

# Razvoj nove elektroanalitičke metode za određivanje pimavanserina

---

Jančec, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:163:389624>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-13**



Repository / Repozitorij:

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



**Ana Jančec**

**Razvoj nove elektroanalitičke metode za  
određivanje pimavanserina**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

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

**Zahvala:**

*Posebnu zahvalu upućujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Biljani Nigović na strpljenju, susretljivosti, prenesenom stručnom znanju te uloženom vremenu i trudu prilikom izrade i pisanja ovog diplomskog rada. Zahvaljujem se i svim ostalim djelatnicima Zavoda za analitiku i kontrolu lijekova na ugodnoj atmosferi i pruženoj pomoći tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada.*

*Hvala svim kolegama i prijateljima koji su mi uljepšali studentski život i uvijek bili velika potpora, a najveće hvala mojoj obitelji na razumijevanju i neizmjerne podršci tijekom studija i života.*

## SADRŽAJ

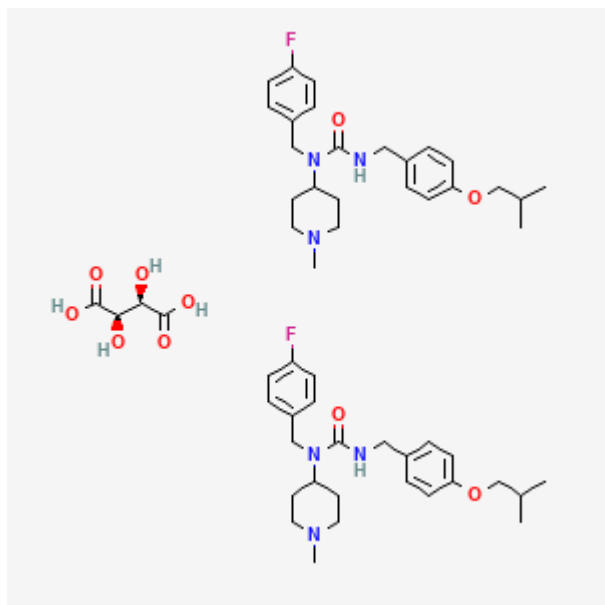
<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. PIMAVANSERIN .....	1
1.2. ELEKTROANALITIČKE METODE .....	3
1.2.1. VOLTAMetriJA .....	4
1.2.1.1. CIKLIČKA VOLTAMetriJA .....	5
1.2.1.2. PRAVOKUTNOVALNA VOLTAMetriJA .....	7
1.2.2. KRUTE ELEKTRODE .....	9
1.2.2.1. ELEKTRODA OD STAKLASTOG UGLJIKa .....	9
1.2.3. NANOMATERIJALI .....	11
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	<b>13</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>14</b>
3.1. KEMIKALIJE .....	14
3.2. RADNI INSTRUMENTI .....	15
3.3. PRIPREMA OTOPINA I SUSPENZIJA .....	16
3.3.1. MATIČNA OTOPINA PIMAVANSERINA .....	16
3.3.2. RADNE OTOPINE PIMAVANSERINA .....	16
3.3.3. OSNOVNI ELEKTROLIT .....	17
3.3.4. PRIPREMA OTOPINA LEVODOPE I ROPINOROL HIDROKLORIDA .....	17
3.3.5. SUSPENZIJE NANOMATERIJALA .....	18
3.4. PRIPREMA ELEKTRODA .....	18
3.5. UVJETI MJERENJA .....	19
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>20</b>
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>35</b>
<b>6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA</b> .....	<b>36</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>38</b>
<b>8. SAŽETAK/SUMMARY</b> .....	<b>41</b>
8.1 SAŽETAK .....	41
8.2 SUMMARY .....	42

## 1. UVOD

### 1.1. PIMAVANSERIN

Pimavanserin je atipičan antipsihotik kojeg je razvila Acadia Pharmaceuticals pod zaštićenim nazivom Nuplazid. Odobren je 2016. godine od strane FDA-a (engl. *Food and Drug Administration*) kao prvi antipsihotik s indikacijom za liječenje halucinacija i deluzija u psihozama povezanih s Parkinsonovom bolešću ([www.fda.gov](http://www.fda.gov)).

Gledano s fizikalno-kemijskog aspekta pimavanserin (1-[(4-fluorofenil)metil]-1-(1-metilpiperidin-4-il)-3-[[4-(2-metilpropoksi)fenil]metil]urea) je krutina, bijele boje bez mirisa. Molekulska formula spoja je  $C_{25}H_{34}FN_3O_2$ , a molekulska masa iznosi 427,55. Nuplazid sadržava pimavanserin u obliku soli, pimavanserin tartarata koji je dobro topljiv u vodi (Slika 1.). Molekulska formula soli je  $(C_{25}H_{34}FN_3O_2)_2 \cdot C_4H_6O_6$ , a molekulska masa 1005,20 ([pubchem.ncbi.nlm.nih.gov](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)).



**Slika 1.** Kemijska struktura pimavanserin tartarata (preuzeto s [pubchem.ncbi.nlm.nih.gov](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov), uz dopuštenje Pubchem-a)

Nuplazid je na tržištu dostupan u obliku kapsula koje sadrže 34 mg ili tableta s 10 mg pimavanserina. Primjenjuje se oralno, a preporučena dnevna doza je 34 mg i nema titracije doze. Može se uzeti sa ili bez hrane ([www.nuplazid.com](http://www.nuplazid.com)). Pimavanserin pokazuje farmakokinetiku proporcionalnu dozi nakon pojedinačnih oralnih doza od 17 do 255 mg. U visokom postotku se veže za proteine plazme (~95%). Pimavanserin i njegov glavni aktivni N-

demetilirani metabolit AC-279 maksimalnu koncentraciju u plazmi postižu za šest sati, a vrijeme poluživota u plazmi iznosi ~57 sati za pimavanserin te ~200 sati za AC-279 (Cruz MP, 2017). Lijek se metabolizira pretežno citokromom P450, a najznačajniji su CYP3A4 i CYP3A5. Preporučena doza pimavanserina uz jake inhibitore CYP3A4 (npr. ketokonazol) je 10 mg, a kod primjene s jakim induktorima CYP3A4 (npr. rifampicin) treba pratiti pacijenta zbog mogućeg smanjenja učinkovitosti i prema potrebi povećati dozu. Ovaj lijek sadrži *black boxing* tzv. crnu kutiju koja upozorava da pimavanserin povećava rizik od smrtnosti kod starijih bolesnika s psihozom povezanom s demencijom. Pimavanserin produljuje QT interval pa njegovu primjenu treba izbjegavati u bolesnika kod kojih je prisutna prolongacija QT intervala ili s drugim lijekovima koji produljuju QT interval (npr. amiodaron). Učestale nuspojave, tj. one s učestalošću većom od 5% su periferni edem i konfuzija, a kao rjeđe nuspojave pojavljuju se mučnina, halucinacije i poremećaji hoda ([www.nuplazid.com](http://www.nuplazid.com)).

Mehanizam djelovanja pimavanserina je kombinacija inverznog agonističkog i antagonističkog djelovanja na serotoninske 2A receptore (5-HT<sub>2A</sub>), a u manjoj mjeri i na 5-HT<sub>2C</sub> receptore. Tijekom kliničkih ispitivanja nije pokazao značajan afinitet vezanja za dopaminske (uključujući D<sub>2</sub>), histaminske, muskarinske ili adrenergičke receptore (Cruz, 2017). Zbog takvog djelovanja nema motoričkih nuspojava, a ima dobar sigurnosni profil, što zajedno s farmakološkim učinkom daje veliki potencijal za liječenje psihotičnih simptoma u Parkinsonovoj bolesti (Hacksell i sur., 2014).

Parkinsonova bolest je kronična bolest koju karakteriziraju degenerativne promjene u području mozga poznatome kao crna tvar (*substantia nigra*) koja proizvodi dopamin. Zbog nedostatka dopamina javljaju se simptomi kao što su tremor, bradikinezija, ukočenost ([www.plivamed.net](http://www.plivamed.net)). Uz motoričke nuspojave javljaju se i one nemotoričke. Često se javljaju konfuzna i delirantna stanja, panične atake, psihoza uz paranoidne manifestacije, halucinacije, poremećaji sna, noćno mokrenje, seksualna disfunkcija itd. Drugi atipični antipsihotici poput klozapina pokazali su učinkovitost, ali je utvrđeno da pogoršavaju motoričke simptome pacijenata pa nemaju odobrenje za ovu indikaciju (Friedman, 2014).

## 1.2 ELEKTROANALITIČKE METODE

Elektroanaliza je analitička tehnika koja se sve više koristi u farmaceutskoj industriji, ali i u biomedicini, analitičkoj kemiji tj. kontroli kvalitete industrijskih proizvoda. Koristi se kao alternativna ili komplementarna tehnika spektrofotometrijskim ili separacijskim tehnikama zbog svoje visoke osjetljivosti, brzine analize, smanjene potrošnje otapala i uzorka te nižih cijena troškova analiza u usporedbi s ostalim tehnikama (Ozkan i Uslu, 2011).

Elektroanalitičke metode čine skupinu analitičkih metoda koje daju podatke o koncentraciji, aktivitetu ili nekom drugom termodinamičkom svojstvu određivane molekulske vrste u ovisnosti o električnom naponu, struji ili naboju (Wang, 2000). Te tehnike uz visoku osjetljivost, točnost, preciznost, selektivnost, karakterizira i jednostavnost jer najčešće nije potrebno provoditi postupke odjeljivanja. No, selektivnost ovisi o rasponu potencijala elektroaktivnih tvari (Behetić i Nigović, 2007).

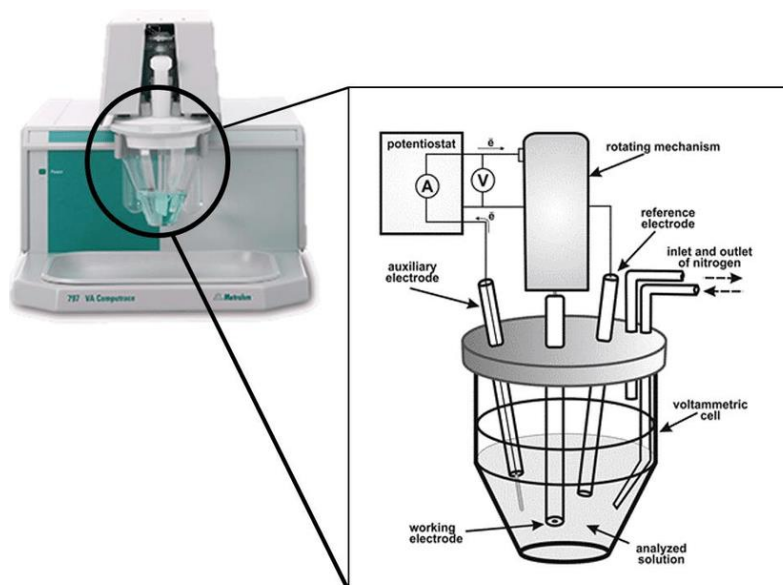
Ovisno o signalu pobude, koji uzrokuje elektrokemijsku reakciju na radnoj elektrodi i iz koje se dobiva željeni analitički podatak o ispitivanom uzorku, dijele se na: potenciometriju, voltometriju, kronoamperometriju, elektrogravimetriju, kronopotenciometriju, kulometriju i konduktometriju.

U farmaciji su značajne elektroanalitičke tehnike kojima se može razjasniti mehanizam djelovanja i biotransformacija lijekova te interakcije lijekova s DNA, metalnim ionima ili proteinima. Također, upotrebljavaju se u elektroorganskoj sintezi farmakološki zanimljivih molekula, u ispitivanju učinka molekule korelacijom redoks potencijala i aktivnosti te za identifikaciju i određivanje ljekovitih tvari u ljekovitim oblicima i biološkim tekućinama (Behetić i Nigović, 2007). Neke elektroanalitičke metode primjenjuju se i u Europskoj farmakopeji. Primjerice, čistoća farmaceutske vode određuje se konduktometrijski, mjerenjem njezine vodljivosti (European Pharmacopoeia 10th ed., 2021). Neke elektrokemijske senzore koristimo u rutinskim analizama, a najznačajniji je amperometrijski senzor glukoze kojeg dijabetičari svakodnevno koriste kod određivanja glukoze u krvi. Ovaj tip biosenzora na bazi enzima, glukoza oksidaze, funkcionira tako da se glukoza enzimom prevodi u glukonsku kiselinu uz nastajanje vodikovog peroksida, koji se zatim na anodi oksidira te se prati prijenos elektrona koji je proporcionalan količini glukoze u krvi (Yoo i Lee, 2010).

### 1.2.1. VOLTAMETRIJA

1922. godine, otkrićem polarografije od strane češkog kemičara Jaroslava Heyrovskog, započeo je razvoj voltametrije. Zajednička karakteristika svih voltametrijskih tehnika je praćenje struje radne elektrode nastale kontinuiranim mijenjanjem njezinog potencijala. Analitičke prednosti voltametrijskih metoda uključuju vrlo dobru osjetljivost s velikim linearnim rasponom koncentracija za anorganske i organske tvari u vodenim i nevodenim medijima ( $10^{-12}$  -  $10^{-1}$  M). Primjenjuju se u kvantitativnoj analizi tvari, određivanju kinetike i mehanizma redoks reakcija te detekciji eluiranih analita u tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti (HPLC) (Kounaves, 1997).

Osnovne komponente suvremenog voltametrijskog instrumenta su potenciostat, računalo i elektrokemijski članak (Slika 2.). Uloga potenciostata je nametanje potencijala te mjerenje jakosti struje. Elektrokemijski članak sastoji se od uzorka otopljenog u otapalu, ionskog elektrolita, koji povećava vodljivost otopine, i najčešće tri elektrode: referentne (engl. *reference*), pomoćne ili protuelektrode (engl. *counter*) te radne (engl. *working*) elektrode (Kounaves, 1997).



