

Selektivnost voltametrijske metode za istovremeno određivanje pimavanserina i levodope

Fuš, Petar

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:163:095747>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-29**



Repository / Repozitorij:

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



Petar Fuš

**Selektivnost voltametrijske metode za
istovremeno određivanje pimavanserina i
levodope**

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 na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Biljane Nigović.

Veliko hvala mojoj mentorici prof. dr. sc. Biljani Nigović na velikoj pomoći, izuzetnoj posvećenosti, uloženom vremenu i trudu prilikom izrade ovog diplomskog rada. Zahvaljujem se i svim profesorima, docentima, asistentima, diplomandima, tehničkoj suradnici na jako ugodnoj i opuštеноj atmosferi prilikom eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se mnogobrojnim mojim prijateljima, s fakulteta i izvan njega, koji su moje fakultetske dane učinili veselim, zabavnim, lijepim i nezaboravnim.

Najveće hvala mojoj obitelji, mojim roditeljima, mlađem bratu, bakama i djedovima, koji su cijelo vrijeme vjerovali u meni i pružili mi snagu u svakome trenutku. Ovo je i vaš uspjeh.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. PARKINSONOVA BOLEST	2
1.1.1. PIMAVANSERIN	2
1.2. ELEKTROANALITIČKE METODE	5
1.2.1. VOLTAMETRIJA	6
1.2.1.1. STRIPPING VOLTAMETRIJA	8
1.2.1.2. PRAVOKUTNOVALNA VOLTAMETRIJA	10
1.2.2. KRUTE ELEKTRODE	12
1.2.2.1. STAKLASTA UGLJIKOVA ELEKTRODA	12
1.3. NANOMATERIJALI	14
1.3.1. GRAFEN	15
1.3.2. UGLJIKOVE NANOCJEVČICE	18
1.3.3. NAFION	19
2. OBRAZLOŽENJE TEME	21
3. MATERIJALI I METODE	23
3.1. KEMIKALIJE	24
3.2. RADNI INSTRUMENT	25
3.3. PRIPREMA OTOPINA	26
3.3.1.1. MATIČNA OTOPINA PIMAVANSERINA	26
3.3.1.2. RADNE OTOPINE PIMAVANSERINA	26
3.3.2.1. MATIČNA OTOPINA LEVODOPE	27
3.3.2.2. RADNE OTOPINE LEVODOPE	27
3.3.3.1. MATIČNA OTOPINA I RADNE OTOPINE GLUKOZE	28
3.3.4.1. MATIČNA OTOPINA I RADNE OTOPINE NATRIJEVA KLORIDA	28
3.3.5.1. MATIČNA OTOPINA I RADNE OTOPINE KALIJEVA KLORIDA	28
3.3.6.1. MATIČNA OTOPINA I RADNE OTOPINE NATRIJEVA KARBONATA	28

3.3.7.1. MATIČNA OTOPINA I RADNE OTOPINE NATRIJEVA HIDROGENFOSFATA	29
3.3.8.1. MATIČNA OTOPINA I RADNE OTOPINE MOKRAĆNE KISELINE.....	29
3.3.9.1. MATIČNA OTOPINA I RADNE OTOPINE DOPAMINA.....	29
3.3.10.1. MATIČNA I RADNA OTOPINA KVETIAPINA	30
3.3.12.1. MATIČNA I RADNA OTOPINA ENTAKAPONA.....	30
3.4. PRIPREMA ELEKTRODA	31
3.5. UVJETI MJERENJA.....	32
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	33
5. ZAKLJUČCI	53
6.POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA	56
6.1. KRATICE.....	57
7. LITERATURA	58
8. SAŽETAK/SUMMARY	61
8.1. SAŽETAK.....	62
8.2. SUMMARY.....	63

1. UVOD

1.1. PARKINSONOVA BOLEST

Parkinsonova bolest (PB) je iza Alzheimerove bolesti druga najčešća kronična neurodegenerativna bolest. Ime je dobila po dr. Jamesu Parkinsonu, koji je 1817. godine u eseju o „drhtećoj paralizi“ prvi puta opisao bolest (Vuletić, 2019). Radi se o neurodegenerativnoj bolesti SŽS-a, koja se manifestira tremorom (drhtanjem), rigorem (ukočenost), bradikinezijom (usporenost pokreta), posturalnom nestabilnošću, mikrografijom, grimasama lica, otežanim ustajanjem iz sjedećeg položaja itd. U PB-u dolazi do smanjenog stvaranja dopamina u *substantiji nigri*, smanjenja dopaminskih zaliha, zbog čega se javlja neravnoteža između acetilkolinskog i dopaminskog puta u strijatumu, te nemogućnosti kontrole složene motorike, što rezultira karakterističnim simptomima za PB. Iako je PB primarno klasificirana kao poremećaj kretanja, podaci ukazuju da otprilike 20% do 30% pacijenata s PB-om razvije psihozu, a najčešći simptomi su halucinacije i/ili deluzije. To može biti svojstveno samoj bolesti (pogotovo u uznapredovaloj fazi) ili biti rezultat štetnih učinak lijekova, koji se koriste za liječenje motoričkih simptoma (npr. agonista dopamina). Za neke pacijente, neuropsihijatrijske komplikacije, uvelike smanjuju kvalitetu života, a također i uzrok su većeg morbiditeta nego motoričke komplikacije (Cruz, 2017).

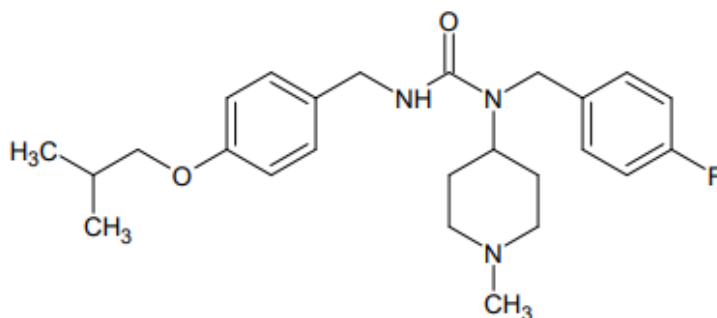
U liječenju PB-a najčešće se koriste lijekovi koji jačaju dopaminergijski sustav – levodopa, koja se najčešće koristi u kombinaciji sa svojim „lijekovima čuvarima“ – karbidopom i benzerazidom (inhibitori periferne dopa-dekarboksilaze) te tolkaponom, entakaponom i opikaponom (inhibitori katehol-O-metil transferaze, COMT). Još se koriste agonisti dopaminergičkih receptora: bromokriptin, ropinirol, pramipeksol, rotigotin, apomorfin, karbergolin, inhibitori monoamin-oksidge B – selegilin, razagilin, safinamid, te drugi lijekovi – amantadin, biperiden, pimavanserin itd.

1.1.1. PIMAVANSERIN

Kao što je već spomenuto, neuropsihijatrijske komplikacije (deluzije, halucinacije), uvelike smanjuju kvalitetu života osoba koje su oboljele od PB-a, a također i uzrok su većeg morbiditeta nego motoričke komplikacije. Unatoč upozorenjima, antipsihotici druge generacije su se često koristili za liječenje psihoze povezane s PB-om, ali su doveli do pogoršanja motornih simptoma i drugih neželjenih komplikacija i nuspojava. Primjerice, klopazin je često bio propisan za liječenje psihoza kod PB-a, ali su zabilježeni slučajevi

agranulocitoze. Potom je 2016. godine, od strane FDA-a, odobren pimavanserin, atipični antipsihotik koji ne izaziva značajan antagonizam dopaminergičnih, adrenergičnih, histaminergijskih ili muskarinskih receptora. To je prvi lijek koji je FDA odobrila za liječenje halucinacija i deluzija kod psihoza povezanih s PB-om (Cruz, 2017).

Pimavanserin [N-(4-fluorofenilmetil)-N-(1-metilpiperidin-4-il)-N'-(4-(2-metilpropiloksi)fenilmetil)karbamid] je lijek koji se koristi za liječenje Parkinsonove bolesti, a također se istražuje za liječenje Alzheimerove bolesti, psihoze, shizofrenije. Struktura pimavanserina je prikazana na slici 1. Molekulska formula mu je $C_{25}H_{34}FN_3O_2$, a molarna masa iznosi 427.6 g/mol (<https://www.caymanchem.com/>).



Slika 1. Struktura pimavanserina.

Djeluje kao selektivni inverzni agonist i antagonist 5-HT_{2A} receptora te se slabije veže na 5-HT_{2C} receptore. Smanjuje pojavnost halucinacija i deluzija pa je pogodan kod bolesnika koji imaju spomenute psihičke probleme u anamnezi, a boluju od PB-a (<https://go.drugbank.com/>). Tijekom kliničkih ispitivanja, gotovo 80% ispitanika, koji su bolovali od PB-a su pokazali značajno poboljšanje simptoma. Također, prilikom ispitivanja nije pokazao afinitet za dopaminske (D₂) receptore, histaminske, muskarinske i adrenergičke receptore, zbog čega ne pokazuje nuspojave kao neki antipsihotici koji usputno djeluju preko navedenih receptora.

Najvažnije nuspojave su da može produljiti trajanje QT intervala, pa može uzrokovati aritmije, zbog čega treba biti posebno oprezan ako se primjenjuje s drugim lijekovima koji također produžuju trajanje QT intervala – prokainamid, dizopiramid, amiodaron, sotalol, ziprasidon itd. Intenzivno se metabolizira preko CYP3A4 enzima i nešto slabije preko CYP3A5 enzima. Zbog toga ulazi u interakciju s induktorima (npr. fenitoin, karbamazepin) i inhibitorima (npr. klaritromicin, itrakonazol) CYP3A4 enzima. Veže se na proteine plazme i to 95%. Preporučena dnevna doza pimavanserina u liječenju PB-a je 34 mg, uzeta u dvije doze. Istraživanja su pokazala da spol, dob, težina ne utječu na farmakokinetiku lijeka, a hrana ne mijenja apsorpciju lijeka (Cruz, 2017).

1.2. ELEKTROANALITIČKE METODE

Elektroanalitičke metode su analitičke metode kod kojih se podatak o koncentraciji, aktivitetu ili nekom drugom termodinamičkom svojstvu određivane molekulske vrste dobiva u ovisnosti o električnom naponu, struji ili naboju. Imaju široku primjenu u farmaciji. Prema signalu pobude, čija je posljedica odvijanje elektrokemijske reakcije na radnoj elektrodi, i mjerenoj varijabli iz koje se dobiva željeni analitički podatak o ispitivanoj otopini, dijele se na: potenciometriju, voltometriju, amperometriju, elektrogravimetriju, kulometriju i konduktometriju.

Ljekovite tvari moraju se reducirati/oksidirati u doseg promjene potencijala radne elektrode, dok otapalo i elektrode u tom rasponu promjene potencijala moraju biti inertni. Ako ljekovita tvar ne sadrži funkcionalnu skupinu podložnu oksidaciji ili redukciji, derivatizacijom se može prevesti u elektroaktivnu. Funkcionalne grupe, poput nitro, nitrozo, azo, azoksi, azometinske, kao i aktivirani karbonili i dvostruke veze mogu se analizirati elektrokemijski (Nigović i Behetić, 2007).

Sve elektroanalitičke metode imaju zajedničko obilježje. Naime, pri provedbi elektroanalitičkoga postupka uvijek se u elektrokemijskoj ćeliji nalazi radna ili indikatorska elektroda na kojoj se odvija elektrokemijska reakcija. Posljedica elektrokemijske reakcije jest analogna električna veličina odnosno odzivni signal. Mjerenjem signala odziva dobivamo željeni analitički ili drugi podatak o ispitivanoj otopini (Piljac, 2010).

Elektrokemija je brzorastuće područje s nizom mogućih primjena na području farmacije. Može se koristiti u ranoj fazi istraživanja lijekova i promatranja aktivnosti novo sintetiziranih molekula povezanih s reakcijama prijenosa elektrona. U farmaceutskim istraživanjima i razvoju, elektrokemijske tehnike primjenjuju se u studijama biotransformacije, interakcijama lijekova i proteina i interakcijama lijeka i DNA, a imaju primjenu i u Europskoj farmakopeji (npr. amperometrijska titracija, kojom se određuje točka ekvivalencije u postupku određivanja vode u ljekovitim tvarima Karl-Fischerovom titracijom (npr. u ispitivanju čistoće cefaleksima, betametazon acetata), ili potenciometrijska titracija kojom se određuje sadržaj onečišćenja u farmaceutskim tvarima (npr. fluorida u kalcijevom askorbatu; Slika 2) (Nigović i Behetić, 2007).

Fluorides: maximum 10 ppm.

Potentiometry (2.2.36, Method I).

Test solution. In a 50 mL volumetric flask, dissolve 1.000 g in a 10.3 g/L solution of hydrochloric acid R, add 5.0 mL of fluoride standard solution (1 ppm F) R and dilute to 50.0 mL with a 10.3 g/L solution of hydrochloric acid R. To 20.0 mL of the solution add 20.0 mL of total-ionic-strength-adjustment buffer R and 3 mL of an 82 g/L solution of anhydrous sodium acetate R. Adjust to pH 5.2 with ammonia R and dilute to 50.0 mL with distilled water R.

Reference solutions. To 0.25 mL, 0.5 mL, 1.0 mL, 2.0 mL and 5.0 mL of fluoride standard solution (10 ppm F) R add 20.0 mL of total-ionic-strength-adjustment buffer R and dilute to 50.0 mL with distilled water R.

Indicator electrode: fluoride selective.

Reference electrode: silver-silver chloride.

Take into account the addition of fluoride to the test solution for the calculation.

Slika 2. Potenciometrijsko određivanje fluorida kao onečišćenja u kalcijevom askorbatu u 10. izdanju Europske farmakopeje (2020.)

