeleno),  $2,5 \times 10^{-5}$  M (tirkizno),  $5,0 \times 10^{-5}$  M (plavo)

Na slici 19. prikazani su snimljeni pravokutnovalni voltamogrami smjese mesalazina i folne kiseline prije i poslije dodatka balsalazida u različitim koncentracijama. Primijećene su interferencije na strujni vrh oksidacije folne kiseline pri koncentraciji  $2,5 \times 10^{-5}$  M, a na strujni vrh oksidacije mesalazina pri koncentraciji  $7,5 \times 10^{-5}$  M. Na istoj slici prikazan je pravokutnovalni voltamogram same otopine balsalazida koncentracije  $5 \times 10^{-5}$  M na kojem je očitan potencijal njegovog oksidacijskog vrha pri 0,998 V.



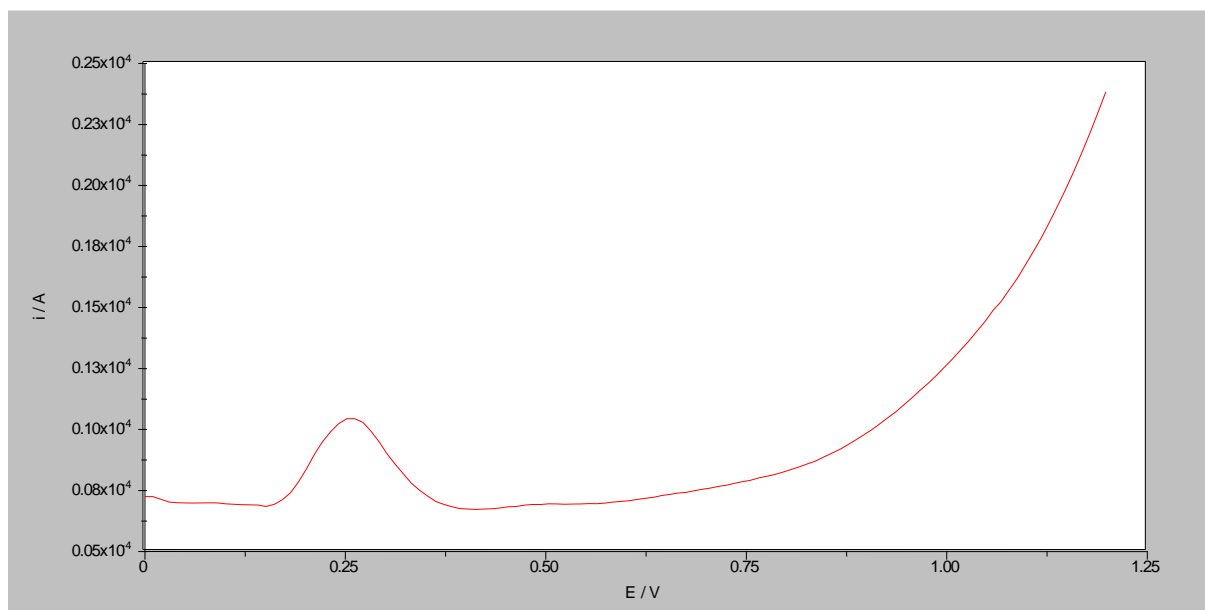
Slika 19. Pravokutnovalni voltamogrami otopine mesalazina koncentracije  $2,5 \times 10^{-5}$  M i folne kiseline koncentracije  $5 \times 10^{-5}$  M (crveno) i iste otopine s dodanim balsalazidom u koncentracijama  $2,5 \times 10^{-5}$  M (zeleno),  $5,0 \times 10^{-5}$  M (crno),  $7,5 \times 10^{-5}$  M (tirkizno), te otopine samog balsalazida koncentracije  $5,0 \times 10^{-5}$  M (plavo)

Na slici 20. prikazani su snimljeni pravokutnovalni voltamogrami smjese mesalazina i folne kiseline prije i poslije dodatka acetiliranog metabolita mesalazina (N-acetilmesalazina) u različitim koncentracijama. N-acetilmesalazin ( $M_r=195,174$ ) nastaje u ljudskom organizmu metabolizmom mesalazina, a može se pronaći u koncentracijama 0,1-2,9  $\mu\text{g/mL}$ , što odgovara molarnim koncentracijama  $5 \times 10^{-7}$ - $1,5 \times 10^{-5}$  M (Pastorini i sur, 2008). Nisu primijećene interferencije na strujni vrh oksidacije mesalazina, a na strujni vrh oksidacije folne kiseline interferencija se javlja pri koncentraciji  $3 \times 10^{-5}$  M. Međutim, u toj koncentraciji se ne javlja u procesu biotransformacije. Na istoj slici prikazan je pravokutnovalni voltamogram otopine samog N-acetilmesalazina na kojem je očitjan potencijal njegovog oksidacijskog vrha pri 0,751 V.