**Slika 2.** Voltametrijski instrument; Metrohm Model VA 797 (preuzeto iz rada Mohamed i sur., 2019, uz dopuštenje autora)

Potencijal se mjeri između radne i referentne elektrode i tako se kontrolira signal pobude. Struja se mjeri između radne i protuelektrode, mjerenjem signala odziva sustava (Nigović i Behetić,

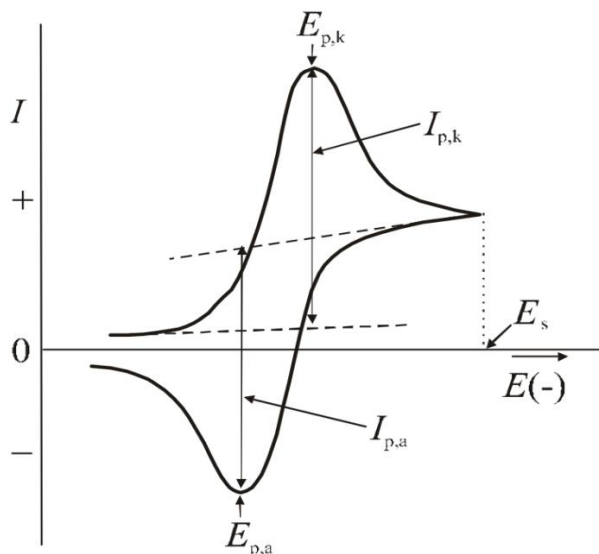


2007). Na radnoj elektrodi se odvija redoks reakcija, za reakcije redukcije najčešće se koristi živina elektroda, dok se za reakcije oksidacije upotrebljavaju čvrste elektrode, primjerice platinska, zlatna ili staklasta ugljikova elektroda. Reproducibilnost mjerenja osigurava se korištenjem elektroda konstante površine. Primjenom malih površina radne elektrode smanjuje se razgradnja analita elektrolizom, a pospješuje polarizacija (Nigović i Behetić, 2007). Nedostatci čvrstih elektroda su lako onečišćenje radne elektrode, no zbog manjeg prenapona vodika na tim elektrodama možemo ih, u vodenim otopinama, primijeniti do znatno nižeg negativnoga potencijala nego živine elektrode (Piljac, 2010).

#### 1.2.1.1. CIKLIČKA VOLTAMETRIJA

Ciklička voltametrija (engl. *cyclic voltammetry*, CV) koristi se za proučavanje redoks procesa, za razumijevanje međuprodukta reakcije i za dobivanje informacija o stabilnosti produkta reakcija (Kounaves, 1997). Primjenjuje se u istraživanju apsorpcijskih procesa i kemijskih reakcija povezanih s prijenosom elektrona, no rijetko se koristi za kvantitativne analize (Nigović i Behetić, 2007). Vrlo često elektrokemijska studija započinje korištenjem cikličke voltametrije.

Ciklička voltametrija koristi sustav s tri elektrode (radne, referentne i pomoćne) uronjenih u otopinu analita i elektrolita. Potenciostat se koristi za linearno mijenjanje potencijala između radne i referentne elektrode sve dok ne dosegne unaprijed određenu vrijednost, u kojoj mijenja smjer promjene potencijala. Pritom mjeri struju između radne i pomoćne elektrode. Rezultat analize je ciklički voltamogram koji prikazuje ovisnost struje o potencijalu, a važni parametri cikličke voltametrije su potencijali vrha redukcije ( $E_{pc}$ ) i oksidacije ( $E_{pa}$ ) te vršne jakosti struje ( $i_{pc}$  i  $i_{pa}$ ) (Slika 3.). Mjerena jakost struje raste kako se potencijal približava redoks potencijalu analita. Promjenom potencijala preko specifičnog potencijala analita nastaje strujni vrh zbog promjene oksidacijskog stanja analita. Također pada i mjerena jakost struje zbog smanjene koncentracije analita u blizini elektrode. Povratkom potencijala na početnu vrijednost dolazi do oksidacije/redukcije produkata nastalih u prvoj polovici ciklusa (Elgrishi i sur., 2017).



**Slika 3.** Prikaz grafičke obrade i određivanja potencijala i vršnih jakosti struja na cikličkom voltamogramu reverzibilnog redoks procesa (preuzeto iz rada Piljac, 2010., uz dopuštenje autora)

Ukoliko je proces prijenosa elektrona puno brži od ostalih procesa u otopini, primjerice difuzije, reakcija će biti reverzibilna. Broj izmijenjenih elektrona se može odrediti iz razlike potencijala vrhova prema jednadžbi (1) (Kounaves, 1997). Potencijal vrha je karakteristična vrijednost za pojedini spoj, a korelira s njegovim afinitetom za primanjem ili davanjem elektrona.

$$\Delta E_p = |E_{pa} - E_{pc}| = 2,303 \frac{RT}{nF} \quad (1)$$

$\Delta E_p$  je razlika između potencijala vrha oksidacije i redukcije,  $R$  opća plinska konstanta koja iznosi  $8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ,  $T$  apsolutna temperatura (u kelvinima),  $n$  broj izmijenjenih elektrona, a  $F$  Faradayeva konstanta koja iznosi  $96\,485,34 \text{ C mol}^{-1}$ . Pri uvjetima od  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  za redoks reakciju prijenosa  $n$  elektrona  $\Delta E_p$  iznosi  $0,0592/n \text{ V}$ , odnosno  $60 \text{ mV}$  po jednom elektronu (Nigović i Behetić, 2007).

Randles-Ševčikova jednadžba (2) stavlja u odnos koncentraciju i jakost struje, a iz nje slijedi da je vršna struja voltametrijskog vala ( $i_p$ ) izravno proporcionalna koncentraciji elektroaktivne vrste u otopini. Isto vrijedi za struju u bilo kojoj točki voltamograma.

$$i_p = (2,99 \times 10^5) n^{\frac{3}{2}} A c_0 D^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}} \quad (2)$$

Ova jednadžba predstavlja temelj za primjenu voltametrije u kvantitativnoj elektrokemijskoj analizi (Piljac, 2010).  $i_p$  je vršna jakost struje izražena u amperima (A),  $A$  površina radne elektrode u  $\text{cm}^2$ ,  $D$  difuzijski koeficijent  $\text{cm}^2\text{s}^{-1}$ ,  $c_0$  koncentracija analita u  $\text{molcm}^{-3}$ ,  $v$  brzina promjene u  $\text{Vs}^{-1}$ , a  $n$  broj elektrona.

Kada je redoks proces ireverzibilan, na cikličkom voltamogramu nedostaje povratni pik, sporija je izmjena elektrona, pikovi su razdvojeni i manji, a  $E_p$  se pomiče prema negativnijim (proces redukcije) ili pozitivnijim (proces oksidacije) vrijednostima s povećanjem brzine promjene potencijala. Vršna jakost struje definirana izrazom (3).

$$i_p = (2,99 \times 10^5) n (\alpha n_a)^{\frac{1}{2}} A c_0 D_0^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}} \quad (3)$$

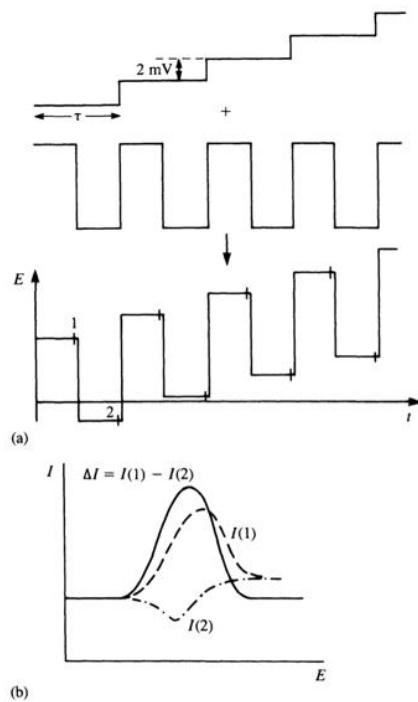
Svi parametri jednaki su kao i u Randles-Ševčikovoj jednadžbi osim:  $n_a$  broj elektrona u koraku prijenosa naboja i  $\alpha$  koeficijent prijelaza (Piljac, 2010). Iz jednadžbe se zaključuje kako je vršna jakost struje i dalje proporcionalna koncentraciji.

Danas se ciklička voltametrija primjenjuje za proučavanje interakcije derivata 5-fluorouracila i DNA (Zahed i sur., 2018), *in vivo* detekciju dopamina (Jackson i sur., 1995), određivanje irinotekana (Nprouzi i sur., 2009) pa i za određivanje polifenola, slobodnog sumporovog dioksida u analizi vina (Kilmartin i Makhotkina, 2010), i drugo.

#### 1.2.1.2. PRAVOKUTNOVALNA VOLTAMETRIJA

Pravokutnovalna voltametrija (engl. *square wave voltammetry*, SWV) je jedna od najbržih i najosjetljivijih tehnika pulsne voltametrije, a njezine granice detekcije mogu se usporediti s onim kod kromatografskih i spektroskopskih tehnika (Simões i Xavier, 2017). Frekvencije od 1 do 100 ciklusa u sekundi dopuštaju korištenje izrazito brzih promjena potencijala, stoga cijeli voltamogram može biti snimljen za samo nekoliko sekundi (Nigović i Behetić, 2007). U pravokutnovalnoj tehnici primjenjuje se signal pobude koji se sastoji od osnovnog stepenastog napona na koji se superponira izmjenični pravokutni puls (Slika 4.a). Struja se mjeri dva put

tijekom jednog ciklusa, pri kraju trajanja pozitivne ( $I_1$ ) i negativne ( $I_2$ ) poluperiode izmjeničnog pravokutnog pulsa. Jakost struje ( $\Delta I$ ) na voltamogramu prikazana je kao razlika struja negativne i pozitivne poluperiode izmjeničnoga pravokutnog signala pobude za svaki ciklus pobude (Piljac, 2010). Potencijal maksimuma struje koristi se za potvrdu identiteta analita, a visina vrha struje proporcionalna je koncentraciji ispitivanog analita (Kounaves, 1997), (Slika 4.b).



**Slika 4.** a) Signal pobude dobiven dodavanjem pravokutnovalnih pulseva na stepeničasti signal potencijala ( $E_{\text{step}}=2 \text{ mV}$ ) b) Shematski pravokutnovalni voltamogram reverzibilnog redoks procesa (preuzeto iz rada Brett i Brett, 1993., uz dopuštenje autora)

Zbog granica detekcije reda veličine od  $10^{-10} \text{ M}$ , prigodne su za određivanje lijekovitih tvari u farmaceutskim i biološkim uzorcima (Simões i Xavier, 2017).

## 1.2.2. KRUTE ELEKTRODE

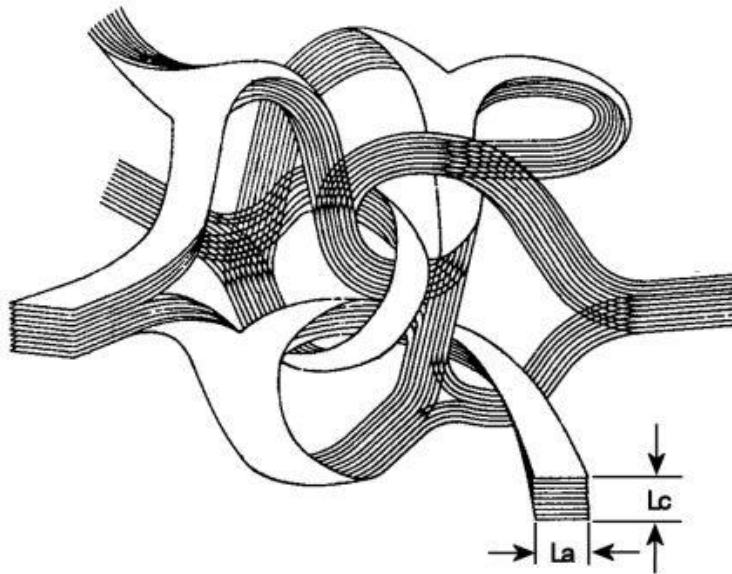
Radne elektrode u voltometriji su različite geometrije i materijala (u rasponu od malih kapljica žive do ravnih diskova platine) te male površine koja pospješuje polarizaciju i smanjuje razgradnju analita elektrolizom. Nekada su u analitičkoj praksi bile najkorištenije živine elektrode, ponajviše *živina kap elektroda* (Piljac, 2010). Unatoč gotovo idealnoj reproducibilnosti i obnovljivosti, ograničeni anodni raspon potencijala radne površine živinih elektroda smanjuje njihovu primjenjivost u analitici tvari koje oksidiraju. Danas je sve veći interes za krute elektrode, koje se zbog svog proširenog raspona potencijala rabe za proučavanje oksidacijskih procesa. Najkorištenije su elektrode od staklastog ugljika, dijamantna elektroda s primjesama bora, ugljikova, platinska, zlatna (Nigović i Behetić, 2007). Dodatne pozitivne strane krutih elektroda su njihova netoksičnost, stabilnost, mogućnost korištenja kod visokih temperatura i u velikom rasponu tlaka. No, nedostaci čvrstih elektroda su slaba reprodukcija radne površine i lako onečišćenje kod korištenja. Stoga, kako bi se zadovoljila reproducibilnost i povećao voltometrijski odgovor analita potrebna je predobrada tj. poliranje elektrode. Najčešće se za metalne elektrode koristi mehaničko poliranje, dok se za aktivaciju ugljikove elektrode primjenjuju razni elektrokemijski, kemijski ili termalni postupci (Wang, 2000).

### 1.2.2.1. ELEKTRODA OD STAKLASTOG UGLJIKA

Ugljikovi materijali u elektrodama imaju osnovnu strukturu šesteročlanog aromatskog prstena i  $sp^2$  hibridizaciju, razlikuju se u relativnoj gustoći na svojim površinama, a kao posljedica toga javlja se i razlika u kinetici prijenosa elektrona. Najpopularnije elektrode u primjeni sadrže staklasti ugljik, ugljikovu pastu, ugljikova vlakna, grafit impregniran voskom i druge (Wang, 2000).

Elektroda od staklastog ugljika (engl. *glassy carbon electrode*, GCE) se široko koristi u biomedicini zbog odličnih mehaničkih i električnih svojstava, dobre provodljivosti, širokog raspona potencijala, kemijske inertnosti i reproducibilnih rezultata mjerenja. Materijal se priprema zagrijavanjem predmodelirane polimerne smole na visokim temperaturama u inertnoj atmosferi (Wang, 2000). Dobivena struktura staklastog ugljika, tj. tanke i smotane trakice

poprečno povezanih slojeva grafita imaju visoku gustoću i nisku poroznost, što čini površinu elektrode glatkom nakon poliranja (Slika 5.).