Zanimljivo je da su elektrokemijski senzori našli primjenu i u svakodnevnom životu i rutinskim analizama, a jedan takav senzor, poznat dijabetičarima, jest amperometrijski senzor glukoze, koji se koristi za određivanje koncentracije glukoze u krvi. Glukoza se glukoza oksidazom 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

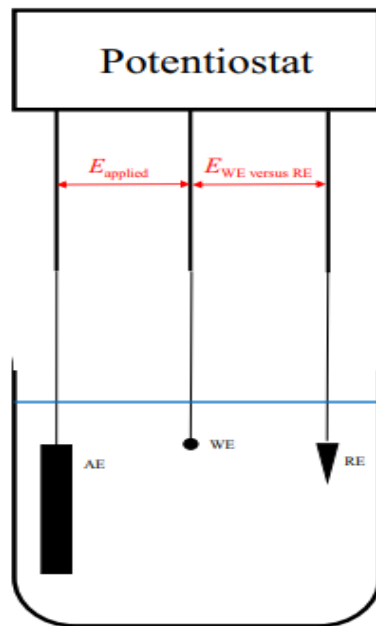
Povijesno gledano voltametrija se razvila otkrićem polarografije 1922. godine, češkog kemičara Jaroslava Heyrovskog, za što je nagrađen Nobelovom nagradom 1959. godine. Rane voltametrijske metode nailazile su na niz problema, što ih nije činilo prikladnima za rutinske analize, no 60-ih i 70-ih godina 20. stoljeća postignuti su veliki pomaci u svim aspektima voltametrije (teoriji, metodologiji i radnim instrumentima), čime se povećala osjetljivost te proširio repertoar analitičkih metoda (Kounaves, 1997).

Voltametrija je elektroanalitička metoda koja se temelji na mjerenju struje radne elektrode koja je nastala kontinuiranim mijenjanjem njezinog potencijala (Nigović i Behetić, 2007), što znači da su primijenjeni potencijal E (V) i vrijeme t (s) nezavisne varijable, dok je struja I (A) zavisna varijabla. Prikaže li se ovisnost struje o potencijalu, dobiva se voltamogram. Da bi se određena kemijska tvar mogla odrediti voltametrijskom metodom, ona mora biti elektroaktivna, što znači da se mora moći oksidirati/reducirati. Postoje različite vrste voltametrijskih metoda: ciklička, diferencijalno pulsna, *stripping* voltametrija (metoda

otapanja pretkoncentriranog analita), polarografija, abrazivna voltometrija otapanja (Nigović i Behetić, 2007).

Voltometrija ima široku primjenu u analitici lijekova. Primjenjuje se u identifikaciji ljekovitih tvari određivanjem redoks potencijala, određivanju sadržaja ljekovitih tvari u različitim uzorcima (prikazom ovisnosti struje o koncentraciji), elektrokemijskoj detekciji eluiranih analita HPLC metodama, praćenje interakcije lijekova s metalnim ionima, proteinima ili DNA itd.

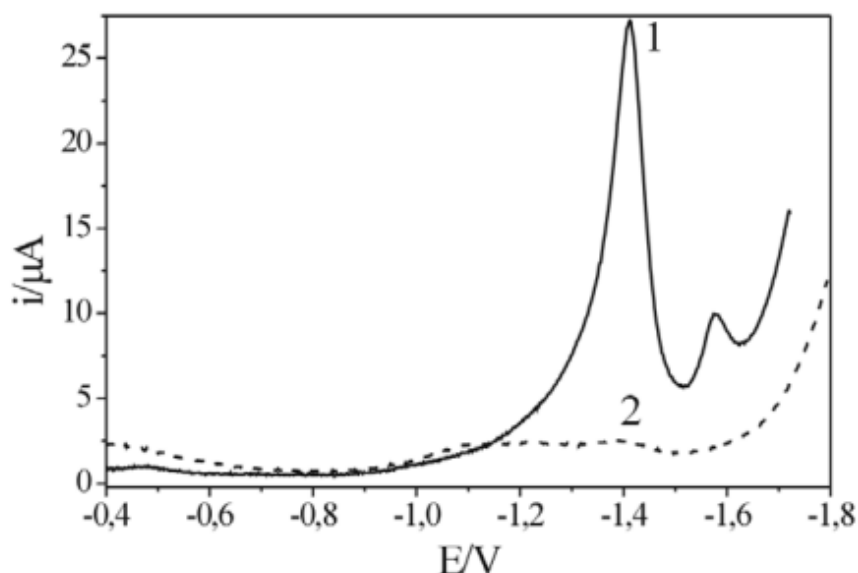
Moderni se voltometrijski instrument sastoji od računala, potenciostata i elektrokemijskog članka (Slika 3). Potenciostat vrši ulogu primjene poznatog potencijala te mjerenja jakosti struje (Kounaves 1997). Elektrokemijski članak služi kao nosač, u kojem se nalazi otopina analita, u koju su uronjene radna, pomoćna ili protuelektroda i referentna elektroda. Radnu elektrodu u voltometriji karakterizira mala površina zbog sprječavanja razgradnje analita te radi pospješivanja polarizacije (Nigović i Behetić, 2007). Referentna elektroda ima poznati stalni električni potencijal te se koristi za kontrolu potencijala radne elektrode, tako što se mjeri napon između njih (Scholz, 2015). Struja se mjeri između radne i pomoćne elektrode (signal odziva), a potencijal između radne i referentne elektrode (signal pobude). Na radnoj se elektrodi odvija redoks reakcija – reakcija oksidacije ili reakcija redukcije. Reakcija redukcije se odvija na kapajućoj ili statičnoj živinoj elektrodi, visećoj živinoj kapi ili živinoj film elektrodi. Za oksidacijske reakcije koriste se krute elektrode, kao što su staklasta ugljikova elektroda (GCE), zlatna elektroda, platinska elektroda, grafitne elektrode itd (Nigović i Behetić, 2007).



Slika 3. Shematski prikaz elektrokemijskog članka s tri elektrode (AE – pomoćna elektroda, WE – radna elektroda, RE – referentna elektroda). (Scholz, 2015.)

1.2.1.1. STRIPPING VOLTAMETRIJA

Stripping voltometrija uključuje pretkoncentriravanje analita na površinu elektrode prije voltametrijskog mjerenja. Pri određenom potencijalu se analit, iz otopine koja se miješa, istaloži na površinu radne elektrode (Piljac, 2010). Zbog toga je koncentracija analita na površini elektrode veća nego u otopini. To je razlog radi čega se *stripping* voltametrijom mogu odrediti vrlo male koncentracije analita (10^{-8} do 10^{-11} M) (Slika 4). Nakon nekog zadanog vremena, miješanje za zaustavlja, a vrijeme tijekom kojeg se analit miješao i pretkoncentriravao na površinu elektrode nazivamo vremenom akumulacije (Nigović i Behetić, 2007). Nakon toga, promjenom potencijala, „skidamo“ istaloženi analit s površine radne elektrode, a analit određujemo voltametrijski. Otapanje depozita s površine elektrode naziva se engleski „*stripping*“, pa se zato metoda naziva *stripping* metodom. Voltometrija s pretkoncentriravanjem uzorka je metoda izuzetno velike osjetljivosti (Piljac 2010). Mjerenje se obavlja primjenom diferencijalno pulsne ili pravokutnovalne voltametrije. Istaloženi analit se radi promjene potencijala može ili oksidirati ili reducirati natrag u otopinu, zbog čega razlikujemo dvije vrste *stripping* voltametrije: anodna *stripping* voltometrija (ako se analit oksidira) i katodna *stripping* voltometrija (ako se analit reducira). Signal odziva, struja koja je snimljena tijekom mjerenja je proporcionalna koncentraciji analita.



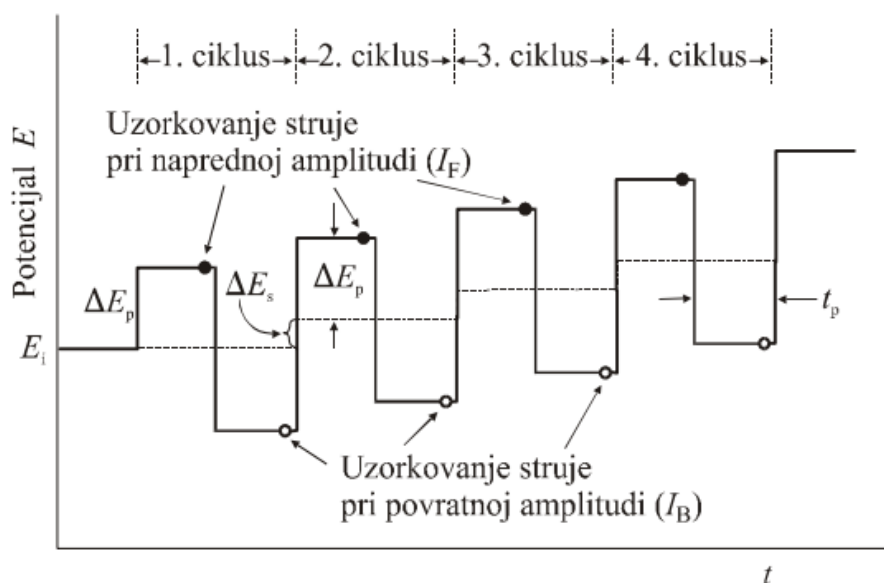
Slika 4. Pravokutnovalni voltamogram simvastatina na visećoj živinoj kapi u 0,1 M fosfatnom puferu pri pH 7 prije (2) i nakon akumulacije (1) od 30 sekundi. (Nigović i Behetić, 2007)

U analitici lijekova najčešće se analit istaloži na površini elektrode adsorpcijom te zbog toga tehniku nazivamo voltametrijom s adsorptivnom akumulacijom. U elektrokemiji adsorpcija podrazumijeva čvrsto vezanje molekula ili iona iz otopine na površinu elektrode, pri čemu dolazi do stvaranja monomolekularnog sloja adsorbiranih molekula. Tijekom akumulacije treba primijeniti optimalne uvjete za adsorpciju analita da bi se postigla maksimalna osjetljivost metode. Visina strujnoga vrha ovisi o mnogo čimbenika, kao što su vrsta i površina elektrode, vrijeme i potencijal akumulacije, svojstva analita, otapalo, ionska jakost, pH i temperatura. Da bi se povećala selektivnost metode, adsorpcija analita može se izvesti uranjanjem elektroda u miješanu otopinu uzorka tijekom zadanoga vremena akumulacije. Elektrode se potom isperu i premjeste u čistu otopinu osnovnog elektrolita u kojem se provodi voltametrijsko mjerenje. Analit je koncentriran na elektrodi, a mjerenje se provodi u čistom otapalu pa nema interferencija matrice uzorka.

Voltometrija s adsorptivnom akumulacijom popularna je u analizi ljekovitih tvari zbog visoke osjetljivosti, selektivnosti, točnosti i preciznosti, kao i zbog niskih troškova analize u usporedbi s ostalim analitičkim metodama (Nigović i Behetić, 2007).

1.2.1.2. PRAVOKUTNOVALNA VOLTAMETRIJA

U pravokutnovalnoj voltametriji (SWV), signal pobude, koji se primjenjuje na radnu elektrodu, sastoji se od osnovnog stepeničastog napona (E_p) na koji se superponira izmjenični pravokutni puls (ΔE_p) (Slika 5). Struja se mjeri dvaput tijekom jednog ciklusa: pri kraju trajanja pozitivne poluperiode i pri kraju trajanja negativne poluperiode izmjeničnog pravokutnog impulsa. U metodi se zapisuje struja odziva kao razlika struja pri jednoj (negativnoj), odnosno drugoj (pozitivnoj) poluperiodi izmjeničnog pravokutnog signala pobude za svaki pojedini ciklus pobude. (Piljac, 2010.)



Slika 5. Prikaz promjene potencijala i vremena uzorkovanja struje u pravokutnovalnoj voltametriji. (Piljac, 2010.)

Najveća prednost pravokutnovalne voltametrije je brzina. Frekvencije od 1 do 100 ciklusa u sekundi omogućuju upotrebu ekstremno brzih promjena potencijala, čime se vrijeme analize značajno skraćuje, a sam voltamogram može biti snimljen i za nekoliko sekundi. Tehnika je

pogodna za brza, jednostavna i točna određivanja ljekovitih tvari u farmaceutskim ili biološkim uzorcima, a može se primjenjivati i za istraživanje mehanizma prijenosa elektrona. Kao što je i već prethodno navedeno, struja se mjeri dvaput: polazni puls stvara katodnu struju, a povratni anodnu, a razlika tih struja je proporcionalna koncentraciji analita u otopini, te se dobiveni potencijal maksimuma može upotrijebiti za potvrdu identiteta analita (Nigović i Behetić 2007).

1.2.2. KRUTE ELEKTRODE

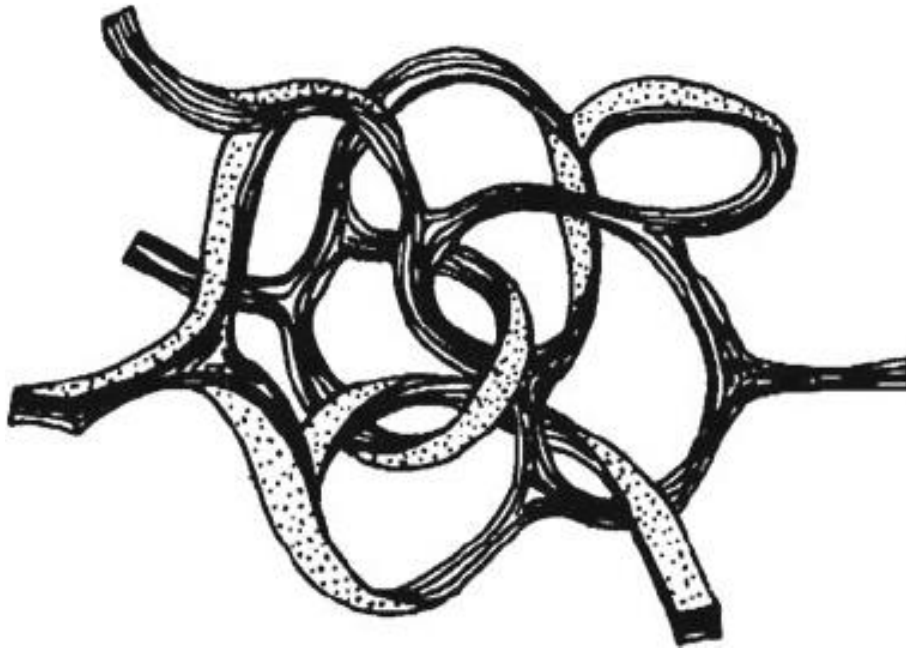
Čvrste elektrode, koje se koriste u analitičkim ispitivanjima, su izrađene od plemenitih metala: platine, zlata, rodija, iridija, srebra i drugih kovina, a često su u upotrebi i elektrode izrađene od ugljika (grafita). To su elektrode izrađene od staklastog ugljika, grafitne paste, u vosku impregniranoga grafita, odnosno borova karbida (Piljac, 2010).