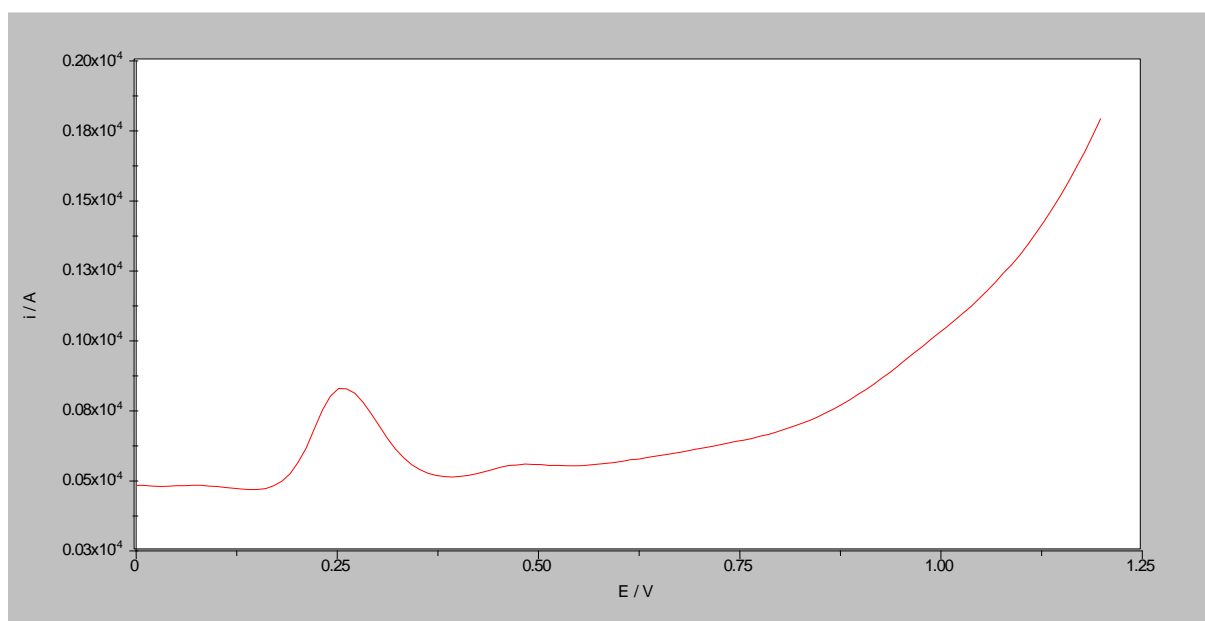


Slika 20. Pravokutnovalni voltamogrami otopine mesalazina koncentracije  $2,5 \times 10^{-5}$  M i folne kiseline koncentracije  $5 \times 10^{-5}$  M (crveno) i iste otopine s dodanim N-acetilmesalazinom u koncentracijama  $1 \times 10^{-5}$  M (tirkizno),  $2 \times 10^{-5}$  M (crno),  $3 \times 10^{-5}$  M (zeleno), te otopine samog N-acetilmesalazina u koncentraciji  $2 \times 10^{-5}$  M (plavo)

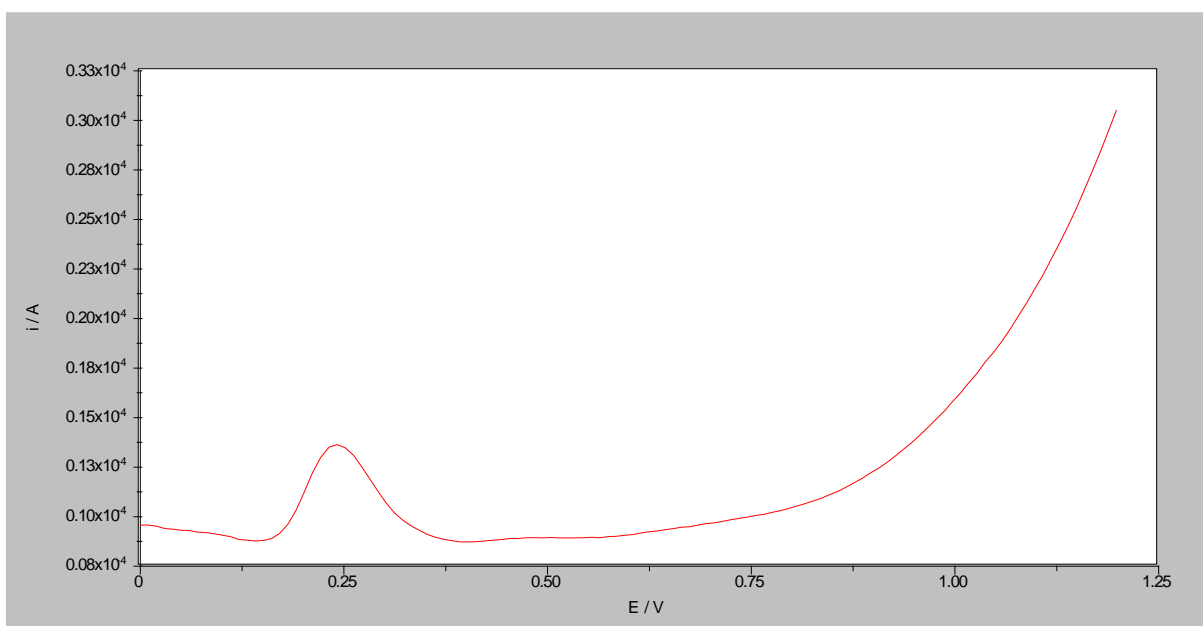
Na iduće tri slike prikazani su pravokutnovalni voltamogrami otopina dobivenih nakon obrade triju različitih tableta mesalazina i ekstrakcije djelatne tvari iz dozirnog oblika: slika 21. Pentasa tablete, slika 22. Salofalk tablete, slika 23. Mesalazin-Kohlpharma. Oksidacijski vrh, mesalazina na istom je potencijalu 0,33 V kao i na voltamogramima gdje je kao uzorak uzeta otopina samog standarda mesalazina. Također, na voltamogramima nema dodatnog oksidacijskog vrha koji bi potjecao od pomoćnih tvari u ispitivanim tabletama.