**Slika 5.** Struktura staklastog ugljika (preuzeto iz rada Jenkins i Kawamura, 1971., uz dopuštenje autora)

Kemijski modificirane elektrode mogu se prirediti mehanizmom ireverzibilne adsorpcije, kemijskim vezanjem površinskog monosloja ili prekrivanjem površine filmom polimernog materijala. Polimeri koji su polielektroliti djeluju na površini elektrode mehanizmom ionske izmjene. Najtipičniji primjeri polimera su Nafion, polistiren sulfonat i protonirani poli(vinilpiridin) (Piljac, 2010).

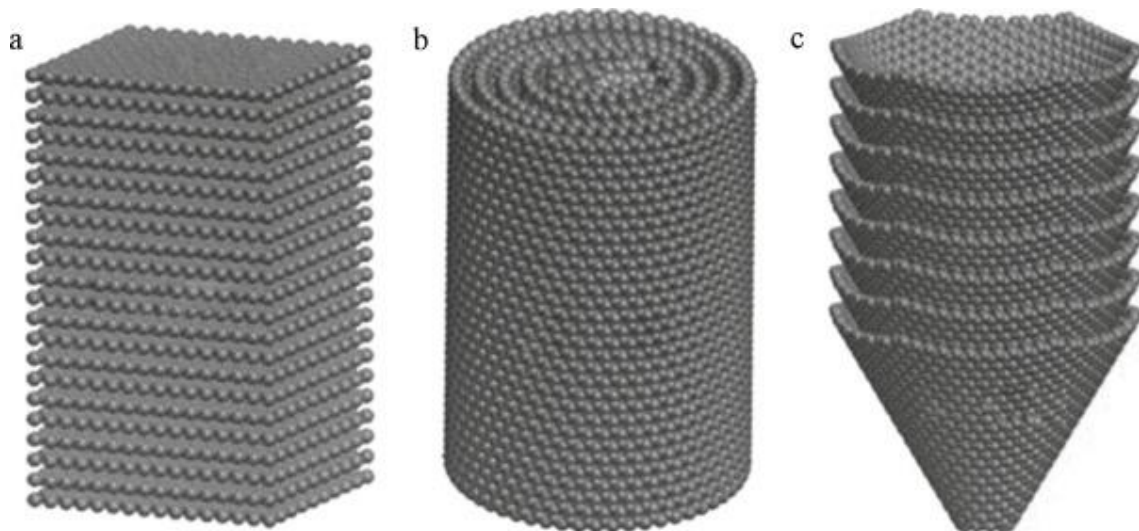
Danas se u elektrokemiji sve više rabi modifikacija površine elektroda s fino dispergiranim tvarima (ugljik, metali, anorganski spojevi), tzv. *nanočesticama*.

### 1.2.3. NANOMATERIJALI

Pod pojmom nanomaterijali smatraju se materijali čije su strukturne komponente manje od 1  $\mu\text{m}$  u barem jednoj dimenziji (Madkour, 2019). Njihovom uporabom smanjuju se dimenzije aktivnih površina voltametrijskih senzora, čime se postiže minijaturizacija mjernih naprava. U mjerenjima dolazi do izražaja velika površina nanočestica, njihova dobra električna vodljivost, katalitičko djelovanje te utjecaj na prenapon elektrode. Tako se poboljšavaju parametri analitičke metode poput osjetljivosti, reproducibilnosti i selektivnosti (Piljac, 2010).

Grafen je alotropska modifikacija ugljika koja se sastoji od ugljikovih atoma raspoređenih u dvodimenzionalnu heksagonalnu strukturu. Vrlo je tanak, ali i iznimno čvrst materijal, a može podnijeti gustoću električne struje šest redova veličine veću od bakra. Pokazuje veliku toplinsku provodnost i nepropustan je za plinove (Geim, 2009). Proizvodi se u raznim oblicima, najčešći su mono-, dvo- i troslojevi grafena, dok je grafen oksid (monosloj grafena s visokim sadržajem kisika u obliku karboksilnih, hidroksilnih i epoksidnih skupina). Grafen nanopločice sastoje se od mnogo slojeva grafena debljine najčešće od 2 do 10 nm, a prikazane su na slici 6a. Ugljikove nanocjevčice (Slika 6b) su koncentrični valjci grafena promjera nekoliko nanometara međusobno povezani šesterokutnim prstenima ugljikovih atoma. Dijeleg se na SWNT, engl. *single-walled carbon nanotubes* tj. jedan koncentrični valjak i MWNT, engl. *multiple-walled carbon nanotubes*, nekoliko koncentričnih valjaka) (Piljac, 2010). Još jedan od oblika grafena su ugljikova nanovlakna prikazana na slici 6c. To su linearni,  $\text{sp}^2$ -hibridizirani diskontinuirani filamenti u kojima se slojevi grafena gotovo nikad ne poklapaju s osi filameta (Poveda i Gupta, 2016). Svakodnevno se osmišljaju novi oblici grafena kako bi rezultati analize bili što točniji i precizniji.

Za voltametrijska mjerenja grafen se najčešće suspendira u etanolnoj otopini Nafiona (sulfoniranog kopolimera perfluoriranog vinileter komonomera i tetrafluoroetilena). Suspenzija se nanosi na elektrodu gdje stajanjem na atmosferskom zraku etanol ispari, a ostaje tanak sloj grafena i Nafiona.



**Slika 6.** a) Struktura grafen nanopločica b) Struktura ugljikovih nanocjevčica c) Struktura ugljikovih nanovlakna (preuzeto iz rada Amini i sur., 2020., uz dopuštenje autora)



## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Liječenje Parkinsonove bolesti usmjereno je na kontrolu motoričkih i nemotoričkih simptoma s ciljem poboljšanja kvalitete života bolesnika. Zlatni standard u liječenju bolesti je levodopa, no nakon 5-10 godina kod vrlo velikog broja bolesnika dolazi do smanjenja učinkovitosti lijeka, razvoja motornih fluktuacija, diskinezija. Također progresijom bolesti nemotorički simptomi postaju sve izraženiji, a halucinacije i psihoze koje se javljaju tijekom liječenja Parkinsonove bolesti značajno umanjuju kvalitetu života bolesnika.

Pimavanserin je prvi antipsihotik s indikacijom za liječenje halucinacija i deluzija u psihozama povezanih s Parkinsonovom bolešću. Novi je lijek pa još uvijek nema široku primjenu, a ni dostatan broj razvijenih analitičkih metoda za njegovo određivanje. HPLC je najčešće korišten kao analitička tehnika za određivanje pimavanserina (Babić i sur., 2021) i njegove farmakokinetike (Wang i sur., 2017).

Cilj ovog rada bio je postaviti osnovu za razvoj nove elektroanalitičke metode za određivanje pimavanserina utvrđivanjem njegovih elektrokemijskih svojstava cikličkom i pravokutnovalnom voltametrijom. Voltometrija kao tehnika, izabrana je zbog mogućnosti oksidacije dušika u piperidinskom prstenu i ureidnom djelu molekule pimavanserina. Uz to, voltometrija ima brojne prednosti u usporedbi s ostalim analitičkim tehnikama poput brzine izvođenja, niske cijene analize te mogućnost određivanja niskih koncentracija analita, primjerice u farmaceutskim oblicima i biološkim uzorcima. Upotrebom elektrode od staklastog ugljika, kao i njezine modificirane površine raznim nanomaterijalima, ispitivao se voltometrijski odgovor pimavanserina na različitim radnim površinama u puferima različitih pH vrijednosti kako bi se definirali optimalni parametri za razvoj metode. Dodatno, proučavala se i adsorpcija lijeka na modificiranim površinama elektrode te mogućnost simultane analize pimavanserina s levodopom i ropinorolom uspoređujući vrijednosti njihovih potencijala oksidacije.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. KEMIKALIJE

U izradi diplomskog rada korištene su sljedeće kemikalije:

1. Borna kiselina,  $H_3BO_3$  (Sigma-Aldrich)
2. Dijamantni nanoprah (US Research Nanomaterials, Inc.)
3. Etanol 96 % (Kefo)
4. Fosforna kiselina,  $H_3PO_4$  (Alkaloid Skoplje)
5. Grafen nanopločice (US Research Nanomaterials, Inc.)
6. Grafen oksid (US Research Nanomaterials, Inc.)
7. Levodopa (Fluka)
8. Nafion 5% (Sigma-Aldrich)
9. Natrijev hidroksid, NaOH (Sigma-Aldrich)
10. Očetna kiselina,  $CH_3COOH$  (Panreac)
11. Pimavanserin (Pliva)
12. Ropinorol (Pliva)
13. Sumporna kiselina,  $H_2SO_4$  (VWR Chemicals)
14. Ugljikova nanovlakna (US Research Nanomaterials, Inc.)
15. Ultračista voda
16. Višeslojne grafitizirane ugljikove nanocjevčice (US Research Nanomaterials, Inc.)

### 3.2. RADNI INSTRUMENTI

Voltametrijska mjerenja vršena su na uređaju  $\mu$ Autolab potenciostat/galvanostat (Eco Chemie), koji je spojen sa stolnim računalom i upravljani programom GPES 4.9. Voltametrijski uređaj povezan je s elektrokemijskim člankom koji se sastoji od radne, referentne i protuelektrode. Kao radna elektroda korištena je elektroda od staklastog ugljika te modificirane elektrode od staklastog ugljika pripremljene nanošenjem suspenzija različitih nanomaterijala u etanolnoj otopini Nafiona. Preciznije, bile su nanošene suspenzije: grafen oksida, grafen nanopločica, višeslojnih grafitiziranih ugljikovih nanocjevčica, ugljikovih nanovlakana te dijamantnog nanopraha. Kao referentna elektroda korištena je srebro/srebrov klorid (Ag/AgCl) elektroda, a kao protuelektroda platinska (Pt) žica.

Za vaganje uzorka korištena je analitička vaga Mettler Toledo AB-204-S.

Ultrazvučna kupelj Elmasonic S 30H Elma upotrebljavala se čišćenje površine elektrode prije modifikacije površine te za homogenizaciju suspenzija nanomaterijala.

Kod izrade Britton-Robinson pufera, za mjerenje pH-vrijednosti, korišten je pH-metar s kombiniranom staklenom elektrodom (Mettler Toledo) kalibriran uz standardne otopine pufera  $\text{pH}_1 = 2,00 \pm 0,01$ ,  $\text{pH}_2 = 4,00 \pm 0,01$  te  $\text{pH}_3 = 7,00 \pm 0,01$ .

### 3.3. PRIPREMA OTOPINA I SUSPENZIJA

#### 3.3.1. MATIČNA OTOPINA PIMAVANSERINA

Matična otopina pimavanserina koncentracije  $5 \times 10^{-3}$  M priprema se u odmjerne tikvici od 5,0 mL. Stehiometrijskim izračunom dobije se masa pimavanserina od 10,7 mg koja se važe na analitičkoj vagi u praščić i kvantitativno prenosi u odmjernu tikvicu od 5,0 mL. 96%-tnim etanolom ispere se sav pimavanserin s praščića i nadopuni do otprilike polovice volumena tikvice. Tikvica se blago promućka da se analit u potpunosti otopi te se onda nadopuni otapalom (96%-tnim etanolom) do 5,0 mL i promućka. Matična otopina čuva se zatvorena, u hladnjaku pri 4 °C.

#### 3.3.2. RADNE OTOPINE PIMAVANSERINA

Radne otopine pimavanserina u koncentraciji  $1 \times 10^{-4}$  M,  $5 \times 10^{-5}$  M i  $1 \times 10^{-5}$  M pripremaju se neposredno prije voltametrijskog mjerenja. Otopine se pripreme tako da se određeni volumen matične otopine pipetira u odmjernu tikvicu od 20,0 mL te se tikvica nadopuni BR puferom željenog pH ili 0,1 M otopinom  $H_2SO_4$  do oznake. U tablici 1. navedene su koncentracije matične i radnih otopina te volumeni matične otopine koji se pipetiraju.

**Tablica 1.** Izrada radnih otopina pimavanserina

OTOPINA	KONCENTRACIJA OTOPINE (mol/L)	VOLUMEN MATIČNE OTOPINE ( $\mu$ L)
Matična otopina 1	$5 \times 10^{-3}$	/
Radna otopina 1	$1 \times 10^{-4}$	400
Radna otopina 2	$5 \times 10^{-5}$	200
Radna otopina 3	$1 \times 10^{-5}$	40

### 3.3.3. OSNOVNI ELEKTROLIT

#### a) BRITTON-ROBINSON PUFER

Za pripremu Britton-Robinson (BR) pufera koriste se borna kiselina ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), fosforna kiselina ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), octena kiselina ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) te natrijev hidroksid ( $\text{NaOH}$ ). Pripreme se 0,5 M otopine navedenih kiselina i to na sljedeći način:

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

Nadalje, pipetira se po 20,0 mL otopine svake kiseline u odmjernu tikvicu od 250,0 mL te nadopuni ultračistom vodom do oznake čime se dobiva pH pufera 1,9. Željene pH vrijednosti (2, 3, 4, 5, 6, 8) puferskih otopina dobivaju se dodatkom određene količine 0,2 M otopine  $\text{NaOH}$ , priređene na sljedeći način:

- 0,2 M  $\text{NaOH}$  priredi se otapanjem 0,8 g natrijeva hidroksida u odmjernoj tikvici od 100,0 mL te nadopuni ultračistom vodom do oznake

#### b) 0,1 M OTOPINA SUMPORNE KISELINE ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )

- 0,1 M otopina sumporne kiseline priređuje se pipetiranjem 50,0 mL 0,5 M sumporne kiseline u odmjernu tikvicu od 250,0 mL te nadopuni ultračistom vodom do oznake

### 3.3.4. PRIPREMA OTOPINA LEVODOPE I ROPINOROL HIDROKLORIDA

Pomoću stehiometrijskog izračuna, prirede se matične vodene otopine ropinorol hidroklorida i levodope u koncentraciji od  $1 \times 10^{-3}$  M. Izvaže se 3,0 mg ropinorol hidroklorida i 2,0 mg levodope u zasebne praščiće, prenese u posebne odmjerne tikvice od 10,0 mL gdje se uzorci prvo otope manjom količinom ultračiste vode, a kasnije nadopune do oznake. Zatim se uzme 200  $\mu\text{L}$  matične otopine ropinorol hidroklorida i prenese u tikvicu od 20,0 mL te nadopuni do

oznake puferom (0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Tako se dobiva radna otopina ropinorol hidroklorida ( $c= 1 \times 10^{-5}$  M) u 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Isti postupak ponovi se i za pripremu radne otopine levodope ( $c= 1 \times 10^{-5}$  M). U te radne otopine doda se i matična otopina pimavanserina kako bi njegova koncentracija bila  $1 \times 10^{-5}$  M.