Danas se krute elektrode s proširenim rasponom potencijala vrlo često primjenjuju u analitičkim ispitivanjima. Glavni razlog je ograničeni anodni raspon potencijala živinih elektroda, što uvelike smanjuje njihovu primjenu u analitici tvari koje oksidiraju. Također, samo rukovanje krutim elektrodama je puno jednostavnije jer su čvršće i stabilnije (Ozkan i Uslu, 2011). Lako se koriste kod visokih temperatura i u velikom rasponu tlaka, a mala veličina i netoksičnost ih čini idealnima za *in vivo* istraživanja. Bitan faktor kod krutih elektroda je ovisnost odgovora o površinskom stanju elektrode. Zbog toga, uporaba takvih elektroda zahtijeva predobradu te poliranje same elektrode kako bi rezultati bili što reproducibilniji. Za metalne elektrode se najčešće koristi mehaničko poliranje, dok se za ugljikove elektrode primjenjuju razni elektrokemijski, kemijski ili termalni postupci (Brusač, 2018). S druge strane, glavni nedostaci krutih elektroda su slaba reprodukcija radne površine i njezino lako onečišćenje (Piljac, 2010).

1.2.2.1. STAKLASTA UGLJIKOVA ELEKTRODA

Zbog svojih kemijskih i fizikalnih svojstava, staklasta ugljikova elektroda (GCE) je vrlo popularna. Staklasti ugljik ima široki raspon potencijala, kemijski je inertan, otporan na otapala i daje relativno reproducibilne rezultate. Također, odlikuje ga niska brzina oksidacije i niska permeabilnost za plinove i tekućine (Dekanski i sur., 2001).

Jenkins i Kawamura su analizirali mehanizam karbonizacije i strukturu staklastog ugljika različitim tehnikama i zaključili da se materijal sastoji od tankih „molekulskih vrpca“, koje su nasumično orijentirane, zapetljane i smotane na kompliciran način (Slika 6) (Dekanski i sur., 2001). Materijal se priprema pažljivim zagrijavanjem predmodelirane polimerne smole u inertnoj atmosferi.



Slika 6. Prikaz strukture staklastog ugljika koju su analizirali i opisali Jenskins i Kawamura.
(<https://www.researchgate.net/>)

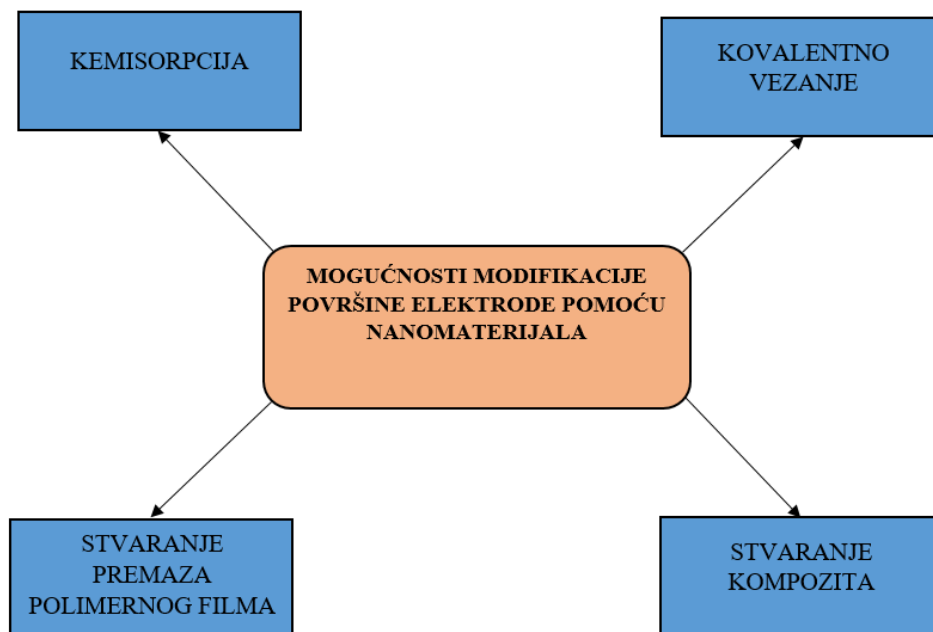
Zbog visoke gustoće i male veličine pora, GCE ne zahtjeva proces impregnacije, no često se radi predobrada površine kako bi se osigurala aktivirana i reproducibilna GCE, i uvećala analitička točnost i učinkovitost. To se radi poliranjem elektrode pomoću aluminijskih čestica promjera oko 0,05 μm na tkanini te ispiranjem s demineraliziranom vodom (Brusač, 2018).

Danas se staklasta ugljikova elektroda često koristi u analitičkim ispitivanjima, a sama površina se vrlo lako modificira. Najčešće se koristi u voltametrijskim i potenciometrijskim ispitivanjima.

1.3. NANOMATERIJALI

Nanomaterijali su materijali čije su strukturne komponente manje od 1 μm barem u jednoj dimenziji, iako ih se danas sve više opisuje kao čestice veličine do 100 nm, odnosno 50 nm. Nanočestice mogu biti amorfne ili kristalnog oblika (Buzea i sur., 2007). Budući da električna, toplinska, optička, magnetska i druga svojstva tvari ovisi o elektronskoj strukturi, nanočestice imaju i specifična svojstva (Piljac, 2010), pa ih zbog toga možemo smatrati posebnim stanjem tvari, uz kruto, tekuće, plinovito stanje i plazme (Buzea i sur., 2007).

Modifikacijom površine elektrode pomoću nanomaterijala moguće je poboljšati parametre metode: osjetljivost, preciznost, reproducibilnost itd. To se može postići korištenjem različitih pristupa (Slika 7): a) kemisorpcijom (modifikator se ireverzibilno adsorbira na površinu elektrode, tvoreći monosloj), b) stvaranjem kovalentne veze (kemijski modifikatori se vežu na površinu elektrode i mogu tvoriti monosloj ili višesloj), c) stvaranjem premaza polimernog filma, d) stvaranjem kompozita (matrica se pomješa s modifikatorom i nastaje kompozit) (Srivastava i sur., 2019).

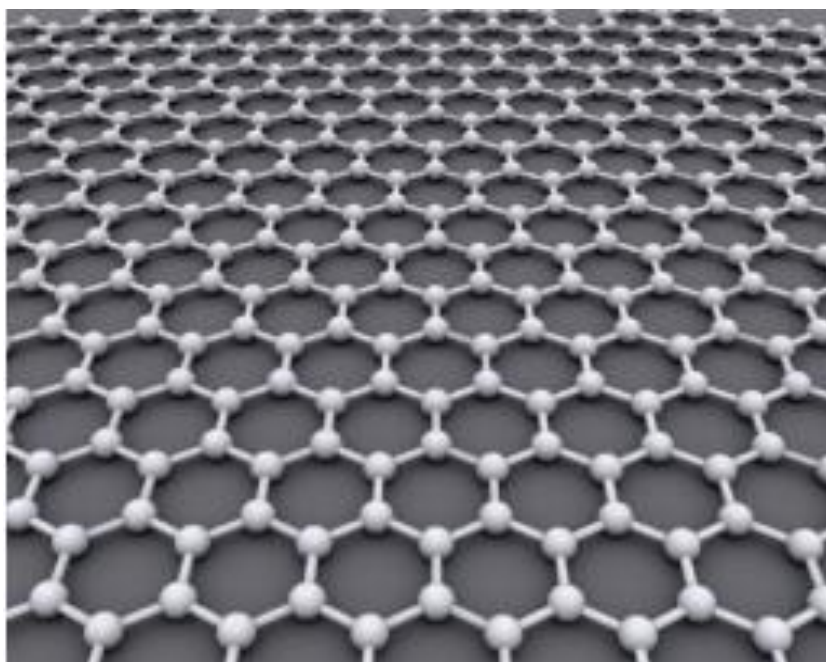


Slika 7. Slikoviti prikaz pripreme kemijski modificirane elektrode.

Neki od korištenih nanomaterijala u elektroanalitici su grafen u raznim oblicima, nanočestice metala (zlato, paladij itd.) i metalnih oksida.

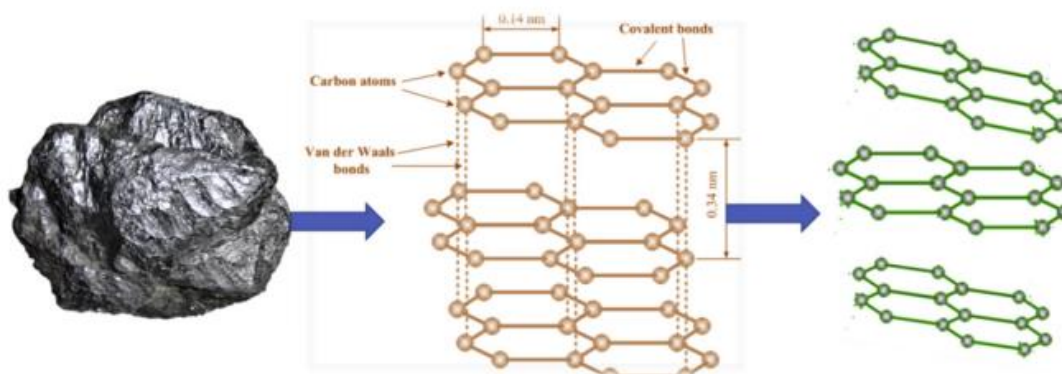
1.3.1. GRAFEN

Grafen je materijal koji se sastoji od ugljikovih atoma u heksagonalnoj dvodimenzionalnoj kristalnoj rešetki (Slika 8). Debljina takve makromolekule je samo jedan atom, dok joj površina može biti i nekoliko metara kvadratnih, zbog čega je grafen tipičan predstavnik nove skupine materijala koji se nazivaju dvodimenzionalnim (2D) materijalima. Jake kemijske veze između ugljikovih atoma u heksagonalnoj strukturi, osiguravaju grafenu termičku stabilnost, zbog čega je kemijski i mehanički postojan čak i ukoliko je izložen standardnim uvjetima atmosfere (Ereš, 2019). Također, grafen ima još neka vrlo zanimljiva svojstva. U ovom materijalu je ugljik s tri elektrona vezan sa susjednim atomima ugljika, dok je četvrti elektron relativno slabo vezan i lako se može kretati. Zbog toga je grafen puno bolji vodič struje od bakra (Ozkan, 2018). Mehanički je gotovo 1000 puta čvršći od čelika, a treba još spomenuti i optičku prozirnost i vodljivost topline koja je bolja od dijamanta (Ereš, 2019).



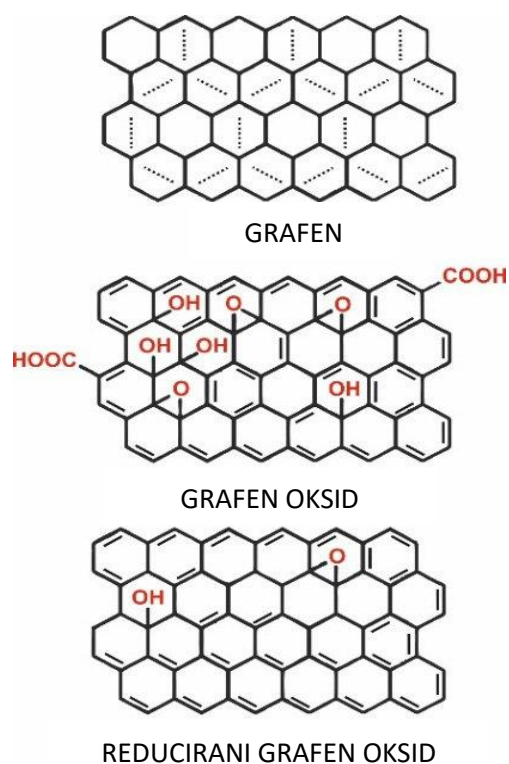
Slika 8. Prikaz grafenskog sloja. (Ereš, 2019.)

Danas je poznato nekoliko metoda za proizvodnju grafena. Prvotni način proizvodnje, koji su 2004. godine otkrili Geim i suradnici, je mehanička eksfolijacija. Za taj postupak potrebni su samoljepljiva traka i grafit. Postupak eksfolijacije se radi tako da se samoljepljiva traka zalijepi uz površinu grafita, pri čemu je potrebno stvoriti uniforman pritisak prstima po cijeloj površini, kako bi adhezivni sloj trake bio u što boljem kontaktu s grafitnom podlogom. Grafit je sastavljen od mnogobrojnih čvrstih slojeva grafena, koji se drže slabim Van der Waalsovima, koje tijekom uklanjanja samoljepljive trake budu nadjačane adhezivnom silom trake, te se nakon uklanjanja trake s površine grafita, grafen nalazi na njoj (Slika 9). Metoda eksfolijacije je jednostavna, no nije pretjerano popularna zbog niskog prinosa. Druga metoda je blago ljuštenje grafita, ali je također prinos malen. Grafen se može pripremiti i termičkom razgradnjom tanke SiC (silicijeva karbida) pločice pod ultravisokim vakuumom (HUV) ili CVD rastom na metalnoj podlozi (Ru, Ni, Cu) ili bez metalne podloge (Ereš, 2019). CVD (engl. Chemical vapor deposition) je metoda kojom se postiže rast tankih slojeva materijala. U slučaju grafena sve kreće s podlogom bakra. Podloga bakra se u zatvorenoj komori izloži metanu i zagrijava na vrlo visokoj temperaturi. Metan je molekula sastavljena od jednog atoma ugljika i četiri atoma vodika, te kada on „udari“ u podlogu bakra, ugljikov atom ostaje „zarobljen“, dok se vodik nastavlja gibati. Dolazi do nastanka tankog monosloja ugljika, koji može biti dug nekoliko centimetara. Međutim, ugljik je vrlo čvrsto vezan za podlogu bakra, pa je dobiveni monosloj teško izolirati. Stoga se uvodi organski polimer PMMA, koji se koristi za izolaciju dobivenog monosloja. On djeluje kao zaštitni sloj. Nakon što je monosloj ugljika vezan za PMMA polimer, bakreni se sloj skida tako da se bakar otopi u kiselini u kojoj je topljiv, a grafen nije. Dobiveno se ispere vodom, kako bi se uklonila kiselina koja zaostane, a pomoću podloge Si/SiO₂ se dobiveni sloj pokupi s vode. Kad je grafen potreban za korištenje, sloj PMMA se skida pomoću acetona ili nekog drugog sličnog organskog otapala (<https://www.acsmaterial.com/>). To je potencijalna metoda za masovnu proizvodnju s prvenstvenim ciljem proizvodnje grafena za primjenu u elektronici. Još jedna metoda masovne proizvodnje grafena je kemijska ili termalna redukcija oksida grafita, što se smatra najekonomičnijim postupkom proizvodnje grafena (Shao i sur., 2010). Još neki načini pripreme grafena su: anodno vezanje, fotoeksfolijacija, laserska ablacija itd. (Zhong i sur., 2015).