Slika 21. Pravokutnovalni voltamogram otopine tablete Pentasa u kojoj je koncentracija mesalazina  $2,5 \times 10^{-5}$  M

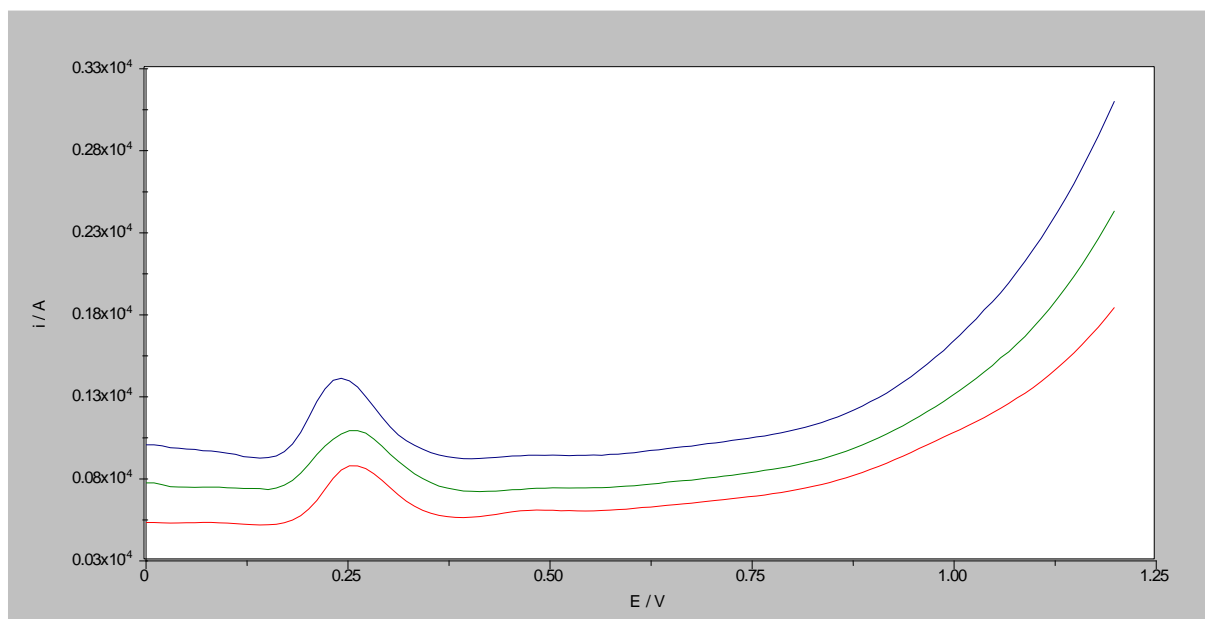


Slika 22. Pravokutnovalni voltamogram otopine tablete Salofalk u kojoj je koncentracija mesalazina  $2,5 \times 10^{-5}$  M



Slika 23. Pravokutnovalni voltamogram otopine tablete Mesalazin-Kohlpharma u kojoj je koncentracija mesalazina  $2,5 \times 10^{-5}$  M

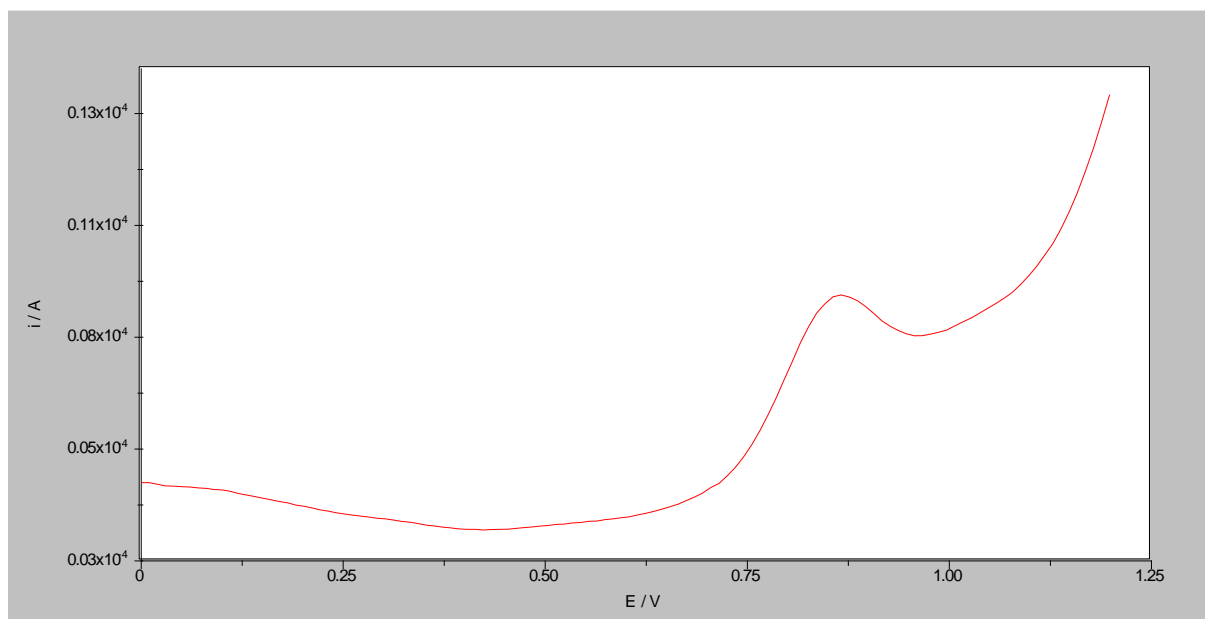
Na slici 24. usporedno su prikazani pravokutnovalni voltamogrami tri različita ljekovita oblika mesalazina, gdje se uočava dobro slaganje oksidacijskih vrhova pri istom. Različite pomoćne tvari korištene u tim formulacijama tableta ne pokazuju interferenciju sa strujnim vrhom oksidacije mesalazina. To pokazuje dobru selektivnost metode za istovremeno određivanje mesalazina i folne kiseline upotrebom novorazvijenog nanosenzora i njegovu potencijalnu primjenu za kvantifikaciju djelatne tvari u uzorcima tableta.