### 3.3.5. SUSPENZIJE NANOMATERIJALA

Na analitičkoj vagi odvojeno se važe 1 mg grafen oksida, 1 mg grafen nanopločica, 1 mg višeslojnih grafitiziranih ugljikovih nanocjevčica, 1 mg ugljikovih nanovlakana te 1 mg dijamantnog nanopraha u odmjerne tikvice od 5,0 mL. U svaku tikvicu pipetira se 1,0 mL 0,3%-tne otopine Nafiona u etanolu, koja se priređuje pipetiranjem 600  $\mu$ L 5%-tnog Nafiona u odmjernu tikvicu od 10,0 mL i nadopunjavanjem do oznake etanolom. Nadalje, tikvice se stavljaju u ultrazvučnu kupelj kako bi se suspenzije homogenizirale. Kombinacija nanomaterijala priredi se vaganjem 1 mg višeslojnih grafitiziranih ugljikovih nanocjevčica i 1 mg grafen nanopločica u istu odmjernu tikvicu od 5,0 mL u koju se zatim pipetira 2,0 mL 0,3%-tne otopine Nafiona u etanolu te se dobivena suspenzija homogenizira na ultrazvučnoj kupelji. Suspenzije nanomaterijala čuvaju se u hladnjaku pri 4 °C, zatvorene i zaštićene od svjetlosti.

### 3.4. PRIPREMA ELEKTRODA

Nemodificiranu elektrodu od staklastog ugljika prije primjene potrebno je polirati na krpici pomoću aluminijevog oksida (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) kao abrazivnog sredstva. Poliranje se vrši kružnim pokretima elektrode na krpici, a nakon toga elektroda se ispere destiliranom vodom te nakratko uroni u ultrazvučnu kupelj da se osigura uklanjanje zaostalih čestica. Nakon toga elektroda se ispere destiliranom vodom te ostavi na zraku da se u potpunosti osuši (postupak se može ubrzati korištenjem sušila za kosu).

Kod priređivanja modificiranih površina elektrode potrebno je provesti isti postupak poliranja i čišćenja kako bi se osigurala jednolična površina elektrode prije modifikacije suspenzijom nanomaterijala. Nadalje, na osušenu elektrodu nanosi se 5  $\mu$ L suspenzije pojedinog ili kombinacije nanomaterijala u 0,3%-tnoj etanolnoj otopini Nafiona. Ostavi se sušiti, a kada je površina elektrode u potpunosti suha može se koristiti za analize. Uvijek je potrebno

neposredno prije nanošenja suspenzije nanomaterijala na elektrodu ponovno staviti suspenziju u ultrazvučnu kupelj poradi homogenizacije. Nakon što se naprave mjerenja na modificiranim elektrodama, skidaju se slojevi nanomaterijala s površine elektrode poliranjem na krpici pomoću aluminijevog oksida, kratkim uranjanjem u ultrazvučnu kupelj te ispiranjem destiliranom vodom.

Nakon modifikacije površine elektrode, a prije mjerenja otopina uzoraka, elektroda se uranja u otopinu osnovnog elektrolita te se provedu dva skeniranja cikličkom voltametrijom u području potencijala od 0 V do 1,4 V kako bi očitavanja struje postala stabilna.

Nakon mjerenja u otopini uzorka potrebno je isprati elektrodu ultračistom vodom te provesti nekoliko mjerenja u čistom puferu (BR ili 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) kako bi se regenerirala površina elektrode te dobili reproducibilni rezultati.

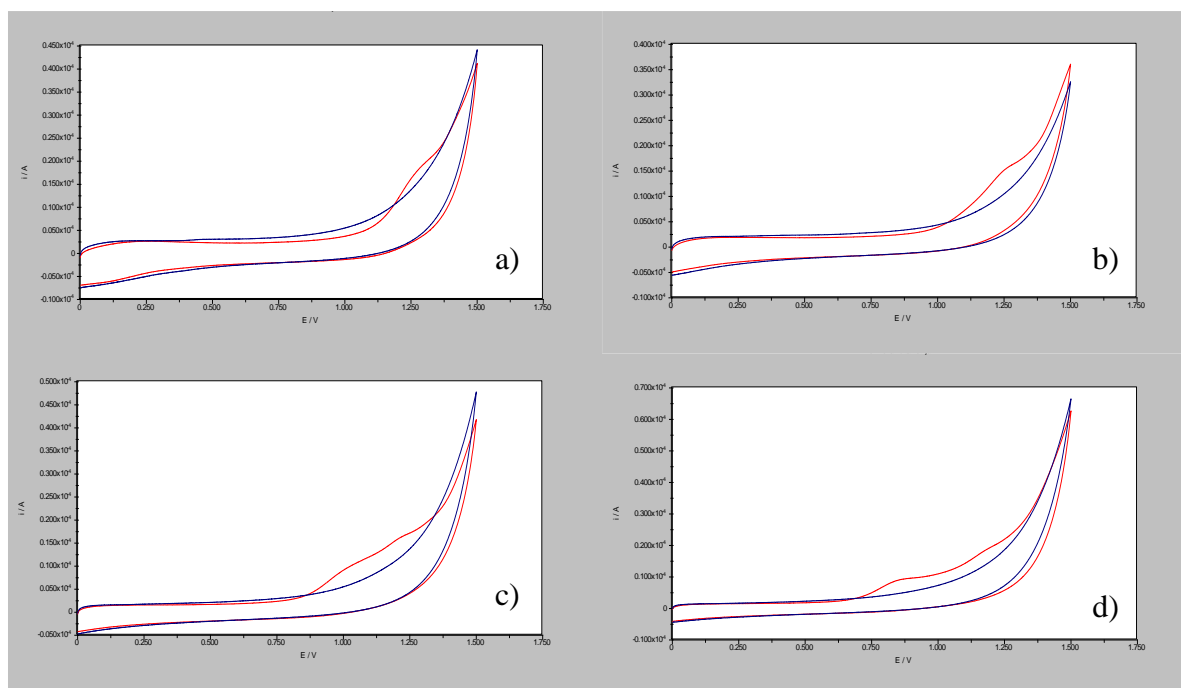
### 3.5. UVJETI MJERENJA

Ciklički voltamogrami snimani su na elektrodi od staklastog ugljika u  $1 \times 10^{-4}$  M otopini pimavanserina u BR puferu različitih pH vrijednosti od 2 do 8 te u 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Ciklički voltamogrami snimljeni su u  $5 \times 10^{-5}$  M otopini pimavanserina u istim elektrolitima na elektrodi od staklastog ugljika modificiranoj pojedinačnim nanomaterijalima (grafen oksid, grafen nanopločice, ugljikova nanovlakna, dijamantni nanoprah, višeslojne grafitizirane ugljikove nanocjevčice) ili kombinacijom nanomaterijala (grafen nanopločice i višeslojne grafitizirane ugljikove nanocjevčice, 1:1) suspendiranim u 0,3%-tnoj otopini Nafiona u etanolu.

Pravokutnovalnim voltamogramima određeni su optimalni uvjeti analize snimanjem na elektrodi od staklastog ugljika u  $1 \times 10^{-4}$  M otopini pimavanserina u 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kao osnovnom elektrolitu, u rasponu frekvencija od 10 do 100 Hz, amplituda od 10 do 40 mV te promjene porasta potencijala od 2 do 8 mV. Dobiveni su sljedeći optimalni parametri: frekvencija 75 Hz, amplituda 20 mV i porast potencijala 4 mV. Koristeći pravokutnovalnu voltametriju, promjenom vremena akumulacije od 0 do 240 s ispitivao se utjecaj akumulacije pimavanserina na modificiranoj površini elektrode nanomaterijalima.

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

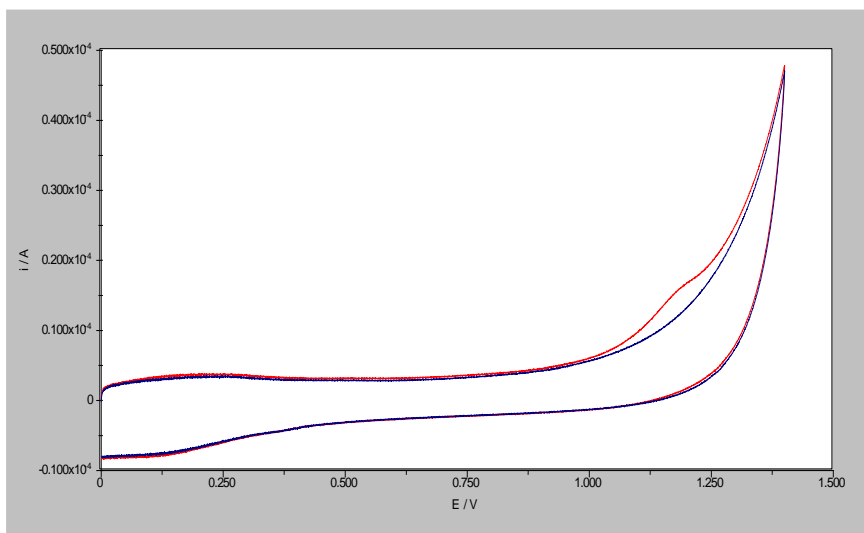
Svrha prvog mjerenja otopine analita cikličkom voltametrijom bila je odabir najprikladnijeg osnovnog elektrolita, to jest utvrditi optimalni pH u kojem će struja vrha vala oksidacije pimavanserina biti najveća. Izvršena su mjerenja radne otopine pimavanserina koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M korištenjem elektrode od staklastog ugljika (engl. *glassy carbon electrode*, dalje u tekstu GCE) (Slika 7.). Promatrajući dobivene cikličke voltamograme u BR puferu različitih pH vrijednosti, primjećujemo da je najbolje definiran pik u kiselom mediju (pH 2). Struja u voltamogramu raste kako se potencijal približava potencijalu oksidacije analita, a smanjuje nakon oksidacije. Na slici 7 zamjećujemo cijepanje voltametrijskog odaziva pri pH 6 i pH 8, odnosno dva strujna vala, zbog pojave oksidacije na više dušikovih atoma u molekuli analita. Naime, protoniranje dušika u molekuli lijeka ovisi o pH. Budući da je pKa pimavanserina 8,6 bit će u protoniranom obliku pri nižem pH, dok će pri višim pH vrijednostima biti deprotoniran, što utječe na oksidaciju dušika i posljedično na visinu pika.



**Slika 7.** Ciklički voltamogrami pimavanserina ( $c=1 \times 10^{-4}$  M) u BR puferu različitih pH vrijednosti mjereni na GCE: a) pH 2, b) pH 4, c) pH 6 i d) pH 8 (crveno – voltamogram otopine lijeka, plavo – voltamogram osnovnog elektrolita BR pufera)



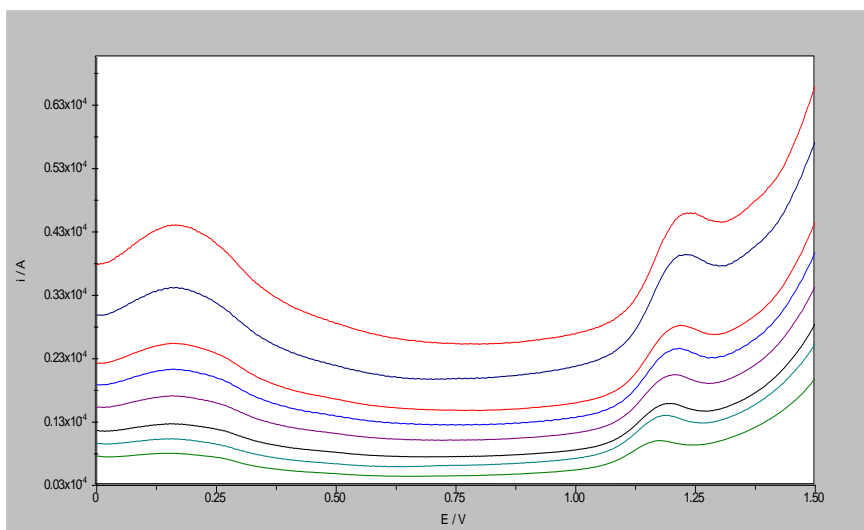
U analitičkoj primjeni voltametrijske tehnike nije poželjno cijepanje voltametrijskog odgovora pa se proces oksidacije lijeka nastavlja istraživati u kiselom mediju. Stoga je izvršeno mjerenje u drugom kiselom osnovnom elektrolitu 0,1 M otopini  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Slika 8.). Iz voltamograma je vidljivo kako je strujni vrh najbolje definirani upravo u 0,1 M otopini  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pa je za daljnja mjerenja primjenjivana kao osnovni elektrolit.



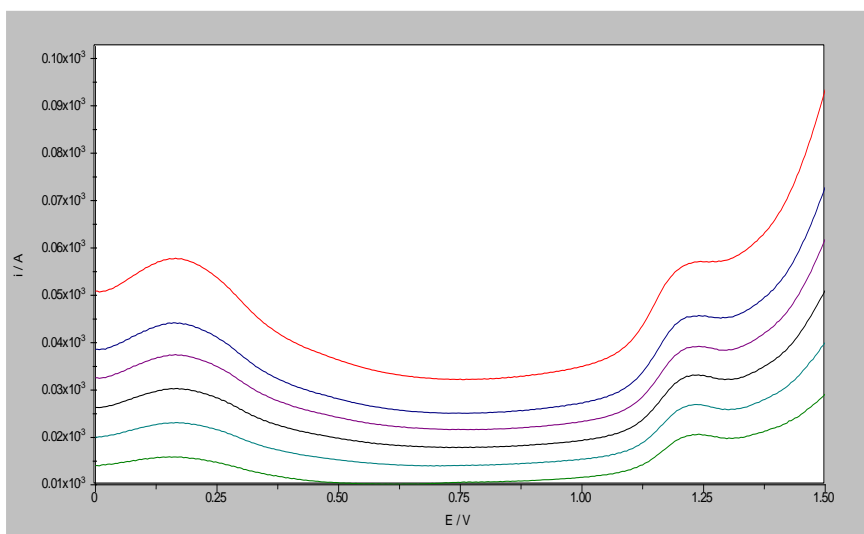
**Slika 8.** Ciklički voltamogram pimavanserina ( $c=1 \times 10^{-4}$  M) mjereno na GCE u 0,1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (crveno) i sam osnovni elektrolit 0,1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (plavo)

Tijekom razvoja voltametrijske metode analize potrebno je utvrditi optimalne parametre metode kako bi se pouzdano detektirala i kvantificirala što niža koncentracija analita te je upravo iz tih razloga korištena pulsna tehnika, pravokutnovalna voltametrija. Ova vrsta voltametrije je dovoljno osjetljiva (Nigović i sur., 2014) te može detektirati analite reda veličine  $10^{-8}$  M (Nigović i sur., 2019).