Slika 9. Pojednostavljeni prikaz proizvodnje grafena iz grafita. (Tiwari, 2020.)

Grafen se može proizvesti u različitim oblicima, kao što su grafen oksid (monosloj grafen s povećanim sadržajem kisika, koji se nalazi u obliku karboksilnih, epoksidnih i hidroksilnih skupina), grafitni oksid, grafenske nanopločice, reducirani grafen oksid, ugljikove nanocjevčice, ugljikova nanovlakna itd. (Slika 10) (Tiwari, 2020).



Slika 10. Prikaz strukture grafena, grafen oksida i reduciranog grafen oksida

Grafen i elektrode modificirane grafenom pokazuju izvrsne performanse u direktnoj elektrokemiji enzima, kemijskoj detekciji malih molekula (dopamin, vodikov peroksid, NADH itd.), te veću selektivnost i osjetljivost, zbog čega su od velikog interesa u elektroanalitici (Shao i sur., 2010).

Grafen se često koristi u elektroanalitičkim ispitivanjima, u koja spadaju i voltametrijska istraživanja. On se najčešće suspendira u etanolnoj otopini Nafiona te se nanosi na elektrodu. Tijekom nekog vremena, alkohol etanol ispari, te ostaje samo modificirana površina elektrode, koja se sastoji od grafena i Nafiona. Nafion osigurava jednoličan raspored i dobro prijanjanje grafena za površinu elektrode (E.Brusač, 2018).

1.3.2. UGLJIKOVE NANOCJEVČICE

Ugljikove nanocjevčice (CNT) predstavljaju sve važniju skupinu nanomaterijala s posebnim geometrijskim, mehaničkim, elektroničkim i kemijskim svojstvima (Kurbanoglu, Ozkan, 2018). Otkrivene su 1991. godine (Sinha i sur., 2018). CNT se pojednostavljeno mogu promatrati kao šuplji cilindar koji je formiran valjanjem grafitne ploče.

CNT se prema strukturi mogu podijeliti u dvije skupine (Slika 11):

- Jednoslojne (Single walled carbon nanotubes, SWCNT)
- Višeslojne (Multi walled carbon nanotubes, MWCNT)



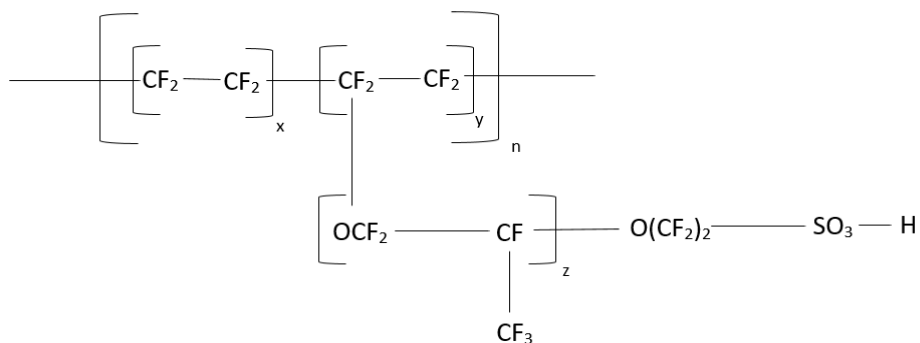
Slika 11. Jednoslojna i višeslojna ugljikova nanocijevčica. (<https://www.researchgate.net/>)

CNT-ovi se sintetiziraju trima glavnim tehnikama: arc discharge, lasersko isparavanje i CVD-om (chemical vapor deposition). Najčešće se CNT pripremaju CVD-om, korištenjem metalnih katalizatora (npr. željezo, nikal, molibden), a sama metalna onečišćenja onda zaostaju i utječu na svojstva CNT-ova.

CNT-ovi se često koriste u elektroanalitičkim ispitivanjima, zbog velike površine, dobre vodljivosti, visoke površinske aktivnosti i dobre biokompatibilnosti. Učinkovito se koriste za modifikaciju elektroda u voltametrijskim analizama, čime se poboljšava granica detekcije (LOD). Također, brža je kinetika prijenosa elektrona, a elektrode su osjetljivije (Sinha i sur., 2018).

1.3.3. NAFION

Nafion (Slika 12) je sulfonirani kopolimer perfluoriranog vinileter komonomera i tetrafluoroetilena koji je razvijen u tvrtki E.I.Dupont (Mauritz i Moore, 2004). U strukturi Nafiona se može vidjeti sulfatna kiselina zbog koje on dobro adsorbira i bubri u vodi.



Slika 12. Prikaz strukture Nafiona.

Nafion, koji je kationski izmjenjivač, često se koristi za modifikaciju elektrode u elektroanalitičkim ispitivanjima. Pomaže blokiranju anionskih vrsta da dođu do površine elektrode, što dovodi do dobre selektivnosti. Negativno nabijena sulfonatna skupina u Nafionu omogućuje selektivnu prekoncentriravanje pozitivno nabijenih biomolekula putem elektrostatske interakcije, dok hidrofobna fluorouglikova mreža polimera daje selektivnost za hidrofobni dio molekule (Yusoff, 2019).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Parkinsonova bolest je neurodegenerativna bolest SŽS-a, koja najčešće pogađa stariju populaciju (ljude starije od 50 godina), i predstavlja prepreku kvalitetnom životu i svakodnevnom funkcioniranju. Pimavanserin još uvijek nema prečestu primjenu u liječenju PB-a kao što imaju neki drugi antiparkinsonici (npr. levodopa, benzerazid, karbidopa, entakapon), no zbog vrlo dobrog učinka, u pogledu pozitivnog efekta u rješavanju deluzija i/ili halucinacija kod osoba oboljelih od PB-a, pretpostavka je da će se u budućnosti puno više koristiti.

Budući da nije razvijena elektroanalitička metoda za određivanje pimavanserina, cilj ovog diplomskog rada je bio ispitati selektivnost nove voltametrijske metode za određivanje pimavanserina, kada se on koristi u kombinaciji s drugim antiparkinsonicima: levodopom, entakaponom, ropinirolom, kvetiapiinom, te također ispitati selektivnost voltametrijske metode za istovremenu analizu pimavanserina i levodope u kombinaciji s tvarima koje se mogu naći u krvi, plazmi, mokraći, kao što su glukoza, dopamin, mokraćna kiselina, te ioni natrija, kalija, klorida, karbonati i fosfati.

Za ispitivanje je od elektroanalitičkih metoda izabrana voltometrija, koja je brza, jeftina i laka za izvođenje, a uporabom kemijski modificirane GCE povećala se osjetljivost i preciznost voltametrijske metode, zbog čega se mogu odrediti i male količine lijeka.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. KEMIKALIJE

Tijekom izrade ovog diplomskog rada korištene su sljedeće kemikalije:

- 1) Pimavanserin (Pliva, Zagreb, Hrvatska)
- 2) Levodopa (Sigma – Aldrich, St. Louis, SAD)
- 3) Kvetiapin (Pliva, Zagreb, Hrvatska)
- 4) 96 %-tni etanol (Badel, Zagreb, Hrvatska)
- 5) Ropinirol (USV Limited, Indija)
- 6) Glukoza (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- 7) Natrijev klorid (Sigma – Aldrich, St. Louis, SAD)
- 8) Kalijev klorid (T.T.T. Zaprešić, Zaprešić, Hrvatska)
- 9) Natrijev karbonat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- 10) Natrijev hidrogenfosfat dihidrat (BDH PROLABO, UK)
- 11) Dopamin (Sigma – Aldrich, St. Louis, SAD)
- 12) Mokraćna kiselina (Sigma – Aldrich, St. Louis, SAD)
- 13) Entakapon (LGC Promochem, UK)

3.2. RADNI INSTRUMENT

Za vaganje svih supstancija za izradu otopina koristila se analitička vaga Mettler Toledo AB-204-S.

Voltametrijska mjerenja tijekom izrade ovog diplomskog rada izvršena su na uređaju μ -Autolab potenciostat (Eco Chemie), koji je spojen na računalo. Program koji kontrolira mjerenja je GPES 4.9. Uređaj je povezan s elektrokemijskim člankom, koji se sastoji od radne, referentne i protuelektrode.

Kao radna elektroda korištena je elektroda od staklastog ugljika (GCE), koja je modificirana grafenovim nanopločicama (GrNP) suspendiranim u 0,3% Nafionu i grafitiziranim višeslojnim ugljikovim nanocjevčicama (MWCNT). Referentna elektroda je Ag/AgCl (srebro/srebrov klorid) elektroda, a kao protuelektroda je korištena platinska žica.

Prije nanošenja suspenzije nanomaterijala na površinu GCE, izvršena je njihova homogenizacija, za što se koristila S 30H Elmasonic ultrazvučna kupelj.

3.3. PRIPREMA OTOPINA

3.3.1.1. MATIČNA OTOPINA PIMAVANSERINA

Za pripremu matične otopine pimavanserina koncentracije $c=5 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ u tikvici od 5,0 mL, potrebno je izvagati 0,0107 g pimavanserina. Navedena masa se izvažuje na analitičkoj vagi, i kvantitativno prenese u Erlenmeyerovu tikvicu od 5,0 mL, te otopi u koncentriranom etanolu. Za izradu radnih otopina, koristila se matična otopina koncentracije $c=1 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$, koja se dobije tako da se 2,0 mL prvotne otopine koncentracije $c=5 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$, pipetira u tikvicu od 10,0 mL i nadopuni do oznake etanolom. Otopine se čuvaju u hladnjaku.

3.3.1.2. RADNE OTOPINE PIMAVANSERINA

U mjerenjima su korištene otopine pimavanserina u rasponu od $1 \times 10^{-7} \text{ mol/dm}^3$ do $1 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, a volumeni matične otopine pimavanserina koje je potrebno pipetirati za izradu 20,0 mL pojedinih radnih otopina pimavanserina navedeni su u tablici 1.

TABLICA 1. Prikaz koncentracija radnih otopina pimavanserina i volumena matičnih otopina koji su potrebni za njihovu pripremu.

Otopina	Koncentracija pimavanserina/ mol/dm^3	Volumen matične otopine/ μL
Matična otopina	1×10^{-3}	-
Radna otopina 1	1×10^{-7}	2
Radna otopina 2	5×10^{-7}	10
Radna otopina 3	1×10^{-6}	20
Radna otopina 4	2×10^{-6}	40
Radna otopina 5	3×10^{-6}	60
Radna otopina 6	4×10^{-6}	80
Radna otopina 7	5×10^{-6}	100
Radna otopina 8	6×10^{-6}	120
Radna otopina 9	7×10^{-6}	140
Radna otopina 10	8×10^{-6}	160
Radna otopina 11	9×10^{-6}	180
Radna otopina 12	1×10^{-5}	200

3.3.2.1. MATIČNA OTOPINA LEVODOPE

Za izradu 10,0 mL matične otopine levodope ($M_r=197,1879$ g/mol) koncentracije $c=1 \times 10^{-3}$ mol/dm³, potrebno je izvagati 1,97 mg levodope, kvantitativno prenijeti u tikvicu od 10,0 mL i otopiti i nadopuniti do oznake ultra čistom vodom.

3.3.2.2. RADNE OTOPINE LEVODOPE

U mjerenjima su korištene otopine levodope u rasponu koncentracija od 1×10^{-6} mol/dm³ do 5×10^{-5} mol/dm³. Volumeni matične otopine levodope, koje je potrebno pipetirati za izradu 20,0 mL pojedinih radnih otopina levodope, prikazani su u tablici 2.

TABLICA 2. Prikaz koncentracija radnih otopina levodope i volumena matičnih otopina koji su potrebni za njihovu pripremu.

Otopina	Koncentracija levodope/ mol/dm ³	Volumen matične otopine/ μ L
Matična otopina	1×10^{-3}	-
Radna otopina 1	1×10^{-6}	20
Radna otopina 2	2×10^{-6}	40
Radna otopina 3	4×10^{-6}	80
Radna otopina 4	6×10^{-6}	120
Radna otopina 5	8×10^{-6}	160
Radna otopina 6	1×10^{-5}	200
Radna otopina 7	1.5×10^{-5}	300
Radna otopina 8	2×10^{-5}	400
Radna otopina 9	2.5×10^{-5}	500
Radna otopina 10	3×10^{-5}	600
Radna otopina 11	4×10^{-5}	800
Radna otopina 12	5×10^{-5}	1000

3.3.3.1. MATIČNA OTOPINA I RADNE OTOPINE GLUKOZE

Za izradu 5,0 mL matične otopine glukoze ($M_r=180,16$ g/mol) koncentracije $c=0,01$ mol/dm³, potrebno je izvagati 9,0 mg glukoze, kvantitativno prenijeti u tikvicu od 5,0 mL i otopiti i nadopuniti do oznake ultra čistom vodom. Za izradu radnih otopina glukoze koncentracije 4×10^{-4} mol/dm³ (1) i 8×10^{-4} mol/dm³ (2) u tikvicama od 20,0 mL, potrebno je pipetirati 800 μ L (1), odnosno 1600 μ L (2) matične otopine glukoze.