Slika 24. Pravokutnovalni voltamogrami otopina tableta Salofalk (crveno), Pentasa (zeleno) i Mesalazin-Kohlpharma (plavo) u kojima je koncentracija mesalazina  $2,5 \times 10^{-5}$  M



Na slici 25. prikazan je pravokutnovalni voltamogram otopine tablete folne kiseline (Folacin). Oksidacijski vrh folne kiseline na istom je potencijalu 0,81 V kao na voltamogramima gdje je kao uzorak uzeta otopina samog standarda folne kiseline. Također, na voltamogramu nema dodatnih oksidacijskih vrhova koji bi potjecali od pomoćnih tvari iz analiziranih tableta što ukazuje na dobru selektivnost metode za istovremeno određivanje folne kiseline i mesalazina, te i potencijalnu primjenu nanosenzora za određivanje folne kiseline u uzorcima tableta.



Slika 25. Pravokutnovalni voltamogram otopine tablete Folacin u kojoj je koncentracija folne kiseline  $5 \times 10^{-5}$  M

## 5. ZAKLJUČCI

Ispitana je selektivnost novorazvijene elektroanalitičke metode za određivanje mesalazina i folne kiseline na elektrodi od staklastog ugljika modificiranoj ugljikovim nanocjevčicama s vezanim amino skupinama u kitozanu kao biopolimeru u Britton-Robinsonovom puferu pH vrijednosti 6 kako bi se utvrdila njezina moguća primjena u ispitivanju tih lijekova u biološkom uzorku.

Pravokutnovalni voltamogrami smjese mesalazina i folne kiseline ne pokazuju promjenu strujnih vrhova oksidacije mesalazina folne kiseline nakon dodatka anorganskih soli (NaCl, KNO<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O te NaHCO<sub>3</sub>) i glukoze. Interferencije s mesalazinom pokazuju askorbinska kiselina, mokraćna kiselina i dopamin hidroklorid, a s folnom kiselinom pokazuju askorbinska i mokraćna kiselina. Za metodu se može reći da je selektivna jer su interferencije uočene za koncentracije koje su više od onih endogeno očekivanih u biološkom uzorku.

Također se ispitao i utjecaj drugih lijekova korištenih za istu indikaciju (sulfasalazin, olsalazin, balsalazid) kako bi se ispitala moguća prikladnost novog senzora za istovremeno određivanje neke druge kombinacije lijekova te metabolita mesalazina (N-acetilmesalazin) koji nastaje procesom biotransformacije mesalazina i prisutan je u plazmi nakon njegove primjene. Sulfasalazin i balsalazid interferiraju sa strujnim vrhom i folne kiseline i mesalazina u različitim koncentracijama, dok olsalazin interferira samo sa strujnim vrhom folne kiseline, pa se može zaključiti kako bi novorazvijeni senzor bio prikladan za razvoj metode za simultano određivanje olsalazina i mesalazina. Metabolit mesalazina (N-acetilmesalazin) ne pokazuje interferencije u koncentracijama očekivanim u plazmi nakon biotransformacije pa ne bi utjecao na određivanje mesalazina i folne kiseline ovom metodom u biološkom uzorku.

Metoda upotrebom novorazvijenog senzora također je selektivna za kvantitativno određivanje obje djelatne tvari u uzorcima njihovih tableta jer različite pomoćne tvari ne pokazuju interferenciju s oksidacijskim vrhovima mesalazina i folne kiseline.

## 6. LITERATURA

1. Abdolmohammad-Zadeh H, Kohansal S. Determination of mesalamine by spectrofluorometry in human serum after solid-phase extraction with Ni-Al layered double hydroxide as a nanosorbent. *J Braz Chem Soc*, 2012, 23, 473-481.
2. Akobeng AK, Zhang D, Gordon M, MacDonald JK. Oral 5-aminosalicylic acid for maintenance of medically-induced remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*, 2016, 9, CD003715.
3. Alasha Abdalla FA, Elbashir AA. Development and Validation of Spectrophotometric Methods for the Determination of Mesalazine in Pharmaceutical Formulation. *Med chem*, 2014, 4, 361-366.
4. Amidzic R, Brboric J, Cudina O, Vladimirov S. RP-HPLC determination of vitamins B1, B3, B6, folic acid and B12 in multivitamin tablets. *J Serb Chem Soc*, 2005, 70, 1229-1235.
5. Aminosalicylates, <https://www.crohnscolitisfoundation.org/sites/default/files/2019-02/aminosalicylates.pdf>, pristupljeno 06.05.2020.
6. Anastasopoulos P, Mellos T, Spinou M, Tsiaka T, Timotheou-Potamia M. Chemiluminometric and Fluorimetric Determination of Folic Acid. *Anal Lettr*, 2007, 40, 2203-2216.
7. Arvand M, Dehsaraei M. A simple and efficient electrochemical sensor for folic acid determination in human blood plasma based on gold nanoparticles-modified carbon paste electrode, *Mater Sci Eng C*, 2013, 33, 3474-3480.
8. ATK klasifikacija folne kiseline, <https://mediately.co/hr/atcs/B03BB01>, pristupljeno 05.05.2020.
9. ATK klasifikacija mesalazina, <https://mediately.co/hr/atcs/A07EC02>, pristupljeno 06.05.2020.
10. Aurora-Prado MS, Silva CA, Tavares MF, Altria KD. Determination of folic acid in tablets by microemulsion electrokinetic chromatography. *J Chromatogr A*, 2004, 1051, 291-296.
11. Bystrowska B, Nowak J, Brandys J. Validation of a LC method for the determination of 5-aminosalicylic acid and its metabolite in plasma and urine. *J Pharm Biomed Anal*, 2000, 22(2), 341-347.
12. Çakır S, Atayman İ, Çakır O. Simultaneous square-wave voltammetric determination of ribofavin and folic acid in pharmaceutical preparations. *Mikrochim Acta*, 1997, 126, 237-240.