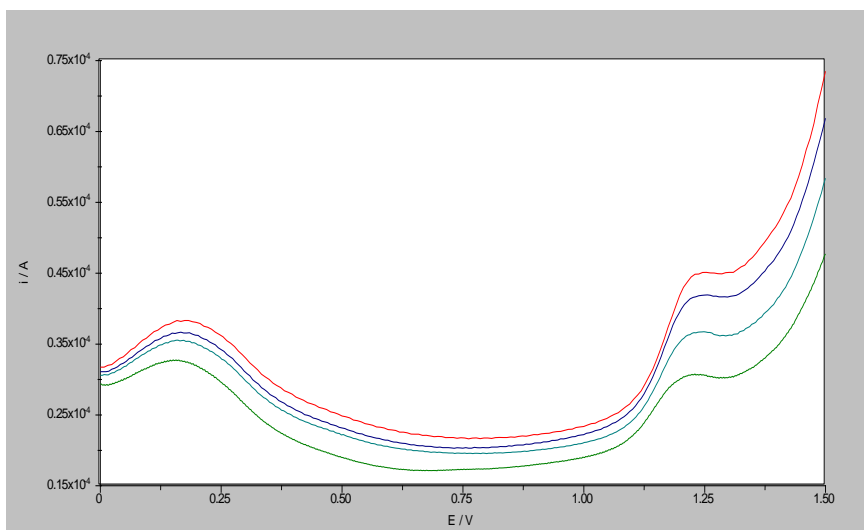
Pri definiranju optimalnih uvjeta ispitalo se kako promjene frekvencije (Slika 9.), amplitude (Slika 10.) i porasta potencija (Slika 11.) utječu na izgled pravokutnovalnog voltamograma otopine pimavanserina koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M.



**Slika 9.** Pravokutnovalni voltamogrami pimavanserina ( $c=1 \times 10^{-4}$  M) u 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na GCE zabilježeni pri različitim frekvencijama izmjene pulsa: 100 Hz (crveno), 75 Hz (tamno plavo), 50 Hz (narančasto), 40 Hz (plavo), 30 Hz (ljubičasto), 20 Hz (crno), 15 Hz (tirkizno), 10 Hz (zeleno)

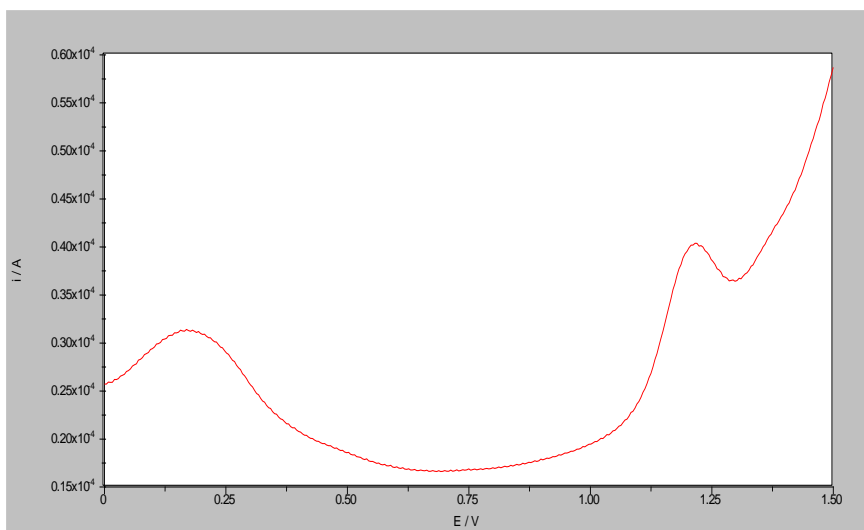


**Slika 10.** Pravokutnovalni voltamogrami pimavanserina ( $c=1 \times 10^{-4}$  M) u 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na GCE zabilježeni pri različitim amplitudama: 40 mV (crveno), 30 mV (tamno plavo), 25 mV (ljubičasto), 20 mV (crno), 15 mV (tirkizno), 10 mV (zeleno)



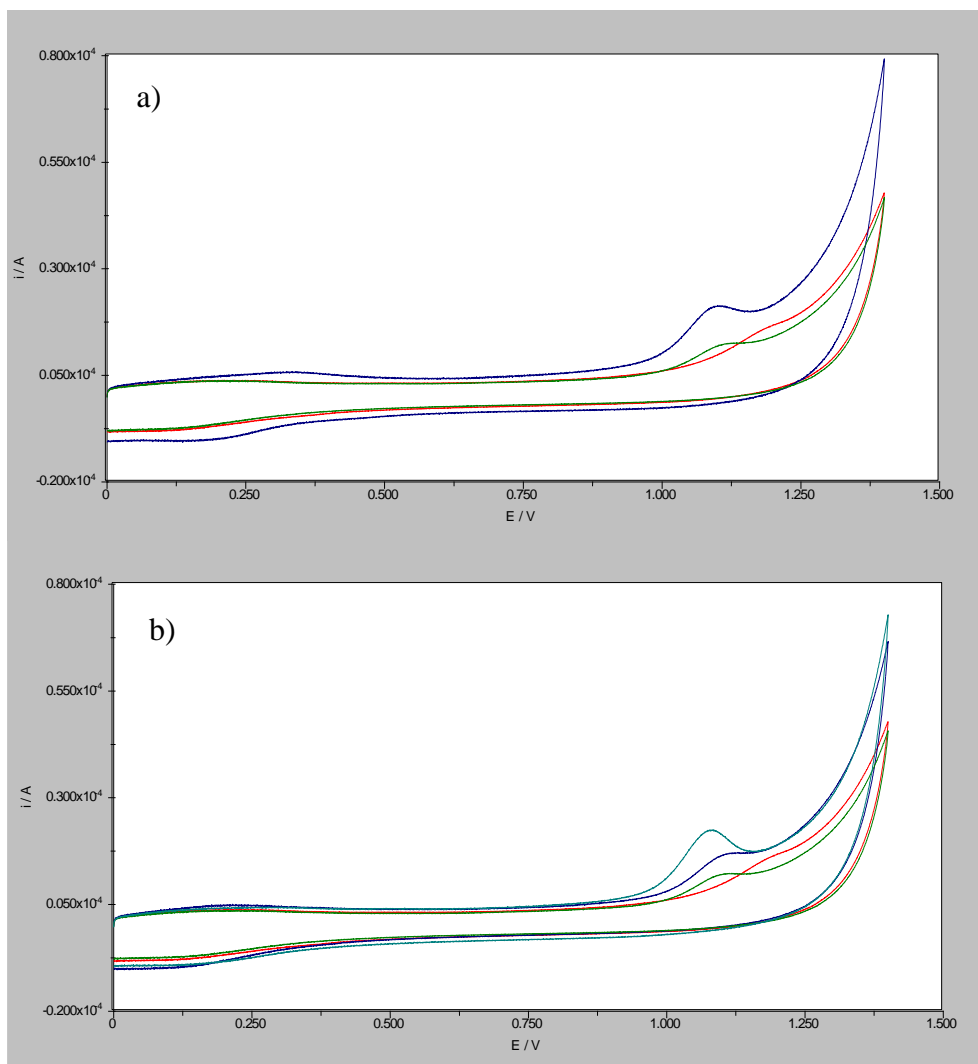
**Slika 11.** Pravokutnovalni voltamogrami pimavanserina ( $c=1 \times 10^{-4}$  M) u 0,1 M  $H_2SO_4$  na GCE zabilježeni pri različitim promjena porasta potencijala: 8 mV (crveno), 6 mV (tamno plavo), 4 mV (tirkizno), 2 mV (zeleno)

Iz prikazanih voltamograma vidljivo je kako je strujni vrh, odnosno oksidacijski pik pimavanserina najbolje definiran na frekvenciji ( $f$ ) od 75 Hz, amplitudi ( $E$ ) 20 mV te promjeni porasta potencijala ( $dE$ ) od 4 mV. Iz voltamograma prikazanog na slici 12, možemo vidjeti da je jakost struje najveća na potencijalu oko 1,21 V, što je posljedica oksidacije dušika u piperidinskom prstenu u molekuli analita. Navedeni optimalni voltametrijski parametri korišteni su u daljnjim mjerenjima.



**Slika 12.** Pravokutni voltamogram pimavanserina ( $c=1 \times 10^{-4}$  M) u 0,1 M  $H_2SO_4$  na GCE zabilježen pri optimalnim uvjetima ( $f=75$  Hz,  $dE=4$  mV,  $E=20$  mV)

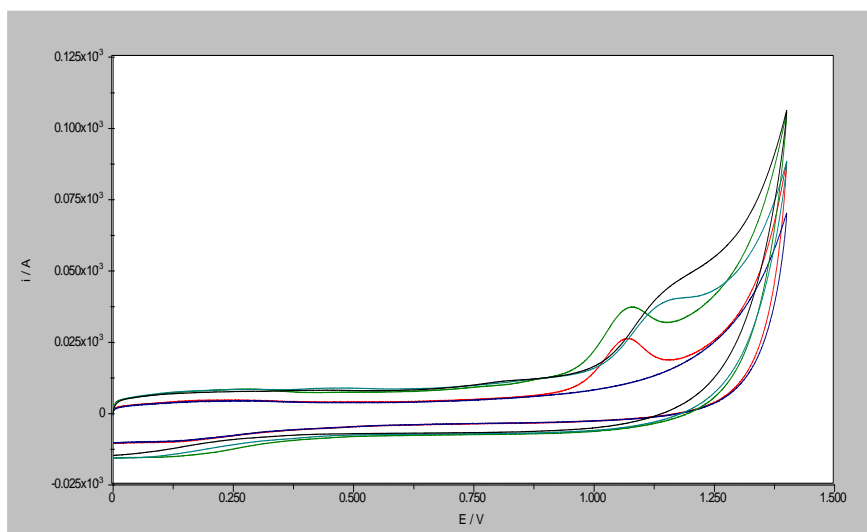
Nadalje, provedena su ispitivanja cikličkom i pravokutnovalnom voltametrijom na GCE modificiranoj nanomaterijalima: grafen oksidom (engl. *graphene oxide*, dalje u tekstu GRO), grafen nanopločicama (engl. *graphene nanoplatelets*, GRNP), višeslojne grafitizirane ugljikove nanocjevčice (engl. *graphitized MWNTs*, GRNT), ugljikova nanovlakana (engl. *carbon nanofibers*, CNF) te dijamantnim nanoprahom (engl. *diamond nanopowder*, DNP) ili kombinacijom nanomaterijala. Nanomaterijali su suspendirani u 0,3%-tnoj etanolnoj otopini Nafiona. Nafion kao sulfonirani tetraetilen fluoropolimer omogućava dobro prianjanje nanomaterijala na površini elektrode čime osigurava stabilnost modificirane površine i posljedično reproducibilne rezultate voltametrijskih mjerenja. U poglavlju „Materijali i metode“, to jest potpoglavlju „Priprema elektroda“ opisan je postupak modifikacije površine elektrode. Snimljeni su ciklički voltamogrami na GCE modificiranoj svakim od nanomaterijala te su uspoređivani s cikličkim voltamogramima dobivenim snimanjem na nemodificiranoj GCE (Slika 13 a i b).



**Slika 13.** Ciklički voltamogrami pimavanserina u 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> snimljeni na nemodificiranoj GCE ( $c=1\times 10^{-4}$  M) a) i b) crveno i na GCE modificiranoj različitim nanomaterijalima ( $c=5\times 10^{-5}$  M): GRO a) zeleno, GRNP a) plavo; DNP b) zeleno, CNF b) plavo i GRNT b) tirkizno

U voltametrijskim mjerenjima na modificiranoj GCE nanomaterijalima korištena je otopina pimavanserina koncentracije  $5\times 10^{-5}$  M. Iako je koncentracije dvostruko niža od koncentracije pimavanserina ( $1\times 10^{-4}$  M) korištene u prethodno navedenim mjerenjima na nemodificiranoj GCE uočavaju se površinom veći i bolje izraženi voltametrijski odgovori. Uspoređujući vršne jakosti struje oksidacijskih pikova na dobivenim voltamogramima može se uočiti da su vršne struje na GCE s modificiranim površinama više u odnosu na vršne struje na nemodificiranoj GCE što ukazuje da je modifikacija površine elektrode nanomaterijalima povećala osjetljivost metode. Promatrajući vrijednosti potencijala na strujnim vrhovima modificiranih elektroda,

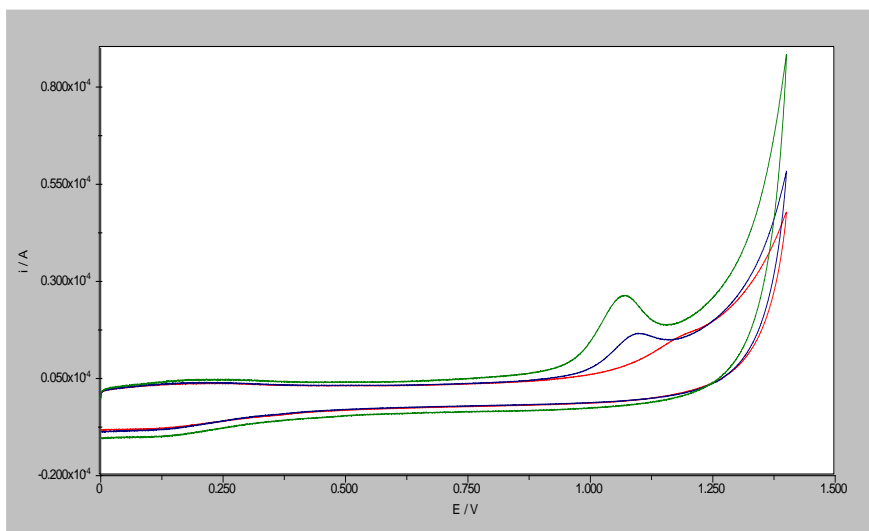
primjećujemo kako su pomaknute prema manje pozitivnim vrijednostima u odnosu na nemodificiranu GCE, što ukazuje da nanomaterijali imaju elektrokatalitičko djelovanje tj. omogućavaju lakšu oksidaciju pimavanserina, odnosno kataliziraju reakciju prijenosa elektrona. Također, iz slike 13 zamjećujemo da najviše strujne pikove i najmanje pozitivne vrijednosti potencijala imaju elektrode modificirane GRNP i GRNT, stoga se ispitala kombinacija ta dva nanomaterijala kako bi se postigla bolja osjetljivost metode. Ciklički voltamogrami na slici 14 prikazuju kombinaciju GRNP i GRNT (1:1) u različitim puferima te primjećujemo kako su najbolje definirani strujni vrhovi zabilježeni u otopini pimavanserina u 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i BR pufera pH 2 kao osnovnim elektrolitima, čime je potvrđeno da je kiseli medij najpogodniji za praćenje oksidacije pimavanserina.