3.3.4.1. MATIČNA OTOPINA I RADNE OTOPINE NATRIJEVA KLORIDA

Za izradu 5,0 mL matične otopine natrijeva klorida ($M_r=58,44$ g/mol) koncentracije $c=0,1$ mol/dm³, potrebno je izvagati 0,0292 g natrijeva klorida, kvantitativno prenijeti u tikvicu od 5,0 mL i otopiti i nadopuniti do oznake ultra čistom vodom. Za izradu radnih otopina natrijeva klorida koncentracije 4×10^{-3} mol/dm³ (1) i 8×10^{-3} mol/dm³ (2) u tikvicama od 20,0 mL, potrebno je pipetirati 800 μ L (1), odnosno 1600 μ L (2) matične otopine natrijeva klorida.

3.3.5.1. MATIČNA OTOPINA I RADNE OTOPINE KALIJEVA KLORIDA

Za izradu 5,0 mL matične otopine kalijeva klorida ($M_r=74,55$ g/mol) koncentracije $c=0,1$ mol/dm³, potrebno je izvagati 0,0373 g kalijeva klorida, kvantitativno prenijeti u tikvicu od 5,0 mL i otopiti i nadopuniti do oznake ultra čistom vodom. Za izradu radnih otopina kalijeva klorida koncentracije 4×10^{-3} mol/dm³ (1) i 8×10^{-3} mol/dm³ (2) u tikvicama od 20,0 mL, potrebno je pipetirati 800 μ L (1), odnosno 1600 μ L (2) matične otopine kalijeva klorida.

3.3.6.1. MATIČNA OTOPINA I RADNE OTOPINE NATRIJEVA KARBONATA

Za izradu 5,0 mL matične otopine natrijeva karbonata ($M_r=105,99$ g/mol) koncentracije $c=0,05$ mol/dm³, potrebno je izvagati 0,0265 g natrijeva karbonata, kvantitativno prenijeti u tikvicu od 5,0 mL i otopiti i nadopuniti do oznake ultra čistom vodom. Za izradu radnih otopina natrijeva karbonata koncentracije 2×10^{-3} mol/dm³ (1) i 4×10^{-3} mol/dm³ (2) u tikvicama

od 20,0 mL, potrebno je pipetirati 800 μL (1), odnosno 1600 μL (2) matične otopine natrijeva karbonata.

3.3.7.1. MATIČNA OTOPINA I RADNE OTOPINE NATRIJEVA HIDROGENFOSFATA

Za izradu 5,0 mL matične otopine natrijeva hidrogenfosfata dihidrata ($M_r=177,99$ g/mol) koncentracije $c=0,05$ mol/dm³, potrebno je izvagati 0,0445 g soli, kvantitativno prenijeti u tikvicu od 5,0 mL i otopiti i nadopuniti do oznake ultra čistom vodom. Za izradu radnih otopina fosfata koncentracije 2×10^{-3} mol/dm³ (1) i 4×10^{-3} mol/dm³ (2) u tikvicama od 20,0 mL, potrebno je pipetirati 800 μL (1), odnosno 1600 μL (2) matične otopine natrijeva hidrogenfosfata.

3.3.8.1. MATIČNA OTOPINA I RADNE OTOPINE MOKRAĆNE KISELINE

Za izradu 5,0 mL matične otopine mokraćne kiseline ($M_r=168,11$ g/mol) koncentracije $c=1 \times 10^{-3}$ mol/dm³, potrebno je izvagati 0,8405 mg mokraćne kiseline, kvantitativno prenijeti u tikvicu od 5,0 mL i otopiti i nadopuniti do oznake ultra čistom vodom. Za izradu radnih otopina mokraćne kiseline koncentracije 1×10^{-4} mol/dm³ (1) i 2×10^{-5} mol/dm³ (2) u tikvicama od 20,0 mL, potrebno je pipetirati 2,0 mL (1), odnosno 400 μL (2) matične otopine mokraćne kiseline.

3.3.9.1. MATIČNA OTOPINA I RADNE OTOPINE DOPAMINA

Za izradu 5,0 mL matične otopine dopamina (dopamin hidroklorid) ($M_r=189,64$ g/mol) koncentracije $c=1 \times 10^{-3}$ mol/dm³, potrebno je izvagati 0,948 mg dopamina, kvantitativno prenijeti u tikvicu od 5,0 mL i otopiti i nadopuniti do oznake s ultra čistom vodom. Za izradu radnih otopina dopamina koncentracije 4×10^{-6} mol/dm³ (1), $2,5 \times 10^{-7}$ mol/dm³ (2) i 5×10^{-7} mol/dm³ (3), u tikvicama od 20,0 mL, potrebno je pipetirati 80 μL (1), 5 μL (2) i 10 μL (3) matične otopine dopamina.

3.3.10.1. MATIČNA I RADNA OTOPINA KVETIAPINA

Za izradu 5,0 mL matične otopine kvetiapina (kvetiapin fumarat) ($M_r=883,09$ g/mol) koncentracije $c=1 \times 10^{-3}$ mol/dm³, potrebno je izvagati 4,415 mg kvetiapin fumarata, kvantitativno prenijeti u tikvicu od 5,0 mL i otopiti i nadopuniti do oznake ultra čistom vodom. Za izradu radne otopine kvetiapina koncentracije 1×10^{-5} mol/dm³ u tikvici od 20,0 mL, potrebno je pipetirati 200 µL matične otopine kvetiapina.

3.3.11.1. MATIČNA I RADNA OTOPINA ROPINIROLA

Za izradu 5,0 mL matične otopine ropinirola ($M_r=260,37$ g/mol) koncentracije $c=1 \times 10^{-3}$ mol/dm³, potrebno je izvagati 0,0013 g ropinirola, kvantitativno prenijeti u tikvicu od 5,0 mL i otopiti i nadopuniti do oznake ultra čistom vodom. Za izradu radne otopine ropinirola koncentracije 1×10^{-5} mol/dm³ u tikvici od 20,0 mL, potrebno je pipetirati 200 µL matične otopine ropinirola.

3.3.12.1. MATIČNA I RADNA OTOPINA ENTAKAPONA

Za izradu 10,0 mL matične otopine entakapona ($M_r=305,29$ g/mol) koncentracije $c=1 \times 10^{-3}$ mol/dm³, potrebno je izvagati 3,053 mg entakapona, kvantitativno prenijeti u tikvicu od 10,0 mL i otopiti i nadopuniti do oznake ultra čistom vodom. Za izradu radne otopine entakapona koncentracije 1×10^{-5} mol/dm³ u tikvici od 20,0 mL, potrebno je pipetirati 200 µL matične otopine entakapona.

3.4. PRIPREMA ELEKTRODA

Za ispitivanje se koristila modificirana GCE. Prije mjerenja, površina nemodificirane GCE se polira na krpici s prahom aluminijskog oksida (Al_2O_3), kako bi se osigurala što jednoličnija površina elektrode. Takva, ispolirana GCE se ispere s malim volumenom destilirane vode i stavlja u ultrazvučnu kupelj (otprilike 10-15 sekundi), da bi se uklonile zaostale čestice aluminijskog oksida. Elektroda se potom osuši.

Zatim, na osušenu GCE, nanosimo suspenziju GrNP i MWCNT (1:1, 1 mg/mL) u 0,3% Nafionu, koja je prethodno homogenizirana na ultrazvučnoj kupelji (otprilike 30 minuta). Nanosi se 5 μL suspenzije nanomaterijala na površinu GCE pomoću mikropipete. Takva modificirana GCE ostavi se sušiti, a isparavanjem etanola stvara se stabilan film nanokompozita.

Između mjerenja pojedinih otopina uzoraka, potrebno je isprati površinu modificirane GCE s ultra čistom vodom, te je premjestiti u otopinu osnovnog elektrolita u kojem se izvodi voltametrijsko mjerenje, i provesti nekoliko mjerenja kako bi se adsorbirani analit desorbirao s površine elektrode. Ukoliko se navedeni korak ne bi izvršio, dobiveni rezultati bi pokazivali veću koncentraciju analita u uzorku nego što ona uistinu jest.

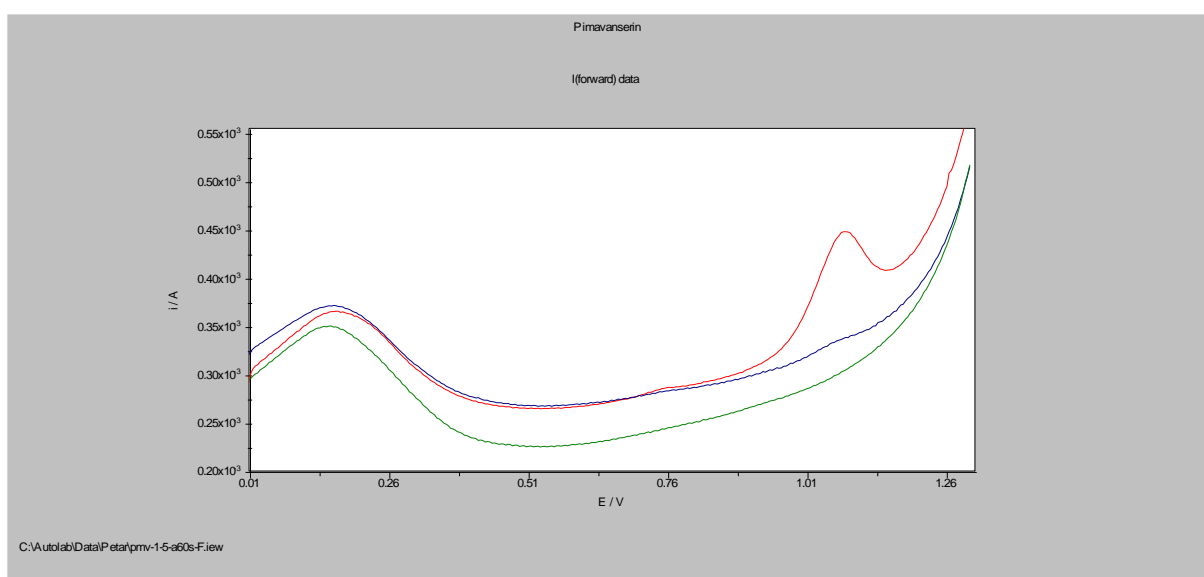
3.5. UVJETI MJERENJA

Pravokutnovalni voltamogrami su snimljeni na GCE, koja je modificirana na način kao što je navedeno u poglavlju 3.4. priprema elektroda.

Sva mjerenja su napravljena u SWV voltimetriji, uz prethodno pretkoncentriravanje uzorka (*stripping* voltimetrija), pri frekvenciji od 75 Hz i rasponu potencijala 0.28 V – 1.3 V. Porast potencijala je iznosio $dE=4$ mV, a amplituda pulsa 20 mV. Svugdje gdje nije navedno, vrijeme akumulacije je iznosilo $t_{acc}=60$ sekundi pri potencijalu $E_{acc}=0$ V, a kao elektrolit je korištena 0,1 mol/dm³ otopina H₂SO₄.

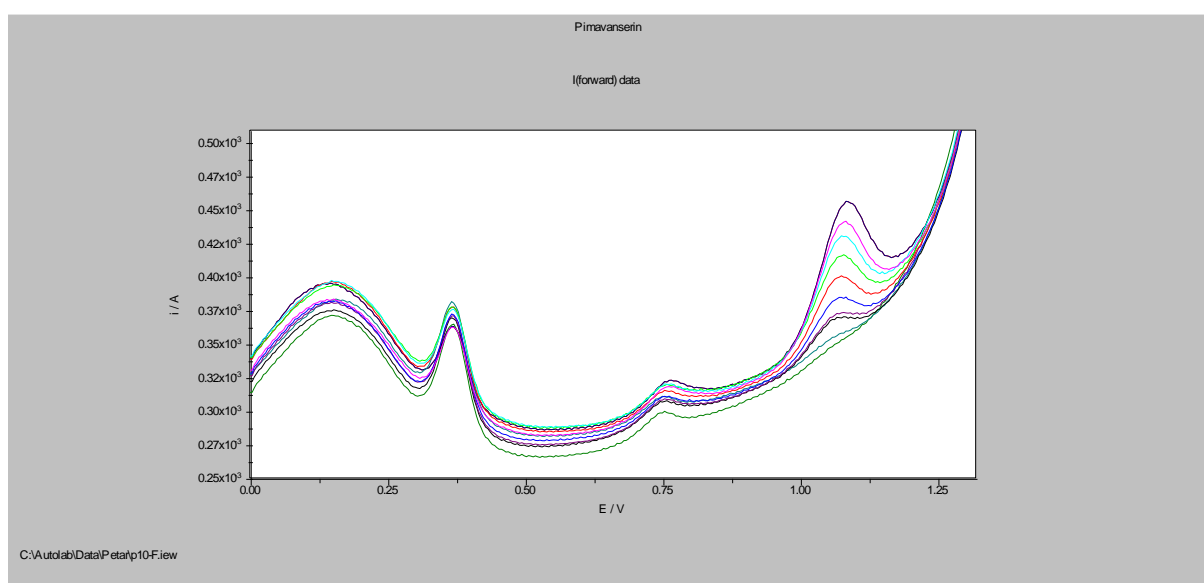
4. REZULTATI I RASPRAVA

Prethodnim ispitivanjima utvrđeno je da pimavanserin pokazuje dobro izražen oksidacijski vrh pri potencijalu 1.07 V na GCE elektrodi modificiranoj suspenzijom GrNP i MWCNT u 0,3% Nafionu, kao posljedica oksidacije dušika u piperidinskom prstenu. Također je tvrdeno da se jakost struje značajno povećava s vremenom akumulacije lijeka na modificiranoj površini, tako da se jedva vidljiv voltametrijski odgovor za koncentraciju $1 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^{-3}$ pokazuje kao izvrsno definiran strujni vrh (Slika 13).



Slika 13. Pravokutnovalni voltamogram otopine pimavanserina koncentracije $1 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ dobiven bez prethodne akumulacije (plava krivulja) i nakon akumulacije od 60 sekundi (crvena krivulja), te pravokutnovalni voltamogram otopine elektrolita, $0,1 \text{ mol/dm}^3 \text{ H}_2\text{SO}_4$ (zelena krivulja), dobiven pri optimalnim uvjetima.