13. Caselunghe MB, Lindeberg J. Biosensor-based determination of folic acid in fortified food. *Food Chem*, 2000, 70, 523-532.
14. Caudill M. Folate bioavailability: implications for establishing dietary recommendations and optimizing status. *Am J Clin Nutr*, 2010, 91, 1455–1460.
15. Chandra BS, Bhogela SS, Shaik M, Vadlamudi CS, Chappa M, Maddirala NS. Simple and sensitive spectrophotometric methods for the analysis of mesalamine in bulk and tablet dosage forms. *Quim Nova*, 2011, 34, 1068-1073.
16. Chaudhary A, Wang J, Prabhu S. Development and validation of a high-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of aspirin and folic acid from nano-particulate systems. *Biomed Chromatogr*, 2010, 24, 919-925.
17. Chungi VS, Rekhi GS, Shargel L. A simple and rapid liquid chromatographic method for the determination of major metabolites of sulfasalazine in biological fluids. *J Pharm Sci*, 1989, 78, 235-238.
18. Cui FL, Fan J, Li W, Fan YC, Hu ZD. Fluorescence spectroscopy studies on 5-aminosalicylic acid and zinc 5-aminosalicylate interaction with human serum albumin. *J Pharm Biomed Anal*, 2004, 34, 189-197.
19. Duvnjak M, Bilić A, Baršić N, Tomašić V, Stojsavljević S. Klasični lijekovi koji se upotrebljavaju u liječenju upalnih bolesti crijeva. *Acta Med Croatica*, 2013, 67, 111-124.
20. Fernandez Alvarez JM, Costa Garcia A, Ordieres MAJ, Blanco PT. Adsorptive stripping voltammetric assay of folic acid in human serum. *J Pharm Biomed Anal*, 1988, 6, 743- 747.
21. Folacin 5 mg tablete,  
<https://mediately.co/hr/drugs/Ne4Wa6082Zm4e8QEXzCzio4ZRNR/folacin-5-mg-tablete>, pristupljeno 05.05.2020.
22. Folic acid, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/135398658#section=Top>, pristupljeno 04.05.2020.
23. Folic acid,  
<https://www.chem.uwec.edu/Webpapers2001/okonekjj/Pages/Introduction/intro.html>, pristupljeno 05.05.2020.
24. Folic acid, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00158>, pristupljeno 04.05.2020.
25. Han J, Chen H, Gao H. Alternating current adsorptive stripping voltammetry in a flow system for the determination of ultratrace amounts of folic acid. *Anal Chim Acta*, 1991, 252, 47- 52.

26. Hannisdal R, Ueland PM, Svoldal A. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of folate and folate catabolites in human serum. *Clin Chem* 2009, 55, 1147-1154.
27. Hauser PC. Electroanalytical methods. U: Instrumental Multi-Element Chemical Analysis. Alfassi ZB, urednik, Dordrecht, Springer, 1998, str. 201-202.
28. Hoegger D, Morier P, Vollet C, Heini D, Reymond F, Rossier JS. Disposable microfluidic ELISA for the rapid determination of folic acid content in food products. *Anal Bioanal Chem*, 2007, 387, 267-275.
29. Hussain FN, Ajjan RA, Moustafa M, Anderson JC, Riley SA. Simple method for the determination of 5-aminosalicylic and N-acetyl-5-aminosalicylic acid in rectal tissue biopsies. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1998, 716, 257-266.
30. Iacucci M, de Silva S, Ghosh S. Mesalazine in inflammatory bowel disease: A trendy topic once again? *Can J Gastroenterol*, 2010, 24, 127-133.
31. Khaleghi F, Irai AE, Sadeghi R, Gupta VK, Wen Y. A Fast Strategy for Determination of Vitamin B<sub>9</sub> in Food and Pharmaceutical Samples Using an Ionic Liquid-Modified Nanostructure Voltammetric Sensor. *Sensors*, 2016, 16, 747.
32. Korolczuk M, Tyszczyk K. Determination of folic acid by adsorptive stripping voltammetry at a lead film electrode. *Electroanalysis*, 2007, 19, 1959-1962.
33. Lanska DJ. Historical aspects of the major neurological vitamin deficiency disorders: the water-soluble B vitamins. U: Handbook of Clinical Neurology. Finger S, Boller F, Tyler KL, urednici, Tomah, Department of Neurology, Veterans Affairs Medical Center, 2010, str. 458.
34. Le Gall AC, van den Berg CMG. Determination of folic acid in sea water using adsorptive cathodic stripping voltammetry. *Anal Chim Acta*, 1993, 282, 459-470.
35. Lebidzińska A, Dabrowska M, Szefer P. Highperformance liquid chromatography method for the determination of folic acid in fortified food products. *Toxicol Mech Methods*, 2008, 18, 463-467.
36. Lianidou ES, Ioannou PC. Simple spectrofluorometric determination of paminobenzoic and p-aminosalicylic acids in biological fluids by use of terbium-sensitized luminescence. *Clin Chem*, 1996, 42, 1659-1665.
37. Lindenbaum J. Drugs and vitamin B12 and folate metabolism. *Curr Concepts Nutr*, 1983, 12, 73-87.