**Slika 14.** Ciklički voltamogrami pimavanserina ( $c=5 \times 10^{-5}$  M) snimljeni na GCE modificiranoj kombinacijom nanomaterijala GRNT i GRNP (1:1) u 0,3%-tnoj etanolnoj otopini Nafiona u različitim osnovnim elektrolitima: 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (crveno), BR pH 2 (zeleno), BR pH 3 (tirkizno), BR pH 4 (crno) te ciklički voltamogram snimljen na isto modificiranoj GCE u samom osnovnom elektrolitu 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (plavo)

Ispitivanja su se nastavila s kombinacijom nanomaterijala GRNT i GRNP (1:1) u 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Oksidacijski strujni vrh pimavanserina dobiven cikličkom voltametrijom najveći je na površini elektrode modificiranoj kombinacijom GRNT i GRNP, a potencijal je pomaknut prema još manje pozitivnim vrijednostima (Slika 15.) što ukazuje na sinergistički učinak nanomaterijala. Naime GRNP i GRNT se nekolaventnim vezama vežu za površinski sloj polimera pa se tako

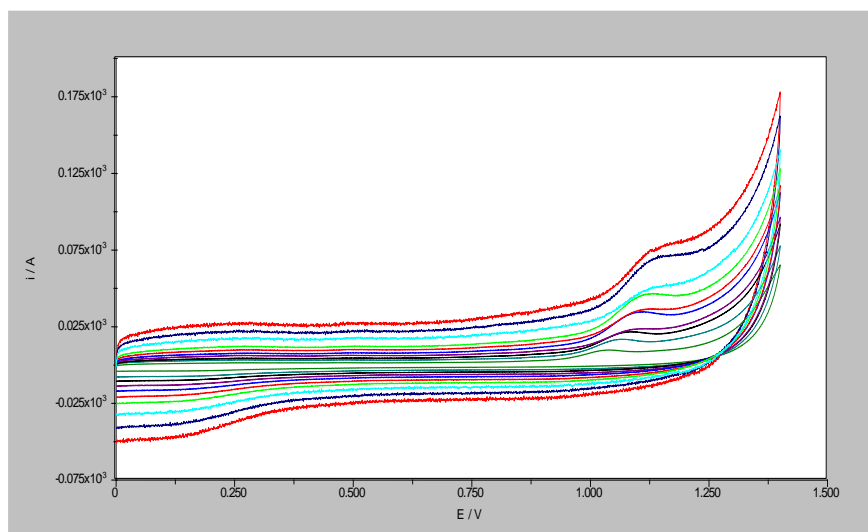
ne mijenja njihova elektronska struktura, niti njihova električna svojstva koja su posljedica slobodnih elektrona na površini nanomaterijala oslobođenih u  $sp^2$  hibridizaciji atomskih orbitala ugljika. Nanomaterijali također značajno povećavaju aktivnu površinu elektrode na kojoj se događa oksidacija molekula lijeka.



**Slika 15.** Ciklički voltamogrami pimavanserina ( $c=5 \times 10^{-5}$  M) u 0,1 M  $H_2SO_4$  snimljeni na nemodificiranoj GCE (crveno), GCE modificiranoj 0,3%-tnom etanolnom otopinom Nafiona (plavo) i GCE modificiranoj kombinacijom nanomaterijala GRNT i GRNP (1:1) u 0,3%-tnoj etanolnoj otopini Nafiona (zeleno)

Ispitan je i utjecaj Nafiona kao kationskog izmjenjivačkog polimera na voltametrijski odgovor pimavanserina. Iz priloženog cikličnog voltamograma (Slika 15.) može se zaključiti da i sam Nafion ima utjecaj na oksidaciju analita. Naime, dobivena je značajno veća struja nego na samoj GCE. Nafion osim što je polimer pa omogućuje bolju homogenost suspenzija hidrofobnih nanomaterijala uvelike utječe na adsorpciju analita na površinu elektrode. Nafion se svojim hidrofobnim dijelom veže na površinu elektrode i stupa u interakciju s nanomaterijalima, dok u kontaktu s otopinom ostaju slobodne sulfonske skupine ( $SO_3^-$ ). Ionizacijom nastali negativni naboji na sulfonskim skupinama elektrostatski sprječavaju difuziju aniona do površine radne elektrode. Budući da je u kiselom mediju dušik u strukturi pimavanserina pozitivno nabijen stvara se elektrostatska interakcija između negativnih skupina u Nafionu i pozitivnih dušika u molekulama pimavanserina. Time se povećava koncentracija molekula lijeka na površini elektrode pa je posljedično zabilježena povećana struja na voltamogramu.

Sljedeći korak bio je ispitivanje utjecaja različite brzine promjene potencijala u cikličkoj voltametriji primijenjenoj u prethodno utvrđenim optimalnim uvjetima oksidacije pimavanserina. Mjerenje je izvršeno u 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na GCE modificiranoj suspenzijom GRNT i GRNP (1:1) u 0,3%-tnoj etanolnoj otopini Nafiona. Brzina promjene potencijala protezala se od 20 do 300 mVs<sup>-1</sup>. Dobiveni ciklički voltamogrami prikazani su na slici 16, gdje najmanju promjenu brzine potencijala prikazuje voltamogram s najnižom strujom, s trendom porasta struje povećanjem promjene brzine potencijala. Naime, kako raste brzina promjene potencijala dolazi do smanjenja veličine difuzijskog sloja, a kao posljedica toga uočavaju se veće struje i oksidacijski vrh se pomiče prema pozitivnijim vrijednostima potencijala. Kada je prijenos elektrona na površini elektrode spor u usporedbi s transportom mase, proces se naziva elektrokemijski nepovratan. Iz toga proizlazi kako je proces oksidacije pimavanserina ireverzibilan proces.

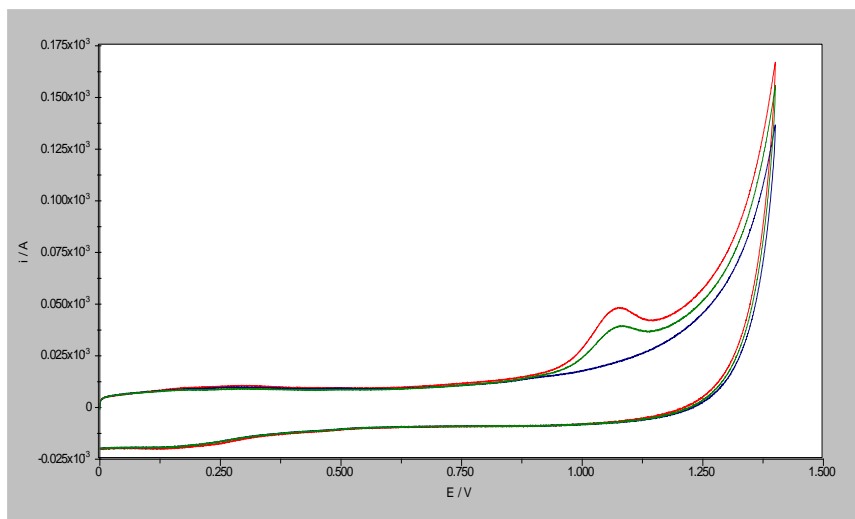


**Slika 16.** Ciklički voltamogrami pimavanserina ( $c=5 \times 10^{-5}$  M) u 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> snimljeni na GCE modificiranoj kombinacijom GRNT i GRNP (1:1) u 0,3%-tnoj etanolnoj otopini Nafiona uz različitu brzinu promjene potencijala: 20, 40, 60, 80, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 270 i 300 mVs<sup>-1</sup>

Nadalje, ukoliko se modificirana elektroda odmah nakon snimanja lijeka ispere te uroni u otopinu samog osnovnog elektrolita i zabilježi ciklički voltamogram, uočava se oksidacijski pik pimavanserina (Slika 17.). Također se iz priloženih cikličkih voltamograma uočava da se nakon



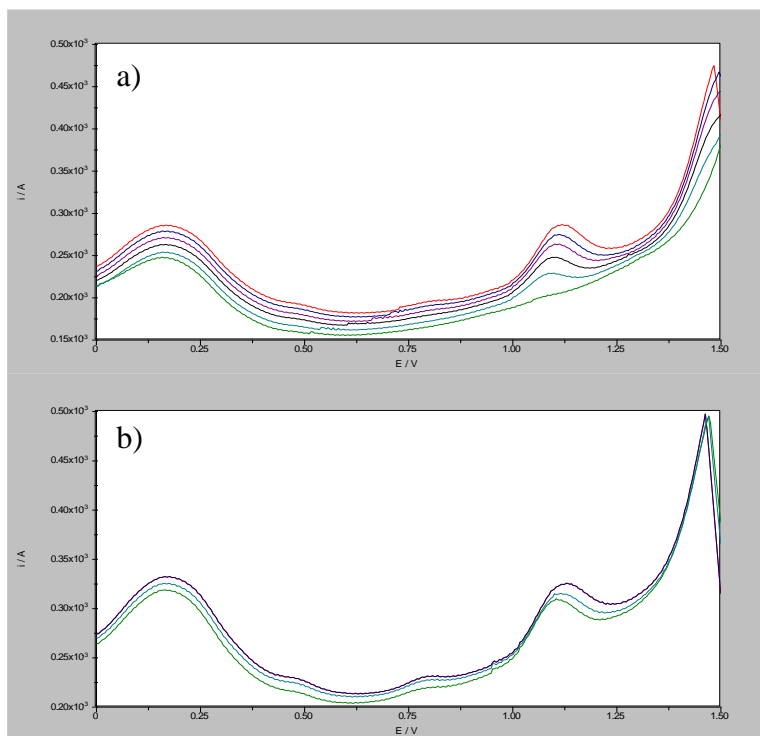
snimanja u osnovnom elektrolitu pik zanemarivo smanjio što ukazuje na postojanost analita na modificiranoj površini elektrode. To se događa zbog adsorpcije pimavanserina na površini modificirane elektrode nanomaterijalom u polimernom matriksu Nafiona. Zaključujemo kako je neophodno napraviti tzv. čišćenje elektrode u osnovnom elektrolitu između ispitivanja otopina analita različitih koncentracija. Nužno je napraviti dva snimanja u osnovnom elektrolitu u rasponu potencijala od 0 do 1,4 V, tako da na dobivenom voltamogramu više nema strujnih vrhova koji odgovaraju oksidaciji pimavanserina, odnosno da se u potpunosti preklapa s voltamogramom čistog elektrolita. Takvo čišćenje elektrode, odnosno uklanjanje adsorbiranih molekula pimavanserina na modificiranoj površini značajno smanjuje mogućnost dobivanja lažnih rezultata koji bi pokazivali veću koncentraciju analita u ispitivanoj otopini nego što ona uistinu jest.



**Slika 17.** Ciklički voltamogrami snimljeni na GCE modificiranoj suspenzijom GRNT i GRNP (1:1) u otopini pimavanserina ( $c= 5 \times 10^{-5}$  M) u 0,1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (crveno) te u osnovnom elektrolitu (0,1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) odmah nakon snimanja u otopini pimavanserina: prvo snimanje (zeleno) i drugo snimanje (plavo)

Potom se ispitivala adsorpcija lijeka na GCE modificiranoj kombinacijom nanomaterijala GRNT i GRNP (1:1) tako da se elektroda ostavila u otopini pimavanserina koncentracije  $1 \times 10^{-5}$  M neko određeno vrijeme te potom snimio pravokutnovalni voltamogram i bilježila jakost struje strujnog pika. Proučavajući utjecaj vremena akumulacije na vršne struje, kao što se i

očekivalo, visina pika povećavala se s povećanjem vremena akumulacije molekula lijeka na površini modificirane elektrode (Slika 18.).

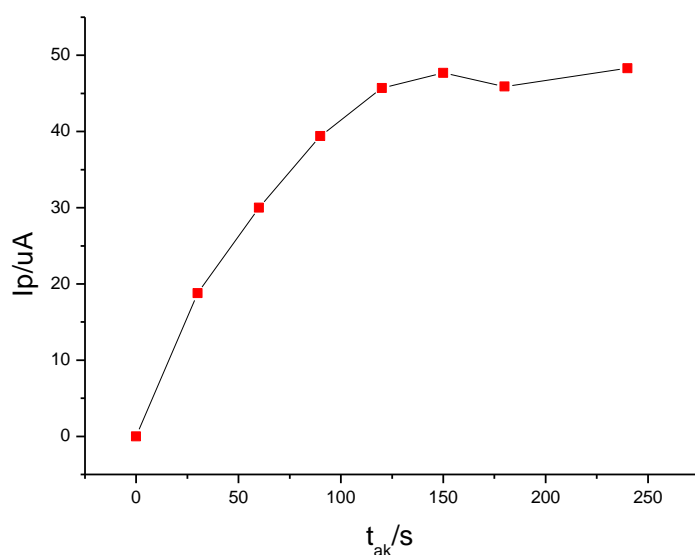


**Slika 18.** Pravokutnovalni voltamogrami pimavanserina ( $c=1 \times 10^{-5}$  M) u 0,1 M  $H_2SO_4$  na GCE modificiranoj nanomaterijalima GRNT i GRNP (1:1) u 0,3%-tnoj etanolnoj otopini Nafiona pri različitim vremenima akumulacije: a) 0 s (zeleno), 30 s (tirkizno), 60 s (crno), 90 s (ljubičasto), 120 s (plavo), 150 s (crveno); b) 150 s (zeleno), 180 s (tirkizno), 240 s (plavo)

Podaci o izmjerenim strujama prikazani su u tablici 2, a grafička ovisnost jakosti struje ( $I_p$ ) o vremenu akumulacije ( $t_{ak}$ ) prikazana je na grafu 1.