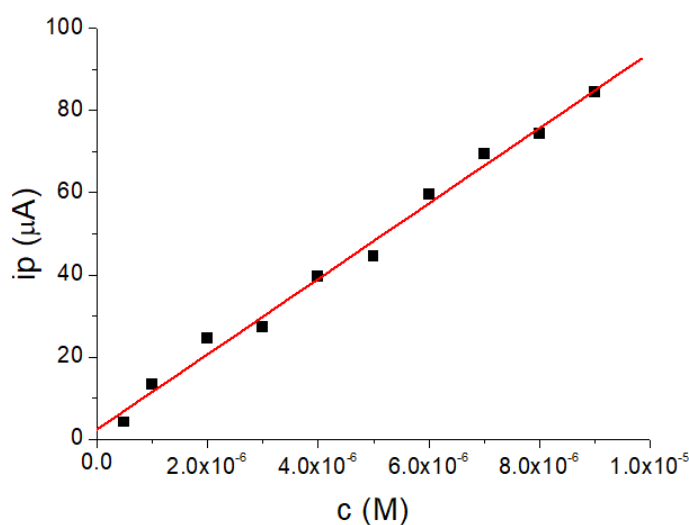
Prvo je ispitivana mogućnost voltametrijske metode za istovremeno određivanje pimavanserina i levodope pri uvjetima promjene koncentracije pimavanserina, dok se koncentracija levodope ne mijenja. Tijekom ovih mjerenja koncentracija levodope je bila $2 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, dok se koncentracija pimavanserina mijenjala u rasponu od $5 \times 10^{-7} \text{ mol/dm}^3$ do $1 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, kao što je navedeno u tablici 1. Mjerenje je izvedeno na GCE, koja je modificirana nanomaterijalima na način kao što je opisano u poglavljima 3.4. priprema elektroda i pod uvjetima koji su navedeni u poglavlju 3.5. uvjeti mjerenja. Dobiveni voltamogrami su prikazani na slici 14.



Slika 14. Pravokutnovalni voltamogrami otopina pimavanserina u rasponu koncentracija $5 \times 10^{-7} \text{ mol/dm}^3$ (tamno zelena linija) – $1 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ (tamno plava linija), i levodope pri konstantnoj koncentraciji ($c=2 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$), dobiven pri optimalnim uvjetima.

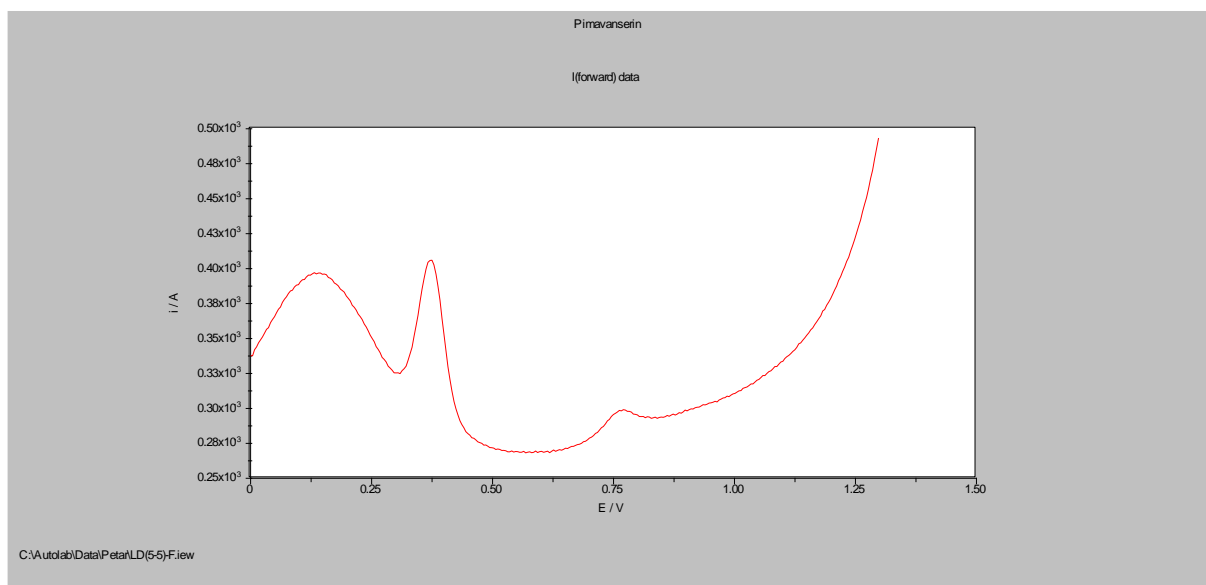
Na voltamogramima su vidljiva tri strujna vrha. Strujni vrh pri potencijalu 1.07 V pripada pimavanserinu i posljedica je njegove oksidacije, zatim strujni vrh pri potencijalu 0.37 V posljedica je oksidacije levodope, dok je strujni vrh pri potencijalu 0.77 V nepoznatog izvora. Budući da je vrijednost njegove mjerene struje konstantna, može se pretpostaviti da je to neko onečišćenje koje potječe od levodope ili oksidacijski produkt levodope koji je također elektroaktivan pa se dalje oksidira na višem potencijalu, što će se u sljedećem mjerenju i ispitati.

Iz voltamograma na slici 14 može se vidjeti da povećanjem koncentracije pimavanserina raste i vrijednost struje vrha vala. Također, kada je koncentracija levodope konstantna, oksidacijski pik koji pripada levodopi je konstantan i ukazuje na reproducibilna mjerenja. Zatim, razlika potencijala oksidacije pimavanserina i levodope iznosi čak 70 mV što ukazuje da se pimavanserin može pouzdano odrediti u prisutnosti levodope, odnosno da bi se oba lijeka mogla istovremeno odrediti voltametrijskom metodom koristeći razvijeni nanosenzor. Tome u prilog ide i slika 15, koja prikazuje kalibracijski pravac ovisnosti izmjerenih jakosti struja vrha oksidacije pimavanserina (i_p) o njegovoj koncentraciji pri spomenutim uvjetima u ovom ispitivanju, gdje se vidi linearna ovisnost izmjerenih vrijednosti struja o koncentraciji pimavanserina u rasponu od 5×10^{-7} mol/dm³ do 9×10^{-6} mol/dm³. Jednadžba kalibracijskog pravca glasi: i_p (μ A) = $9,18 \times 10^6 c$ (M) + 2.39, a koeficijent korelacije iznosi 0,995.



Slika 15. Prikaz ovisnosti izmjerenih jakosti struja pimavanserina o njegovoj koncentraciji (5×10^{-7} M – 9×10^{-6} M), dobivenih upotrebom modificirane elektrode SQW voltametrijom pri $f=75$ Hz, $E=20$ mV i $dE=4$ mV, nakon akumulacije tijekom 60 s pri 0 V.

U sljedećem mjerenju je cilj bio dokazati da pik pri 0.77 V, koji se nije očekivao prilikom prethodnog mjerenja, potječe od levodope. Mjerila se samo otopina levodope koncentracije $5 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ u 0,1 M H_2SO_4 kao elektrolitu na već spomenutoj modificiranoj GCE na način kao što navedeno u poglavlju 3.4. priprema elektroda i pri spomenutim uvjetima u poglavlju 3.5. uvjeti mjerenja. Dobiveni voltamogram je prikazan na slici 16.

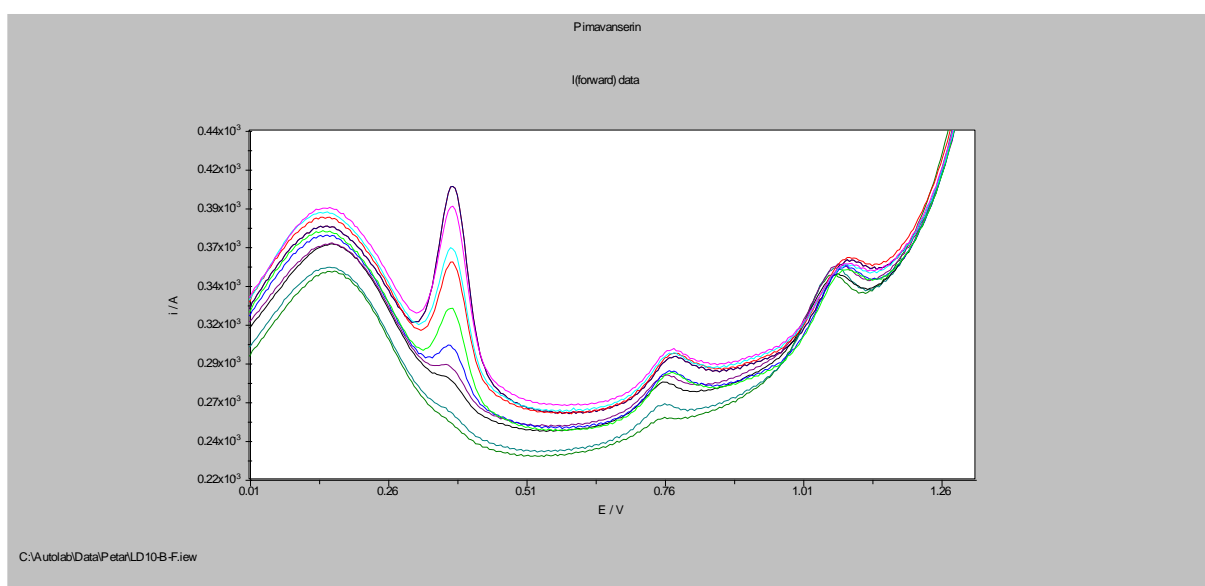


Slika 16. Pravokutnovalni voltamogram levodope ($c=5 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$) dobiven mjerenjem upotrebom modificirane elektrode pri $f=75 \text{ Hz}$, $E=20 \text{ mV}$ i $dE=4 \text{ mV}$ nakon akumulacije tijekom 60 s pri 0 V.

Uvidom u mehanizam oksidacije levodope opisan u literaturi (Dascalescu i Apetrei, 2021) te iz priloženog voltamograma može se zaključiti da strujni vrh pri 0.77 V potječe najvjerojatnije od oksidacijskog produkta levodope koja se oksidira pri 0.37 V. U strukturi levodope oksidira se dihidroksibenzenski dio molekule u dopakinon koji sporom kemijskom reakcijom prelazi u ciklodopu koja je također elektroaktivna.

Nadalje, u sljedećem ispitivanju, cilj je bio provjeriti utječe li promjena koncentracije levodope na mogućnost određivanja pimavanserina, odnosno interferiraju li međusobno ispitivane supstancije na istovremeno određivanje oba lijeka.

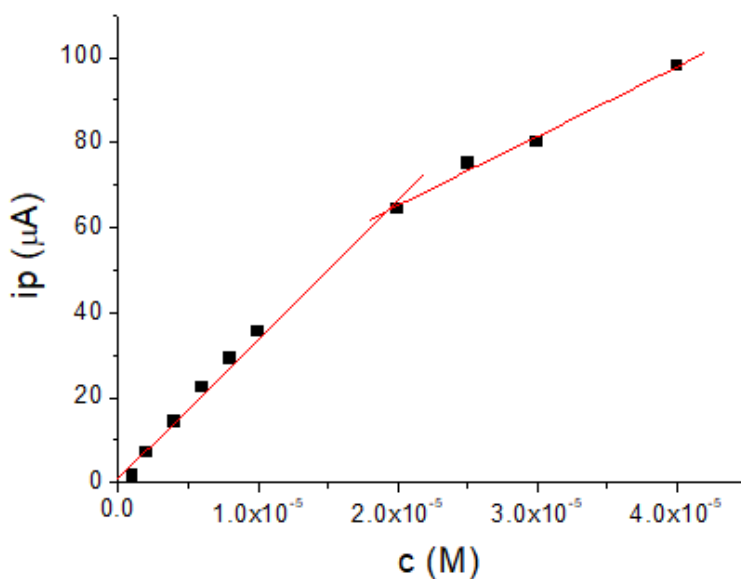
Tijekom ovih mjerenja koncentracija levodope se mijenjala, od 1×10^{-6} mol/dm³ do 5×10^{-5} mol/dm³, na način kao što je navedeno u tablici 2, dok je koncentracija pimavanserina bila konstantna (4×10^{-6} mol/dm³). Dobiveni voltamogrami su prikazan na slici 17, a mjerenja su provedena kao što je opisano u poglavljima 3.4. priprema elektroda i 3.5. uvjeti mjerenja.



Slika 17. Pravokutnovalni voltamogrami otopina levodope u rasponu koncentracija $c=1 \times 10^{-6}$ mol*dm⁻³ (tamno zelena linija) do 5×10^{-5} mol/dm³ (tamno plava linija) i pimavanserina pri konstantnoj koncentraciji ($c=4 \times 10^{-6}$ mol/dm³) dobiveni pri optimalnim uvjetima.

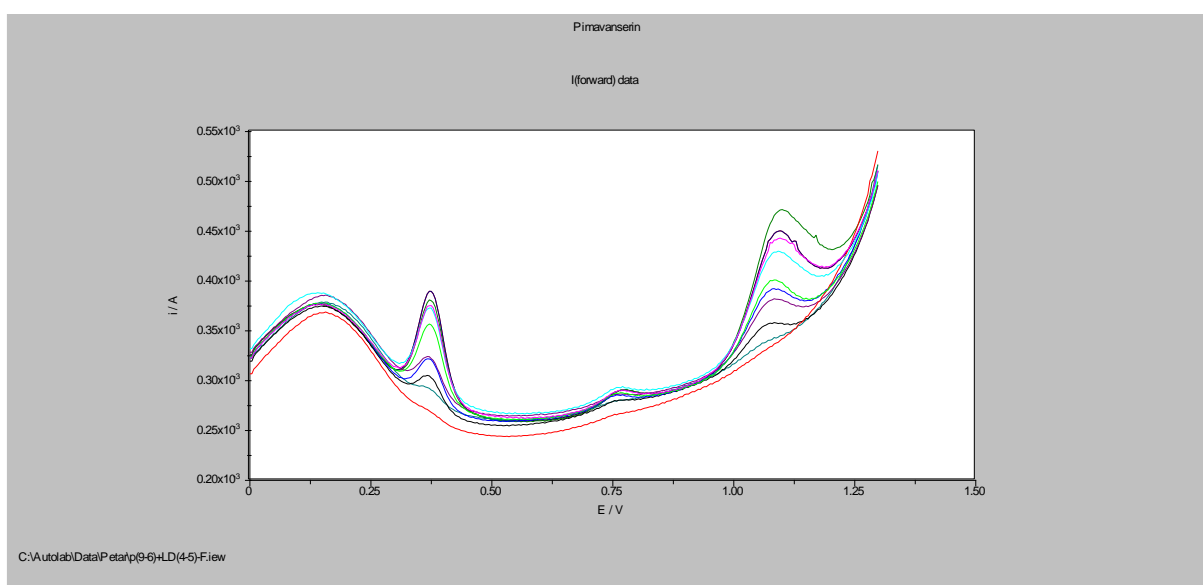
Vrijednosti struje pri 0.37 V, porastom koncentracije levodope, rastu što je vidljivo na voltamogramima kao posljedica oksidacije levodope. Također strujni vrhovi koji pripadaju pimavanserinu pri 1.07 V se jasno vide i njihova se visina na mijenja. Na slici 18 u nastavku, koja prikazuje kalibracijski pravac ovisnosti izmjerenih jakosti struja vrha oksidacije levodope (i_p) o njezinoj koncentraciji u rasponu od 1×10^{-6} mol*dm⁻³ do 4×10^{-5} mol*dm⁻³ pri spomenutim uvjetima u ovom ispitivanju, vide se dva područja linearne ovisnosti izmjerenih

jakosti struja o koncentraciji levodope. Prvo područje linearnosti je u rasponu koncentracija od 1×10^{-6} M do 2×10^{-5} M, a jednačba pravca za prvo područje linearnosti glasi: $i_p (\mu A) = 3,2 \times 10^6 c (M) + 1.16$, uz koeficijent korelacije 0,996. Drugo područje linearnosti je u području koncentracija od 2×10^{-5} M do 4×10^{-5} M, a opisuje je jednačba kalibracijskog pravca $i_p (\mu A) = 1,63 \times 10^6 c (M) + 32.41$, uz koeficijent korelacije 0,995. Iz navedenih mjerenja može se zaključiti da je zbog velike razlike potencijala oksidacije pimavaserina i levodope novi nanosenzor pogodan za istovremeno kvantitativno određivanje oba lijeka.