38. Lovander MD, Lyon MD, Parr IV DL, Wang J, Parke B, Leddy J. Review – Electrochemical Properties of 13 Vitamins : A Critical Review and Assessment, *J Electrochem Soc*, 2018, 165, 18-49.
39. Ma C, Dutton SJ, Cipriano LE, Singh S, Parker CE, Nguyen TM, Guizzetti L, Gregor JC, Chande N, Hindryckx P, Feagan BG, Jairath V. Systematic review with meta-analysis: prevalence, risk factors and costs of aminosalicilate use in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 2018, 48, 114-126.
40. Megaloblastična anemija, <https://rarediseases.org/rare-diseases/anemia-megaloblastic/>, pristupljeno 04.05.2020.
41. Merkoçi A, Ambrosi A, de la Escosura-Muñiz A, Pérez-López B, Guix M, Maltez M, Marin S. Nanomaterials for Electroanalysis. U: Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation. Meyers RA, urednik, New York, Wiley, 2010, <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a9077>.
42. Mesalazine, <http://ibdmedicationguide.org/drug/mesalamine>, pristupljeno 06.05.2020.
43. Mesalazine, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4075>, pristupljeno 06.05.2020.
44. Mesalazine, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00244>, pristupljeno 06.05.2020.
45. Mesalazin, <http://www.halmed.hr/Trazilica/>, pristupljeno 06.05.2020.
46. Mitchell HK, Snell EE, Williams RJ. The concentration of "folic acid", *J Am Chem Soc*, 1941, 63, 2284.
47. Nanocjevčice, <https://www.ossila.com/products/multi-walled-carbon-nanotubes?variant=35328123329>, pristupljeno 20.05.2020.
48. Nanomaterijali, <https://echa.europa.eu/hr/regulations/nanomaterials>, pristupljeno 19.05.2020.
49. Nigović B, Behetić S. Elektroanalitika u farmaciji. *Farm Glas*, 2007, 63, 163-175.
50. Nigović B, Šimunić B. Determination of 5-aminosalicylic acid in pharmaceutical formulation by differential pulse voltammetry. *J Pharm Biomed Anal*, 2003, 31, 169-174.
51. Nigović B, Šimunić B, Hocevar S. Voltammetric measurements of aminosalicilate drugs using bismuth film electrode. *Electrochim Acta*, 2009, 54, 5678-5683.
52. Nobilis M, Vybíralová Z, Sládková K, Lísa M, Holcapek M, Kvetina J. High-performance liquid-chromatographic determination of 5-aminosalicylic acid and its metabolites in blood plasma. *J Chromatogr A*, 2006, 1119, 299-308.



53. Orioli M, Marinello C, Cozzi R, Piodi LP, Carini M. LC-MS/MS and FT-IR analyses of stones from a patient with Crohn's disease: a case report. *J Pharm Biomed Anal*, 2004, 35, 263-272.
54. Palumbo G, Bacchi S, Primavera L, Palumbo P, Carlucci G. A validated HPLC method with electrochemical detection for simultaneous assay of 5-aminosalicylic acid and its metabolite in human plasma. *Biomed Chromatogr*, 2005, 19, 350-354.
55. Pastorini E, Locatelli M, Simoni P, Roda G, Roda E, Roda A. Development and validation of a HPLC-ESI-MS/MS method for the determination of 5-aminosalicylic acid and its major metabolite N-acetyl-5-aminosalicylic acid in human plasma, *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*, 2008, 872, 99-106.
56. Pentasa tablete,  
<https://mediately.co/hr/drugs/58TPhBxzBd0I4ln2kLbB8HI6V1d/pentasa-500-mg-tablete-s-produljenim-oslobadanjem>, pristupljeno 06.05.2020.
57. Samadishadlou M, Farshbaf M, Annabi N, Kavetsky T, Khalilov R, Saghfi S, Akbarzadeh A, Mousavi S. Magnetic carbon nanotubes: preparation, physical properties, and application in biomedicine. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 46, 1314-1330.
58. Srivastava AK, Upadhyay SS, Rawool CR, Punde NS, Rajpurohit AS. Voltammetric Techniques for the Analysis of Drugs using Nanomaterials based Chemically Modified Electrodes. *Curr Anal Chem*, 2019, 15, 249-276.
59. Ugljikove nanocjevčice, <https://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=3469>, pristupljeno 20.05.2020.
60. Uslu B, Ozkan SA. Solid Electrodes in Electroanalytical Chemistry: Present Applications and Prospects for High Throughput Screening of Drug Compounds. *Comb Chem High T Scr*, 2007, 10, 495-513.
61. Uysal UD, Oncu-Kaya EM, Tuncel M. Determination of folic acid by ce in various cultivated variety of lentils. *Chromatographia*, 2010, 71, 653-658.
62. Vranešić Bender D. Osobitosti prehrane i suplementacije oboljelih od upalnih bolesti crijeva, *Medix*, 2005, 11, 130-133.
63. Wang J. Analytical Electrochemistry. New York, Wiley-VCH, 2000, str. 72-74.
64. Wang Y, Luo J, Liu J, Li X, Kong Z, Jin H, Cai X. Electrochemical integrated paper-based immunosensor modified with multi-walled carbon nanotubes nanocomposites for point-of-care testing of 17 $\beta$ -estradiol. *Biosens Bioelectron*, 2018, 107, 47-53.

65. Yardim Y, Şentürk Z. Electrochemical Behavior of Folic Acid at A Boron-Doped Diamond Electrode: Its Adsorptive Stripping Voltammetric Determination in Tablets. *Turk J Pharm Sci*, 2014, 11, 87-100.
66. Yu F, Cui M, Chen F, Gao Y, Wei J, Ding Y. Highly sensitive spectrofluorimetric determination of trace amounts of folic acid using a oxytetracycline-terbium(iii) probe. *Anal Lett*, 2009, 42, 178-189.
67. Zhang BT, Zhao L, Lin JM. Determination of folic acid by chemiluminescence based on peroxomonosulfate-cobalt(II) system. *Talanta*, 2008, 74, 1154-1159.