**Tablica 2.** Izmjerene jakosti struje oksidacije pimavanserina za različita vremena akumulacije

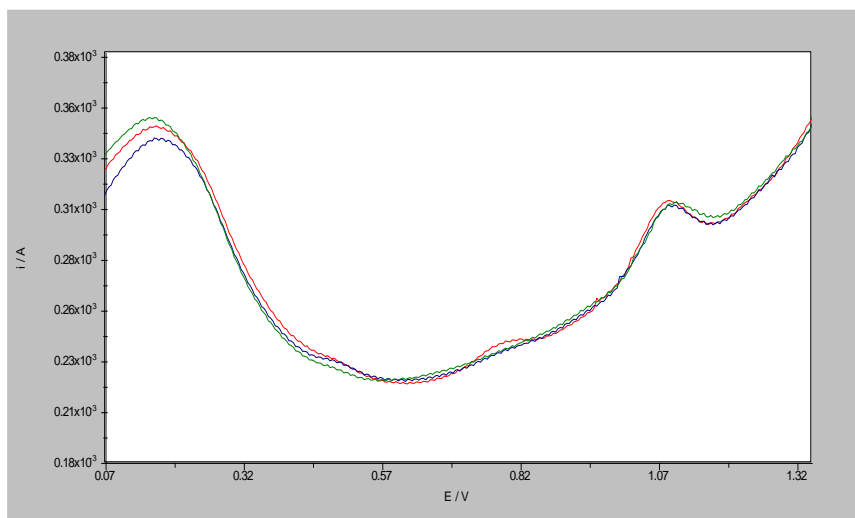
$t_{ak}/s$	$I_p/\mu A$
0	0
30	18,8
60	30,0
90	39,4
120	45,7
150	47,7
180	45,9
240	48,3



**Graf 1.** Prikaz ovisnosti jakosti struje oksidacije pimavanserina o vremenu akumulacije lijeka na modificiranoj površini elektrode

Na prikazu je vidljiva linearnost pravca otprilike do vremena akumulacije od 90 sekundi. Naime, jakost struje ovisi o adsorbiranom analitu na površini elektrode pa se može zaključiti kako se ravnoteža između adsorpcije i desorpcije analita na GCE modificiranoj kombinacijom GRNT i GRNP postiže nakon 100 sekundi akumulacije. Kao što je vidljivo iz grafa tada se vrijednosti jakosti struje ustaljuju, a kao optimalno vrijeme akumulacije uzima se 60 sekundi, kako bi se na površini elektrone izbjeglo zasićenje, održala linearnost povećanja struje i dobilo kratko vrijeme analize.

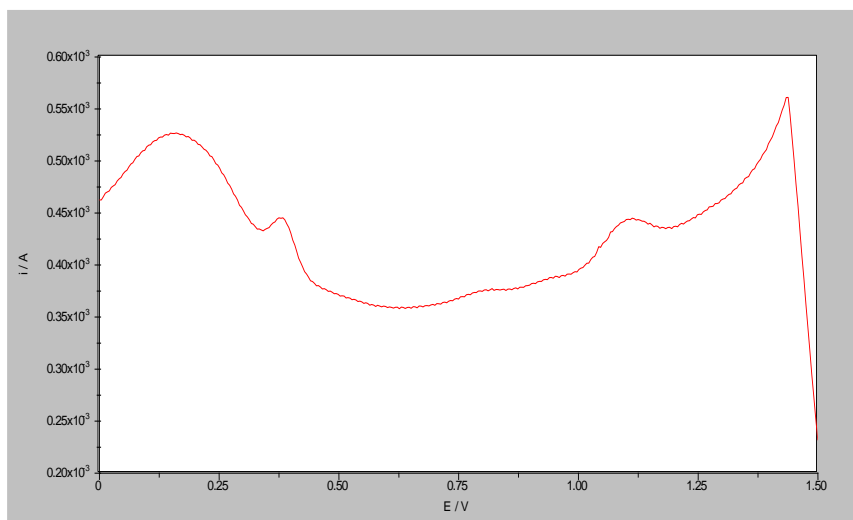
Koristeći vrijeme akumulacije od 60 sekundi ispituje se i potencijal akumulacije (Slika 19.). Zaključujemo da je veličina analitičkog signala gotovo neovisna o potencijalu akumulacije u rasponu od -0,2 do +0,5 V. Nastavlja se koristiti potencijal akumulacije od 0 V.



**Slika 19.** Pravokutnovalni voltamogrami pimavanserina ( $c = 1 \times 10^{-5}$  M) u 0,1 M  $H_2SO_4$  na GCE modificiranoj kombinacijom GRNT i GRNP (1:1) u 0,3%-tnoj etanolnoj otopini Nafiona, vrijeme akumulacije 60 s, potencijal akumulacije -0,2 V (crveno), 0 V (plavo), +0,5 V (zeleno)

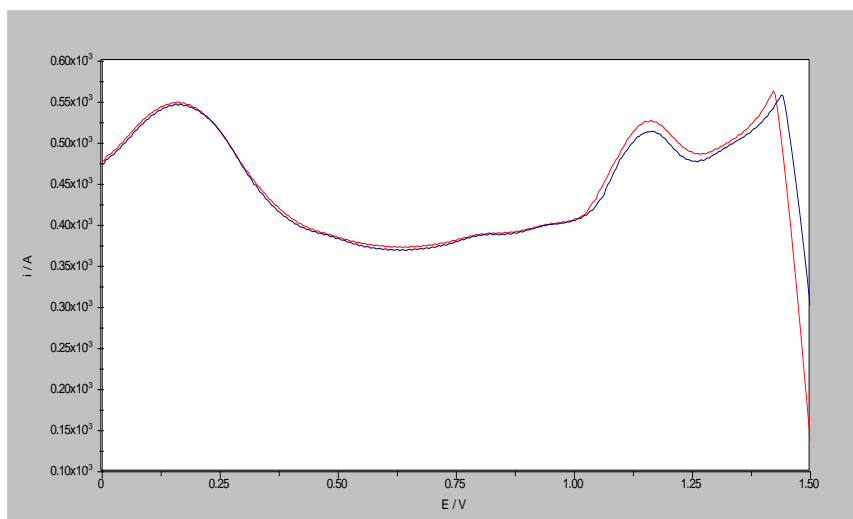
Također, provedeno je ispitivanje selektivnosti voltametrijske metode za određivanje pimavanserina na GCE modificiranoj nanomaterijalom GRNT i GRNP (1:1). Obzirom da osobe koje boluju od Parkinsonove bolesti u terapiji uzimaju i druge lijekove, važno je ispitati njihovu potencijalnu interferenciju s analizom pimavanserina. Levodopa, prekursor dopamina, zlatni je standard u liječenju Parkinsonove bolesti, stoga je lako moguće zajedničko korištenje ovih lijekova u terapiji kada su prisutni psihotični simptomi u Parkinsonovoj bolesti. Pravokutnovalnom voltametrijom ispitivane su otopine vrlo niske koncentracije oba analita ( $1 \times 10^{-5}$  M). Iako se radilo o niskim koncentracijama na voltamogramima jasno vidimo oksidacijske pikove oba lijeka (Slika 20.). Oksidacijski pik pimavanserina vidljiv je na potencijalu 1,1 V, a levodope na 0,38 V. Zbog različitih vrijednosti potencijala strujnih vrhova, uočavamo kako voltametrijski odgovor levodope ne utječe na oksidaciju pimavanserina. Dakle, kombinacija levodope i pimavanserina bila bi dobar kandidat za simultanu analizu. Prema

voltamogramu na slici 20 vidimo da se pik osnovnog elektrolita malo preklapa s oksidacijskim pikom levodope, stoga bi u daljnjim ispitivanjima bilo dobro pokušati naći prikladniji pufer.



**Slika 20.** Pravokutonovalni voltamogram smjese levodope i pimavanserina ( $c=1 \times 10^{-5}$  M) u 0,1 M  $H_2SO_4$  snimljeni na GCE modificiranoj kombinacijom GRNT i GRNP (1:1) u 0,3%-tnoj etanolnoj otopini Nafiona

Ispitivana je i mogućnost simultane analize pimavanserina i ropinorol hidroklorida. Ropinirol je agonist dopamina koji stimulira strijatalne dopaminske receptore te pomaže u smanjenju simptoma Parkinsonove bolesti. Koristi se kao monoterapija u ranoj fazi bolesti, a u uznapređevaloj fazi kao dodatak levodopi. Prema slici 21 vidimo da se pravokutonovalni voltamogrami otopine ropinorol hidroklorida i pimavanserina te samog ropinorol hidroklorida gotovo preklapaju, a oksidacijski pikovi su razvučeni. Zaključujemo kako se oba analita oksidiraju na jako bliskim vrijednostima potencijala pa nisu dobri kandidati za simultanu analizu pravokutonovalnom voltametrijom.



**Slika 21.** Pravokutnovalni voltamogram ropinorol hidroklorida (plavo) i njegovoj smjesi s pimavanserinom ( $c=1 \times 10^{-5}$  M) (crveno) u 0,1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  snimljeni na GCE modificiranoj GRNT i GRNP (1:1) u 0,3%-tnoj etanolnoj otopini Nafiona

## 5. ZAKLJUČCI

Elektroanalitička svojstva pimavanserina istraživana su cikličkom i pravokutnovalnom voltametrijom na GCE i modificiranoj površini GCE različitim nanomaterijalima. Cikličkom voltametrijom utvrđena je ireverzibilna oksidacija pimavanserina. Najbolji voltametrijski odgovor dobiven je analizom otopine pimavanserina na GCE elektrodi u 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kao osnovnom elektrolitu. Nakon modifikacije GCE elektrode različitim nanomaterijalima najbolji voltametrijski odgovor pimavanserina dobiven je na površini GCE modificiranoj kombinacijom nanomaterijala GRNT i GRNP (1:1) u 0,3%-tnoj etanolnoj otopini Nafiona. Nanomaterijali imaju elektrokatalitički utjecaj na oksidaciju pimavanserina i dodatno značajno povećavaju aktivnu površinu elektrode na kojoj se događa oksidacija molekula lijeka. Nafion kao kationski izmjenjivač ostvaruje elektrostatske interakcije s pozitivno nabijenim dušikom u pimavanserinu u kiselom mediju i omogućava dobru adheziju nanomaterijala na površini elektrode čime osigurava stabilnost modificirane površine.

Definirani su optimalni parametri pravokutnovalne voltetrije: frekvencija 75 Hz, amplituda 20 mV te porast potencijala 4 mV. Potencijal oksidacije pimavanserina na GCE modificiranoj kombinacijom nanomaterijala GRNT i GRNP (1:1) u 0,3%-tnoj etanolnoj otopini Nafiona iznosi 1,21 V u 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kao osnovnom elektrolitu pri optimalnim uvjetima pravokutnovalne voltetrije. Molekule pimavanserina adsorbiraju se na površinu modificirane elektrode, a optimalno vrijeme akumulacije lijeka iznosi 60 sekundi. Kako bi se osigurala reproducibilnost rezultata modificiranu površinu elektrode između mjerenja treba regenerirati primjenom dva voltametrijska skena u otopini samog osnovnog elektrolita u rasponu potencijala od 0 do 1,4 V.

Potencijal oksidacije pimavanserina ne interferira s potencijalom oksidacije levodope koja je zlatni standard u liječenju Parkinsonove bolesti, što ukazuje na mogućnost razvoja nove voltametrijske metode za istovremeno određivanje oba lijeka. Oksidacijski pikovi ropinorola i pimavanserina se preklapaju pa modificirana površina kombinacijom nanomaterijala GRNT i GRNP nije kandidat za njihovu istovremenu analizu.

## 6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

**A** površina radne elektrode

**AUC** površina ispod krivulje (engl. *Area Under Curve*)

$\alpha$  koeficijent prijelaza elektrona

**BR** Britton-Robinson

**CNF** ugljikova nanovlakna (engl. *carbon nanofibers*)

**CV** ciklička voltometrija (engl. *cyclic voltammetry*)

**CYP** citokrom P450

$c_0$  koncentracija analita

**D** difuzijski koeficijent

**DNA** deoksiribonukleinska kiselina

**DNP** dijamantni nanoprah (engl. *diamond nanopowder*)

**E<sub>pc</sub>** potencijal vrha redukcije analita na voltamogramu

**E<sub>pa</sub>** potencijal vrha oksidacije analita na voltamogramu

**FDA** Američka uprava za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*)

**GC** staklasti ugljik (engl. *glassy carbon*)

**GCE** elektroda od staklastog ugljika (engl. *glassy carbon electrode*)



**GRO** grafen oksid (engl. *graphene oxide*)

**GRNP** grafen nanopločice (engl. *graphene nanoplatelets*)

**GRNT** višeslojne grafitizirane ugljikove nanocjevčice (engl. *graphitized MWNTs*)

**HPLC** tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high-performance liquid chromatography*)

**$I_p$**  vršna jakost struje voltametrijskog vala

**$i_{pc}$**  vršna jakost struje voltametrijskog vala na katodi

**$i_{pa}$**  vršna jakost struje voltametrijskog vala na anodi

**MAO-B** monoaminooksidaza-B

**$n_a$**  broj elektrona u koraku prijenosa naboja

**pH** negativni logaritam brojčane vrijednosti koncentracije ( $\text{molL}^{-1}$ ) vodikovih iona

**R** opća plinska konstanta

**SWV** pravokutnovalna voltometrija (engl. *square-wave voltammetry*)

**T** apsolutna temperatura

**$t_{ak}$**  vrijeme akumulacije

**5-HT** 5-hidroksitriptamin (serotonin)

## 7. LITERATURA

Amini F, Ehrmann A, Yadav D. Recent advances in carbon nanofibers and their applications – A review, *Eur. Polym. J.*, 2020, 138.

Babić S, Radić I, Runje M. Development of an analytical method for the determination of pimavanserin and its impurities applying analytical quality by design principles as a risk-based strategy, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2021, 201.