Slika 18. Prikaz ovisnosti izmjerenih jakosti struja levodope o njezinoj koncentraciji (1×10^{-6} M – 4×10^{-5} M) dobivenih upotrebom modificirane elektrode SQW voltametrijom pri $f=75$ Hz, $E=20$ mV i $dE=4$ mV, nakon akumulacije tijekom 60 s pri 0 V.

Sljedeći je korak bio mijenjati koncentracije levodope i pimavanserina istovremeno, na koncentracijskim razinama kao u prethodnim mjerenjima kad se mijenjala koncentracija samo jednog lijeka, i to prema vrijednostima koncentracija u tablici 1, odnosno tablici 2. Tim mjerenjem i usporedbom s prethodnima u kojima se mijenjala koncentracija samo jednog lijeka ispitala se međusobna interferencije pimavanserina i levodope. Izmjerene vrijednosti struja bi otprilike morale biti jednake, kao i nagibi kalibracijskih pravaca dobivenih iz ovisnosti izmjerenih jakosti struja vrhova oksidacije o koncentracijama ispitivanih lijekova. Mjerenje je provedeno u već spomenutim uvjetima (3.4. priprema elektroda i 3.5. uvjeti mjerenja), a dobiveni voltamogrami su prikazan na slici 19.



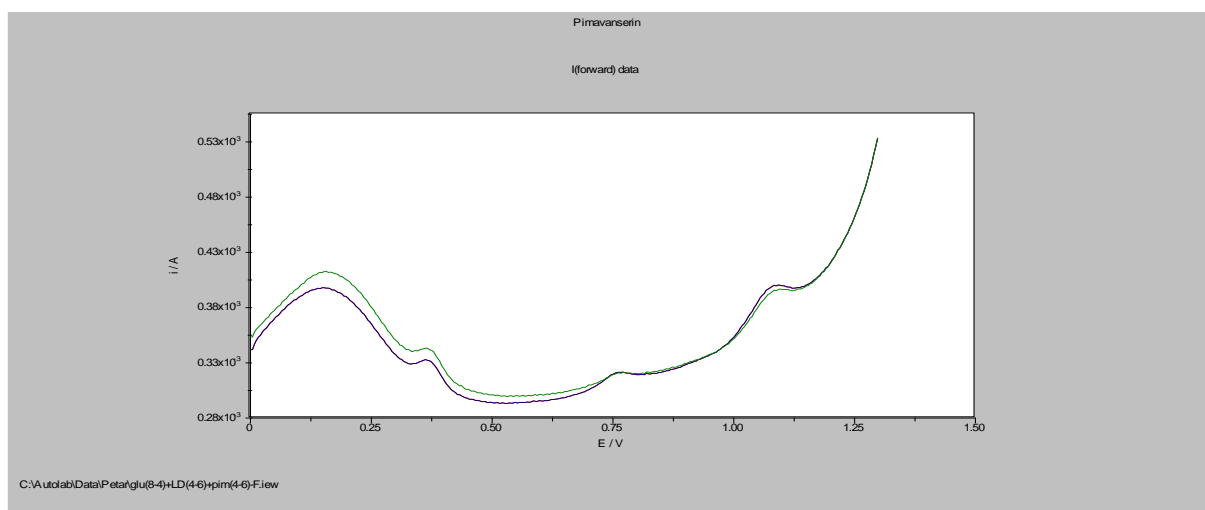
Slika 19. Pravokutnovalni voltamogrami levodope i pimavanserina dobiveni u ovisnosti o promjeni koncentracije levodope (1×10^{-6} mol/dm³ (crvena linija) – 5×10^{-5} mol/dm³ (tamno zelena linija)) i pimavanserina (5×10^{-7} mol/dm³ (crvena linija) – 1×10^{-5} mol/dm³ (tamno zelena linija)), dobiveni pri optimalnim uvjetima.

Iz voltamograma se uočava da su oba strujna vrha jasno vidljiva. Usporedbom struja, u ovom mjerenju kada se mijenjaju koncentracije i jednome i drugome analitu, i u prethodnima mjerenjima kada su se mijenjale koncentracije samo jednome analitu dok je drugi imao konstantnu koncentraciju, dobivene su približno jednake vrijednosti. Nagibi kalibracijskih pravaca ne pokazuju razliku što ukazuje da levodopa ne utječe na točnost određivanja pimavanserina *stripping* pravokutnovalnom voltametrijskom metodom, kao niti pimavanserin na određivanje levodope. Budući da je prvi korak u ovoj analizi adsorpcija analita na površini

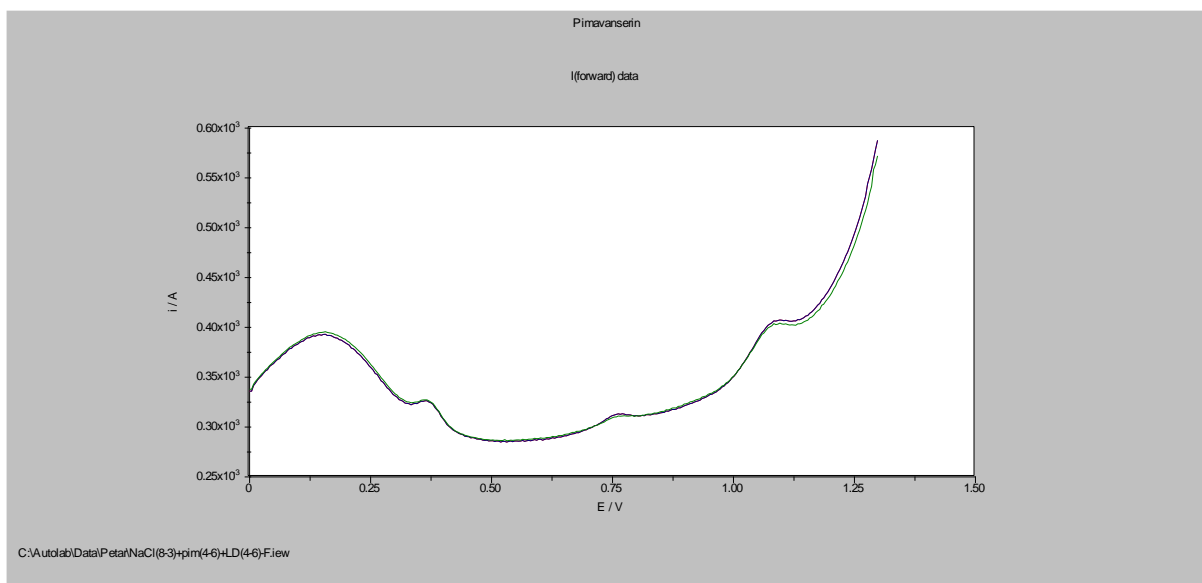
modificirane elektrode, dobiveni rezultati također ukazuju da pimavanserin i levodopa ne utječu međusobno niti na adsorpciju lijeka na nanokompozitni sloj razvijenog senzora. Stoga, navedenim je ispitivanjima utvrđeno da lijekovi međusobno ne interferiraju u istovremenom određivanju te da je razvijena metoda s tog aspekta selektivna.

S obzirom da se glukoza, elektroliti i druge tvari mogu pronaći u tjelesnim tekućinama, potrebno je ispitati selektivnost metode prilikom određivanja pimavanserina i levodope u kombinaciji s navedenim tvarima. To je bio cilj narednih mjerenja kako bi se utvrdio potencijal metode za određivanje navedenih lijekova u biološkim tekućinama. U ispitivanju su korištene otopine pimavanserina koncentracije 4×10^{-6} mol/dm³, levodope koncentracije 4×10^{-6} mol/dm³ te otopine glukoze u koncentracijama 4×10^{-4} mol/dm³ (100 puta veća koncentracija od otopina pimavanserina i levodope) i koncentraciji 8×10^{-4} mol/dm³ (200 puta veća koncentracija od otopina pimavanserina i levodope). Još su za mjerenje pripremljene otopine natrijeva klorida i kalijeva klorida u koncentracijama 1000 puta ($c=4 \times 10^{-3}$ mol/dm³) i 2000 puta ($c=8 \times 10^{-3}$ mol/dm³) većim od koncentracija otopina pimavanserina i levodope, te otopine karbonata i fosfata u koncentracijama 500 puta ($c=2 \times 10^{-3}$ mol/dm³) i 1000 puta ($c=4 \times 10^{-3}$ mol/dm³) većim od koncentracija otopina pimavanserina i levodope.

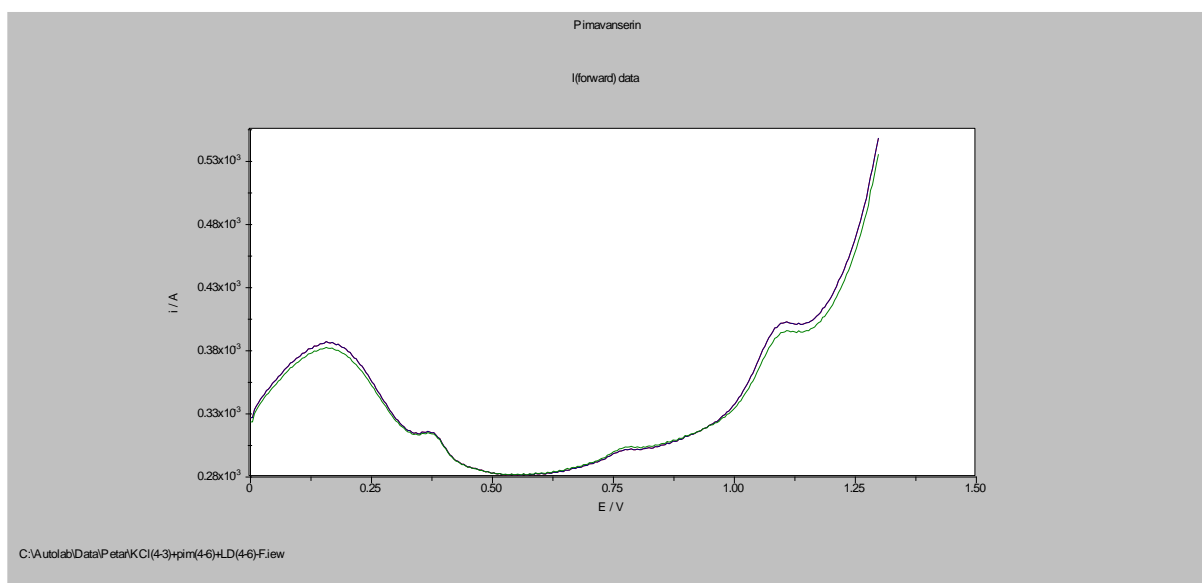
Ukoliko ni jedan od ispitivanih spojeva ne pokazuje interferenciju s određivanjem levodope i pimavanserina, vrijednosti strujnih vrhova oksidacije pimavanserina i levodope neće se mijenjati te se mogu očekivati gotovo identični voltamogrami za prvo mjerenje (kada je koncentracija 100 puta, 500 puta, odnosno 1000 puta veća od koncentracija levodope i pimavanserina) i drugo mjerenje (kada je koncentracija 200 puta, 1000 puta, odnosno 2000 puta veća od koncentracija levodope i pimavanserina). Dobiveni voltamogrami su prikazani u nastavku.



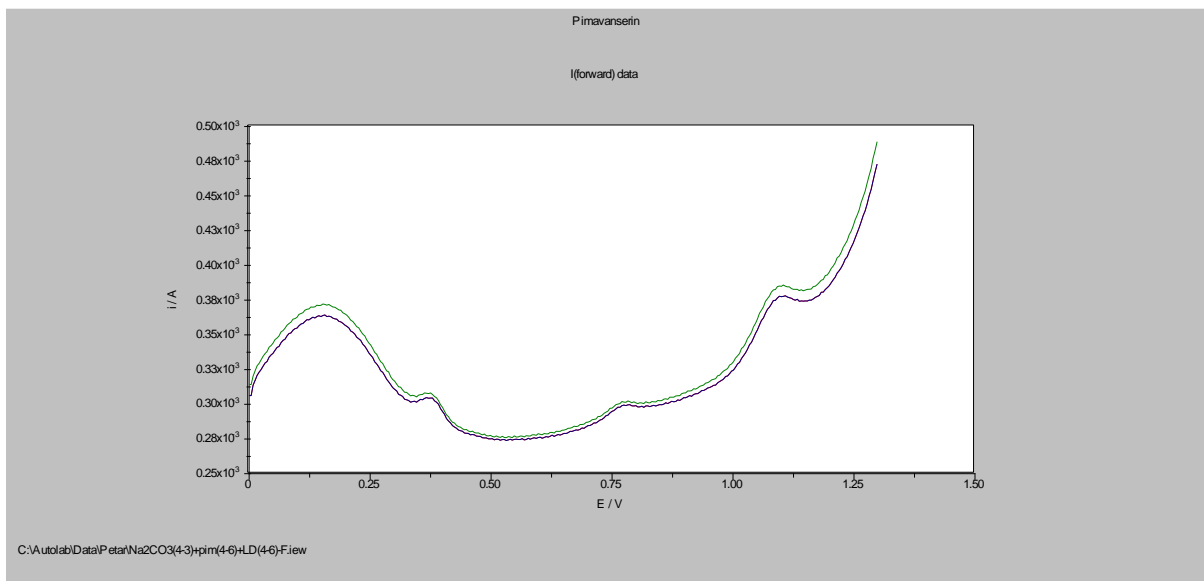
Slika 20. Pravokutnovalni voltamogrami levodope ($c=4 \times 10^{-6}$ mol/dm³), pimavanserina ($c=4 \times 10^{-6}$ mol/dm³) i glukoze koncentracije 4×10^{-4} mol/dm³ (zelena krivulja) i 8×10^{-4} mol/dm³ (plava krivulja) pri optimalnim uvjetima.