## 7. SAŽETAK / SUMMARY

## 7.1. Sažetak

Folna kiselina pripada skupini B vitamina i važna je tijekom procesa rasta i diobe što se očituje u trudnoći gdje njezinim deficitom u trudnica koje spadaju u rizičnu skupinu može nastupiti spina bifida, odnosno defekt neuralne cijevi novorođenčeta. Važna je i za održavanje eritropoeze te ukoliko serumske razine padnu ispod 2 ng/mL nastupa megaloblastična anemija. Čest je deficit folne kiseline u osoba s upalnim bolestima crijeva.

Mesalazin pripada skupini protuupalnih lijekova – aminosalicilata. Razvijen je nakon spoznaje da je on aktivni dio lijeka sulfasalazina, koji sadrži i sulfapiridinski dio odgovoran za većinu nuspojava. Učinkovit je u blagim do umjerenim oblicima ulceroznog kolitisa, a koristi se i kod Crohnove bolesti iako je njegova učinkovitost u toj indikaciji upitna.

U ovom radu ispitana je selektivnost elektroanalitičke metode za istovremeno određivanje folne kiseline i mesalazina u Britton-Robinsonovom puferu pH vrijednosti 6, primjenom staklaste ugljikove elektrode modificirane nanošenjem 5  $\mu\text{L}$  suspenzije ugljikovih nanocjevčica s vezanim aminoskupinama u 0,5%-tnoj otopini kitozana u 1%-tnoj octenoj kiselini pri frekvenciji 100 Hz, amplitudi pulsa 40 mV i porastu potencijala 10 mV.

Pravokutnovalni voltamogrami smjese mesalazina i folne kiseline ne pokazuju promjenu strujnih vrhova oksidacije mesalazina i folne kiseline nakon dodatka anorganskih soli ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2$  i  $\text{NaHCO}_3$ ) i glukoze. Interferencije s mesalazinom pokazuju askorbinska kiselina i mokraćna kiselina. Međutim, interferencije su uočene za koncentracije koje su više od onih endogeno očekivanih u biološkom uzorku.

Ispitan je utjecaj drugih aminosalicilatnih lijekova i metabolita mesalazina na oksidacijske vrhove folne kiseline i mesalazina. Sulfasalazin i balsalazid interferiraju s oba oksidacijska vrha, dok olsalazin interferira samo sa strujnim vrhom folne kiseline pa se može zaključiti kako bi novorazvijeni senzor bio prikladan za razvoj metode za simultano određivanje mesalazina i olsalazina. Metabolit mesalazina ne pokazuje interferencije u koncentracijama očekivanim u plazmi nakon biotransformacije pa ne bi utjecao na određivanje mesalazina i folne kiseline ovom metodom u biološkom uzorku.

Selektivnost metode na kraju je ispitana i na uzorcima tableta folne kiseline i mesalazina gdje nije pronađena interferencija pomoćnih tvari s oksidacijskim vrhovima niti prisutnost novih oksidacijskih vrhova koji potječu od pomoćnih tvari.

## 7.2. Summary

Folic acid belongs to the group of B vitamins and is important during the process of growth and division, which is manifested in pregnancy where its deficiency in pregnant women who belong to the risk group can occur spina bifida, or neural tube defect of the newborn. It is also important for the maintenance of erythropoiesis, and if serum levels falls below 2 ng/mL, megaloblastic anemia occurs. Folic acid deficiency is common in people with inflammatory bowel disease.

Mesalazine belongs to a group of anti-inflammatory drugs - aminosalicylates. It was developed after the realization that it is the active part of the drug sulfasalazine, which also contains the sulfapyridine part responsible for most side effects. It is effective in mild to moderate forms of ulcerative colitis, and is also used in Crohn's disease, although its effectiveness in this indication is questionable.

In this work, the selectivity of the electroanalytical method for simultaneous determination of folic acid and mesalazine in Britton-Robinson buffer pH 6 was investigated, using a glassy carbon electrode modified by applying a 5  $\mu$ L suspension of carbon nanotubes with bounded amino groups in 0,5% chitosan solution in 1% acetic acid at a frequency of 100 Hz, a pulse amplitude of 40 mV and a potential increase of 10 mV.

Square-wave voltammograms of a mixture of mesalazine and folic acid do not show a change in the peak currents of oxidation of mesalazine and folic acid after the addition of inorganic salts (NaCl, KNO<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub> and NaHCO<sub>3</sub>) and glucose. Interference with mesalazine is shown by ascorbic acid and uric acid. However, interferences were observed for concentrations that were higher than those endogenously expected in the biological sample.

The effect of other aminosalicylate drugs and mesalazine metabolites on the oxidation peaks of folic acid and mesalazine was investigated. Sulfasalazine and balsalazide interfere with both oxidation peaks, while olsalazine interferes only with the folic acid current peak, so it can be concluded that the newly developed sensor would be suitable for developing a method for the simultaneous determination of mesalazine and olsalazine. The mesalazine metabolite does not show interferences in the concentrations expected in plasma after biotransformation, so it would not affect the determination of mesalazine and folic acid by this method in the biological sample.

Selectivity of the method was finally tested on samples of folic acid and mesalazine tablets where no interference of excipients with oxidation peaks nor the presence of new oxidation peaks derived from excipients was found.

## 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

### SELEKTIVNOST ELEKTROANALITIČKE METODE ZA ODREĐIVANJE MESALAZINA I FOLNE KISELINE

Lucija Lacković

#### SAŽETAK

Folna kiselina pripada skupini B vitamina i važna je tijekom procesa rasta i diobe što se očituje u trudnoći gdje njezinim deficitom u trudnica koje spadaju u rizičnu skupinu može nastupiti spina bifida, odnosno defekt neuralne cijevi novorođenčeta. Važna je i za održavanje eritropoeze te ukoliko serumske razine padnu ispod 2 ng/mL nastupa megaloblastična anemija. Čest je deficit folne kiseline u osoba s upalnim bolestima crijeva.