Brett AMO and Brett CMA. *Electrochemistry Principles, Methods, and Applications*. Portugal, Oxford science publications, 1993, str. 220.

Cruz MP. Pimavanserin (Nuplazid): A Treatment for Hallucinations and Delusions Associated With Parkinson's Disease. *P&T.*, 2017, 42(6), 368-371.

Cyclic Voltammetry Basic Principles, Theory and Setup, 2018., <https://www.ossila.com>, pristupljeno 23.11.2021.

Elgrishi N, Rountree KJ, McCarthy BD, Rountree ES, Eisenhart TT, Dempsey JL. A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *J Chem Educ*, 2018, 95(2), 197–206.

European Pharmacopoeia 10th edition, Council of Europe, Strasbourg, 2021.

Friedman JH. Pimavanserin for the treatment of Parkinson's disease psychosis. *Expert Opin Pharmacother*, 2013, 14(14), 1969-1975.

Geim AK. Graphene: Status and Prospects. *Science*, 2009, 324(5934), str. 1530-1534.

Hacksell U, Burstein ES, McFarland K, Mills RG, Williams H. On the discovery and development of pimavanserin: a novel drug candidate for Parkinson's psychosis. *Neurochem Res*, 2014, 39(10), 2008-2017.

Highlights of prescribing information, 2020., <https://www.nuplazid.com>, pristupljeno 19.11.2021.

Jackson BP, Dietz SM, Wightman RM. Fast-scan cyclic voltammetry of 5-hydroxytryptamine. *Anal Chem*, 1995, 67(6), 1115-1120.

Kiekens P, Priniotakis G, Westbroek P. Analytical Electrochemistry in Textiles. New York, Woodhead Publishing Limited, 2005, str. 65-67.

Kilmartin PA, Makhotkina O. The use of cyclic voltammetry for wine analysis: Determination of polyphenols and free sulfur dioxide. *Anal Chim Acta*, 2020, 668(2), 155-165.

Kounaves SP. Voltammetric Techniques. U: Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry, Settle FA, urednik, Upper Saddle River, Prentice Hall PTR, 1997, str. 771-719.

Madkour LH. Classification of Nanostructured Materials. U: Nanoelectronic Materials, Advanced Structured Materials, Springer, Cham, 2019, str. 269-307.

Mohamed KN, Godon E, Johan S, Jaafar FS. Distribution of dissolved aluminium (Dal) in seawater at pulau perhentian. *Malaysian J Anal Sci*, 2019, 23(6), 1044–1053.

National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 11672491, Pimavanserin, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, pristupljeno 25.3.2022.

Nigović B, Behetić S. Elektroanalitika u farmaciji. *Farm Glas*, 2007, 3(63), 163-175.

Nigović B, Mornar A, Brusač E, Jeličić ML. Selective sensor for simultaneous determination of mesalazine and folic acid using chitosan coated carbon nanotubes functionalized with amino groups, *J. Electroanal. Chem.*, 2019, 851.

Nigović B, Sadiković M, Sertić M. Multi-walled carbon nanotubes/Nafion composite film modified electrode as a sensor for simultaneous determination of ondansetron and morphine, *Talanta*, 2014, 122, 187-194.

Nprouzi P, Qomi M, Nemati A, Ganjali MR. Determination of Anti Colon Cancer Drug, Irinotecan by Fast Fourier Transforms Continuous Cyclic Voltammetry. *Int J Electrochem Sci*, 2009, 4, 1248 – 1261.

Nuplazid (pimavanserin): SPONSOR BACKGROUND INFORMATION FOR A MEETING OF THE PSYCHOPHARMACOLOGIC DRUGS ADVISORY COMMITTEE ON 29 MARCH 2016, 2016., <https://www.fda.gov>, pristupljeno 19.11.2021.

Ozkan SA, Uslu B. Electroanalytical Methods for the Determination of Pharmaceuticals: A Review of Recent Trends and Developments. *Anal Lett*, 2011, 44(16), 2644-2702.

Parkinsonova bolest – simptomi, dijagnoza i liječenje, 2014., <https://www.plivamed.net> pristupljeno 19.11.2022.

Piljac I. Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, 2010, str. 391-436.

Poveda RL, Gupta N. Carbon nanofiber reinforced polymer composites. New York City, Springer, 2016, str. 12.

Simões FR, Xavier MG. Electrochemical Sensors. U: Nanoscience and its Applications, Da Róz AL, Ferreira M, Leite FL, Oliveir ON, urednici, Elsevier, 2017, str. 155-178.

Wang HP, Bi KS, Chen XH, Gao S, Wang SJ, Wang SX, Wang Y, Zhang YY, Zhao LS. Development of a UPLC-MS/MS method for determination of pimavanserin tartrate in rat plasma: Application to a pharmacokinetic study, *J. Pharm. Anal.*, 2017, 7(6), 406-410.

Wang J. Analytical Electrochemistry. New York, Wiley-VCH, 2000, str. 28-138.

Yoo EH, Lee SY. Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice. *Sensors*, 2010, 10(5), 4558-4576.

Zahed FM, Hatamluyi B, Lorestani F, Es'haghi Z. Silver nanoparticles decorated polyaniline nanocomposite based electrochemical sensor for the determination of anticancer drug 5-fluorouracil, *J Pharm Res Biomed Anal*, 2018, 161, 12-19.

2D Structure image of CID 1167491 (pimavanserin tartarate), <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, pristupljeno 25.3.2022.

## 8. SAŽETAK/SUMMARY

### 8.1 SAŽETAK

Parkinsonova bolest je kronična neurodegenerativna bolest, a liječenje bolesti usmjereno je na kontrolu motoričkih i nemotoričkih simptoma. Pimavanserin je prvi antipsihotik s indikacijom za liječenje halucinacija i deluzija u psihozama povezanih s Parkinsonovom bolešću.

Svrha ovoga rada bila je pronalaženje osnove za razvoj nove elektroanalitičke metode za određivanje pimavanserina utvrđivanjem elektroanalitičkih svojstava lijeka cikličkom i pravokutnovalnom voltametrijom.

Snimanjem cikličkih voltamograma dokazana je ireverzibilna oksidacija pimavanserina, a najbolji voltametrijski odgovor dobiven je analizom otopine pimavanserina na elektrodi od staklastog ugljika (GCE) u 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kao osnovnom elektrolitu.

Modifikacijom GCE nanomaterijalima u 0,3%-tnoj etanolnoj otopini Nafiona dobiveni su još bolji voltametrijski odgovori zbog povećanja aktivne površine elektrode i elektrokatalitičkog utjecaja nanomaterijala na oksidaciju lijeka. Kombinacija nanomaterijala grafitiziranih ugljikovih nanocjevčica i grafenovih nanopločica (1:1) u 0,3%-tnoj etanolnoj otopini Nafiona dala je najbolje voltametrijske odgovore. Također, Nafion kao polimer pridonosi boljoj adheziji nanomaterijala na površinu GCE, a kao kationsko izmjenjivačka smola ostvaruje elektrostatske interakcije s pozitivno nabijenim skupinama pimavanserina u kiselom mediju. Potencijal oksidacije pimavanserina na tako modificiranoj GCE iznosi 1,21 V u 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kao osnovnom elektrolitu pri definiranim optimalnim uvjetima pravokutnovalne voltametrije (frekvencija 75 Hz, amplituda 20 mV te porast potencijala 4 mV).

Postoji mogućnost razvoja nove elektroanalitičke metode za istovremeno određivanje pimavanserina i levodope jer njihovi potencijali oksidacije ne interferiraju, no kombinacija pimavanserina i ropinorola nije dobar kandidat za istovremenu analizu zbog preklapanja oksidacijskih pikova lijekova.

## 8.2 SUMMARY

Parkinson's disease is a chronic neurodegenerative disease and its treatment is aimed at controlling motor and nonmotor symptoms. Pimavanserin is the first antipsychotic with an indication for treatment of hallucinations and delusions in psychoses associated with Parkinson's disease.

The aim of this paper was to determine the basis for the development of a new electroanalytical method for the determination of pimavanserin by determining the electroanalytical properties of the drug by cyclic and square-wave voltammetry.

Irreversible oxidation of pimavanserin was demonstrated by scanning cyclic voltammograms. The best voltammetric response was obtained by analysing pimavanserin solution on a glassy carbon electrode (GCE) in 0.1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as the background electrolyte.

Modification of GCE by nanomaterials in 0.3% Nafion ethanolic solution yielded even better voltammetric responses due to the increase in the active surface of the electrode, and the electrocatalytic effect of the nanomaterials on drug oxidation. The combination of nanomaterials of graphitized carbon nanotubes and graphene nanoplatelets (1:1) in 0.3% Nafion ethanolic solution gave the best voltammetric responses. Nafion as polymer contributes to better adhesion of nanomaterials to the GCE surface. Also, as cation exchange membrane, it achieves electrostatic interactions with protonated groups of pimavanserin in an acidic medium. The oxidation potential of pimavanserin at such a modified GCE is 1.21 V in 0.1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> under defined optimal conditions of square-wave voltammetry (75 Hz frequency, 20 mV amplitude and 4 mV potential step).

There is a possibility of developing a new electroanalytical method for the simultaneous determination of pimavanserin and levodopa as their oxidation potentials do not interfere. However, the combination of pimavanserin and ropinorol is not a good candidate for simultaneous analysis due to overlapping drug oxidation peaks.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### RAZVOJ NOVE ELEKTROANALITIČKE METODE ZA ODREĐIVANJE PIMAVANSERINA

Ana Jančec

#### SAŽETAK

Parkinsonova bolest je kronična neurodegenerativna bolest, a liječenje bolesti usmjereno je na kontrolu motoričkih i nemotoričkih simptoma. Pimavanserin je prvi antipsihotik s indikacijom za liječenje halucinacija i deluzija u psihozama povezanih s Parkinsonovom bolešću.

Svrha ovoga rada bila je pronalaženje osnove za razvoj nove elektroanalitičke metode za određivanje pimavanserina utvrđivanjem elektroanalitičkih svojstava lijeka cikličkom i pravokutnovalnom voltametrijom.

Snimanjem cikličkih voltamograma dokazana je ireverzibilna oksidacija pimavanserina, a najbolji voltametrijski odgovor dobiven je analizom otopine pimavanserina na elektrodi od staklastog ugljika (GCE) u 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kao osnovnom elektrolitu.

Modifikacijom GCE nanomaterijalima u 0,3%-tnoj etanolnoj otopini Nafiona dobiveni su još bolji voltametrijski odgovori zbog povećanja aktivne površine elektrode i elektrokatalitičkog utjecaja nanomaterijala na oksidaciju lijeka. Kombinacija nanomaterijala grafitiziranih ugljikovih nanocjevčica i grafenovih nanopločica (1:1) u 0,3%-tnoj etanolnoj otopini Nafiona dala je najbolje voltametrijske odgovore. Također, Nafion kao polimer pridonosi boljoj adheziji nanomaterijala na površinu GCE, a kao kationsko izmjenjivačka smola ostvaruje elektrostatske interakcije s pozitivno nabijenim skupinama pimavanserina u kiselom mediju. Potencijal oksidacije pimavanserina na tako modificiranoj GCE iznosi 1,21 V u 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kao osnovnom elektrolitu pri definiranim optimalnim uvjetima pravokutnovalne voltametrije (frekvencija 75 Hz, amplituda 20 mV te porast potencijala 4 mV).

Postoji mogućnost razvoja nove elektroanalitičke metode za istovremeno određivanje pimavanserina i levodope jer njihovi potencijali oksidacije ne interferiraju, no kombinacija pimavanserina i ropinorola nije dobar kandidat za istovremenu analizu zbog preklapanja oksidacijskih pikova lijekova.

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

Rad sadrži: 42 stranice, 22 grafičkih prikaza, 2 tablica i 33 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Pimavanserin, ciklička voltetrija, pravokutnovalna voltetrija, modifikacija GCE, nanomaterijali

Mentor: **Prof. dr. sc. Biljana Nigović** redoviti profesor u trajnom zvanju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

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

**Doc. dr. sc. Jasna Jablan** docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Izv. prof. dr. sc. Sandra Jurić** izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: lipanj 2022.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### DEVELOPMENT OF A NEW ELECTROANALYTICAL METHOD FOR DETERMINATION OF PIMAVANSERIN

Ana Jančec

#### SUMMARY

Parkinson's disease is a chronic neurodegenerative disease and its treatment is aimed at controlling motor and nonmotor symptoms. Pimavanserin is the first antipsychotic with an indication for treatment of hallucinations and delusions in psychoses associated with Parkinson's disease.

The aim of this paper was to determine the basis for the development of a new electroanalytical method for the determination of pimavanserin by determining the electroanalytical properties of the drug by cyclic and square-wave voltammetry.

Irreversible oxidation of pimavanserin was demonstrated by scanning cyclic voltammograms. The best voltammetric response was obtained by analysing pimavanserin solution on a glassy carbon electrode (GCE) in 0.1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as the background electrolyte.

Modification of GCE by nanomaterials in 0.3% Nafion ethanolic solution yielded even better voltammetric responses due to the increase in the active surface of the electrode, and the electrocatalytic effect of the nanomaterials on drug oxidation. The combination of nanomaterials of graphitized carbon nanotubes and graphene nanoplatelets (1:1) in 0.3% Nafion ethanolic solution gave the best voltammetric responses. Nafion as polymer contributes to better adhesion of nanomaterials to the GCE surface. Also, as cation exchange membrane, it achieves electrostatic interactions with protonated groups of pimavanserin in an acidic medium. The oxidation potential of pimavanserin at such a modified GCE is 1.21 V in 0.1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> under defined optimal conditions of square-wave voltammetry (75 Hz frequency, 20 mV amplitude and 4 mV potential step).

There is a possibility of developing a new electroanalytical method for the simultaneous determination of pimavanserin and levodopa as their oxidation potentials do not interfere. However, the combination of pimavanserin and ropinorol is not a good candidate for simultaneous analysis due to overlapping drug oxidation peaks.

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

Thesis includes: 42 pages, 22 figures, 2 tables and 33 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Pimavanserin, cyclic voltammetry, square-wave voltammetry, modification of GCE, nanomaterials

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

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

**Jasna Jablan, Ph.D.** *Assistant professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

**Sandra Jurić, Ph.D.** *Associate professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

The thesis was accepted: June 2022