Mesalazin pripada skupini protuupalnih lijekova – aminosalicilata. Razvijen je nakon spoznaje da je on aktivni dio lijeka sulfasalazina, koji sadrži i sulfapiridinski dio odgovoran za većinu nuspojava. Učinkovit je u blagim do umjerenim oblicima ulceroznog kolitisa, a koristi se i kod Crohnove bolesti iako je njegova učinkovitost u toj indikaciji upitna.

U ovom radu ispitana je selektivnost elektroanalitičke metode za istovremeno određivanje folne kiseline i mesalazina u Britton-Robinsonovom puferu pH vrijednosti 6, primjenom staklaste ugljikove elektrode modificirane nanošenjem 5  $\mu$ L suspenzije ugljikovih nanocjevčica s vezanim aminoskupinama u 0,5%-tnoj otopini kitozana u 1%-tnoj octenoj kiselini pri frekvenciji 100 Hz, amplitudi pulsa 40 mV i porastu potencijala 10 mV.

Pravokutnovalni voltamogrami smjese mesalazina i folne kiseline ne pokazuju promjenu strujnih vrhova oksidacije mesalazina i folne kiseline nakon dodatka anorganskih soli (NaCl, KNO<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub> i NaHCO<sub>3</sub>) i glukoze. Interferencije s mesalazinom pokazuju askorbinska kiselina i mokraćna kiselina. Međutim, interferencije su uočene za koncentracije koje su više od onih endogeno očekivanih u biološkom uzorku.

Ispitan je utjecaj drugih aminosalicilatnih lijekova i metabolita mesalazina na oksidacijske vrhove folne kiseline i mesalazina. Sulfasalazin i balsalazid interferiraju s oba oksidacijska vrha, dok olsalazin interferira samo sa strujnim vrhom folne kiseline pa se može zaključiti kako bi novorazvijeni senzor bio prikladan za razvoj metode za simultano određivanje mesalazina i olsalazina. Metabolit mesalazina ne pokazuje interferencije u koncentracijama očekivanim u plazmi nakon biotransformacije pa ne bi utjecao na određivanje mesalazina i folne kiseline ovom metodom u biološkom uzorku.

Selektivnost metode na kraju je ispitana i na uzorcima tableta folne kiseline i mesalazina gdje nije pronađena interferencija pomoćnih tvari s oksidacijskim vrhovima niti prisutnost novih oksidacijskih vrhova koji potječu od pomoćnih tvari.

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

Rad sadrži: 58 stranica, 25 grafičkih prikaza, 3 tablice i 67 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: folna kiselina, mesalazin, pravokutnovalna voltometrija, selektivnost

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. Ana Mornar Turk**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Sandra Jurić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: lipanj 2020.

## 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

### SELECTIVITY OF ELECTROANALYTICAL METHOD FOR DETERMINATION OF MESALAZINE AND FOLIC ACID

Lucija Lacković

#### SUMMARY

Folic acid belongs to the group of B vitamins and is important during the process of growth and division, which is manifested in pregnancy where its deficiency in pregnant women who belong to the risk group can occur spina bifida, or neural tube defect of the newborn. It is also important for the maintenance of erythropoiesis, and if serum levels falls below 2 ng/mL, megaloblastic anemia occurs. Folic acid deficiency is common in people with inflammatory bowel disease.

Mesalazine belongs to a group of anti-inflammatory drugs - aminosalicylates. It was developed after the realization that it is the active part of the drug sulfasalazine, which also contains the sulfapyridine part responsible for most side effects. It is effective in mild to moderate forms of ulcerative colitis, and is also used in Crohn's disease, although its effectiveness in this indication is questionable.

In this work, the selectivity of the electroanalytical method for simultaneous determination of folic acid and mesalazine in Britton-Robinson buffer pH 6 was investigated, using a glassy carbon electrode modified by applying a 5  $\mu$ L suspension of carbon nanotubes with bounded amino groups in 0,5% chitosan solution in 1% acetic acid at a frequency of 100 Hz, a pulse amplitude of 40 mV and a potential increase of 10 mV.

Square-wave voltammograms of a mixture of mesalazine and folic acid do not show a change in the peak currents of oxidation of mesalazine and folic acid after the addition of inorganic salts (NaCl, KNO<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub> and NaHCO<sub>3</sub>) and glucose. Interference with mesalazine is shown by ascorbic acid and uric acid. However, interferences were observed for concentrations that were higher than those endogenously expected in the biological sample.

The effect of other aminosalicylate drugs and mesalazine metabolites on the oxidation peaks of folic acid and mesalazine was investigated. Sulfasalazine and balsalazide interfere with both oxidation peaks, while olsalazine interferes only with the folic acid current peak, so it can be concluded that the newly developed sensor would be suitable for developing a method for the simultaneous determination of mesalazine and olsalazine. The mesalazine metabolite does not show interferences in the concentrations expected in plasma after biotransformation, so it would not affect the determination of mesalazine and folic acid by this method in the biological sample.

Selectivity of the method was finally tested on samples of folic acid and mesalazine tablets where no interference of excipients with oxidation peaks nor the presence of new oxidation peaks derived from excipients was found.

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

Thesis includes: 58 pages, 25 figures, 3 tables and 67 references. Original is in Croatian language.

Keywords: folic acid, mesalazine, square-wave voltammetry, selectivity

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  
**Ana Mornar Turk, Ph.D. Full 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: June 2020.