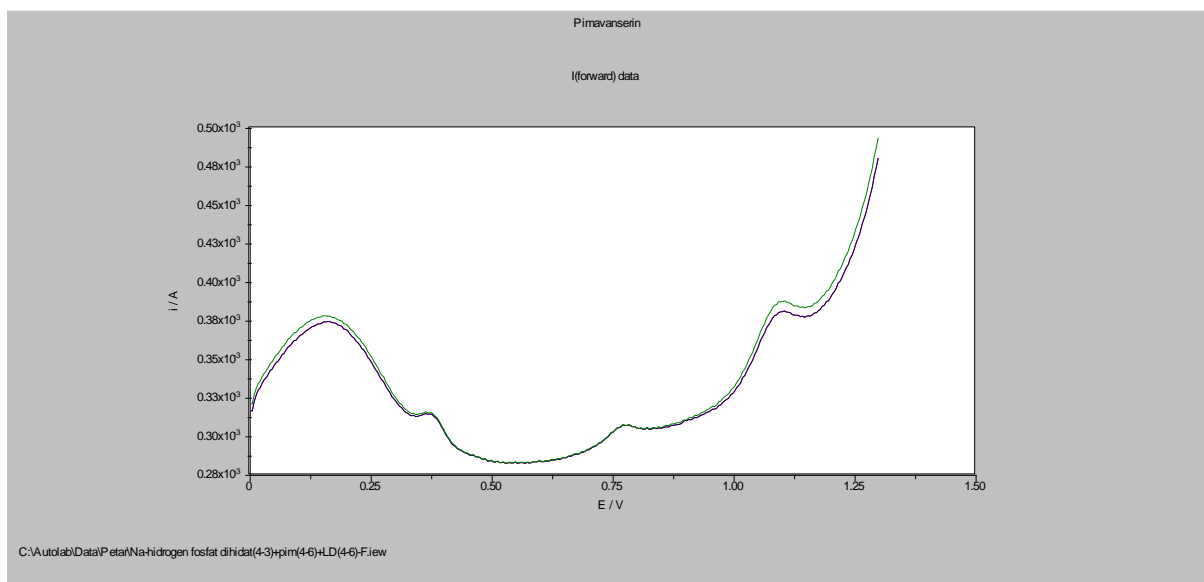
Slika 21. Pravokutnovalni voltamogrami levodope ($c=4 \times 10^{-6}$ mol/dm³), pimavanserina ($c=4 \times 10^{-6}$ mol/dm³) i natrijeva klorida koncentracije 4×10^{-3} mol/dm³ (plava krivulja) i 8×10^{-3} mol/dm³ (zeleno krivulja) pri optimalnim uvjetima.



Slika 22. Pravokutnovalni voltamogrami levodope ($c=4 \times 10^{-6}$ mol/dm³), pimavanserina ($c=4 \times 10^{-6}$ mol/dm³) i kalijevega klorida koncentracije 4×10^{-3} mol/dm³ (plava krivulja) i 8×10^{-3} mol/dm³ (zeleno krivulja) pri optimalnim uvjetima.



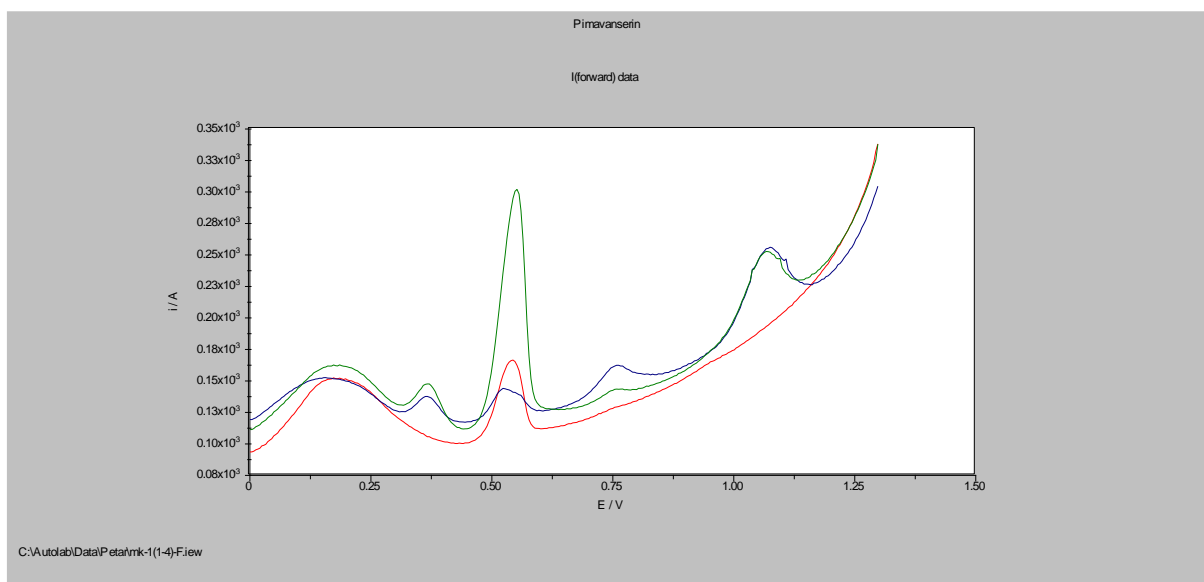
Slika 23. Pravokutnovalni voltamogrami levodope ($c=4 \times 10^{-6}$ mol/dm³), pimavanserina ($c=4 \times 10^{-6}$ mol/dm³) i natrijeva karbonata koncentracije 2×10^{-3} mol/dm³ (plava krivulja) i 4×10^{-3} mol/dm³ (zelena krivulja) pri optimalnim uvjetima.



Slika 24. Pravokutnovalni voltamogrami levodope ($c=4 \times 10^{-6}$ mol/dm³), pimavanserina ($c=4 \times 10^{-6}$ mol/dm³) i natrijeva hidrogenfosfata koncentracije 2×10^{-3} mol/dm³ (zelena krivulja) i 4×10^{-3} mol/dm³ (plava krivulja) pri optimalnim uvjetima.

S obzirom da su koncentracije pimavanserina i levodope u prvom i drugom mjerenju svakog ispitivanja jednake, a dobiveni voltamogrami se gotovo savršeno preklapaju, može se zaključiti da niti jedan od ispitivanih spojeva ne smeta u određivanju pimavanserina i levodope. Njihovi strujni vrhovi na 0.37 V i 1.07 V se jasno vide, a visine pikova, koji im pripadaju, u prvom i drugom mjerenju su gotovo jednake.

Mokraćna kiselina kao metabolit našeg organizma se također može pronaći u tjelesnim tekućinama. Ispitati utječe li pik mokraćne kiseline na mogućnost određivanja pimavanserina i levodope pravokutnovalnom voltometrijskom metodom bio je cilj sljedećeg mjerenja. Pripremljena je otopina mokraćne kiseline koncentracije 1×10^{-4} mol/dm³. Napravljeno je mjerenje otopine same mokraćne kiseline spomenute koncentracije te u kombinaciji s otopinama pimavanserina i levodope čije su koncentracije 4×10^{-6} mol/dm³. Dobiveni rezultati prikazani su na voltamogramima na slici 25, a mjerenja su provedena pri već spomenutim uvjetima u poglavlju 3.5. uvjeti mjerenja, te na GCE koja je modificirana na način kao što je opisano u poglavlju 3.4. priprema elektroda.

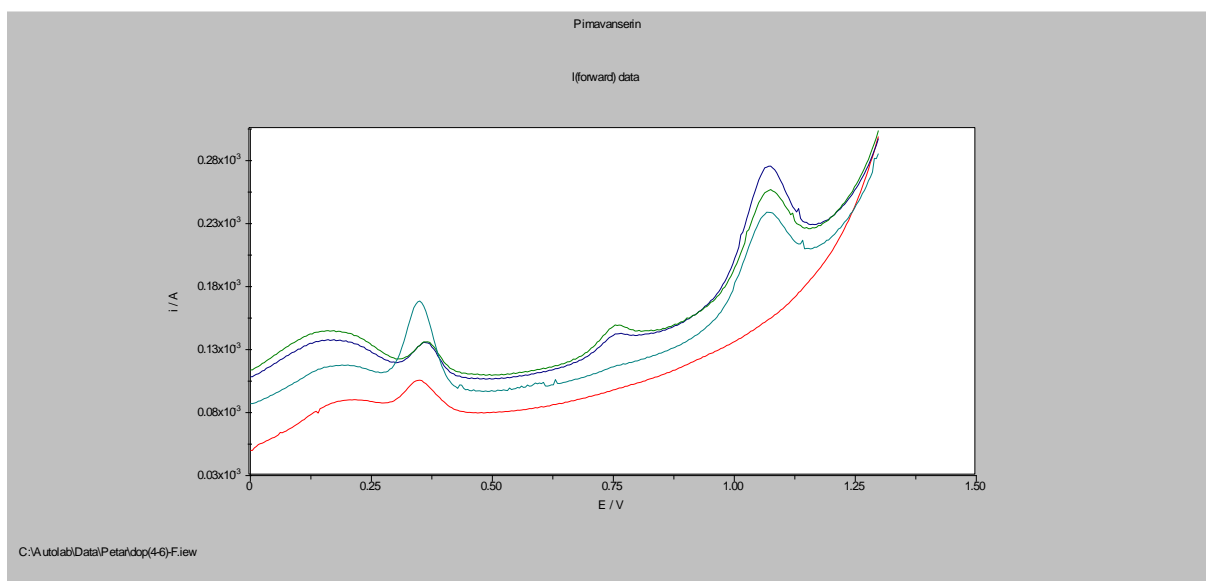


Slika 25. Pravokutnovalni voltamogrami dobiveni mjerenjem otopine same mokraćne kiseline koncentracije 1×10^{-4} mol/dm³ (crvena krivulja) te otopina pimavanserina i levodope koncentracije 4×10^{-6} mol/dm³ s dodanom mokraćnom kiselinom koncentracije 1×10^{-4} mol/dm³ (zeleno i plavo krivulje) pri optimalnim uvjetima.

Mjerenjem je ustanovljeno da mokraćna kiselina pokazuje strujni vrh pri otprilike 0,55 V te stoga ne utječe na mogućnost analize pimavanserina i levodope koji se s njom u kombinaciji mogu odrediti *stripping* pravokutnovalnom voltametrijskom metodom.

Budući da je dopamin najvažniji neurotransmitter povezan s PB-om, a i sama levodopa se dekarboksilacijom pretvara u dopamin koji pokazuje svoj farmakološki učinak, sljedećim mjerenjem se željela ispitati mogućnost određivanja pimavanserina s levodopom i dopaminom. Za ispitivanje su se pripremile otopine dopamina koncentracije 4×10^{-6} mol/dm³, 2.5×10^{-7} mol/dm³ i 5×10^{-7} mol/dm³.

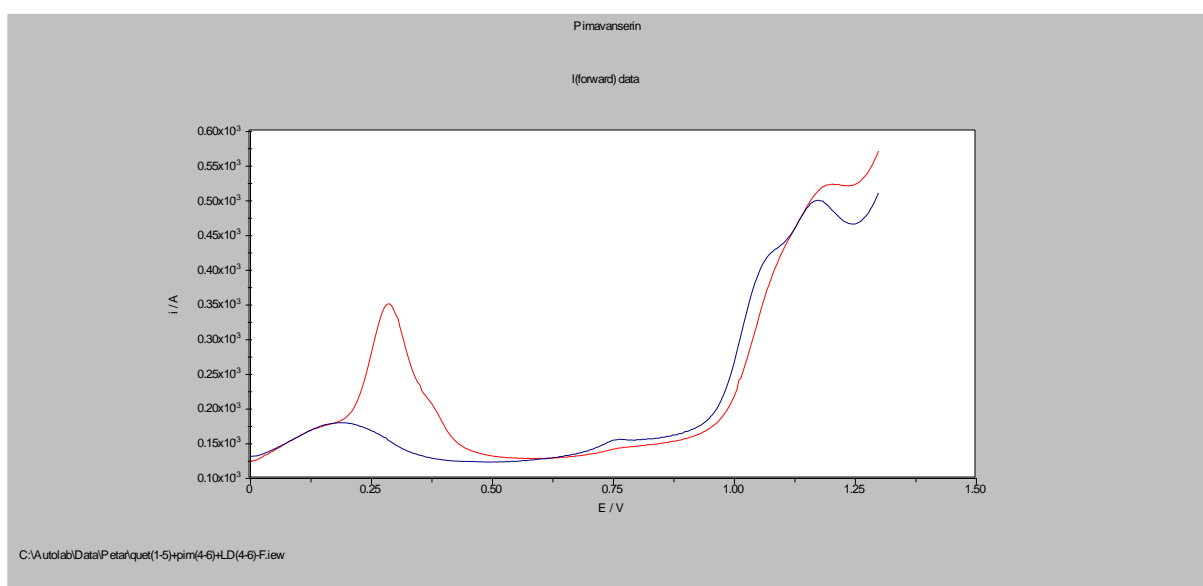
Koncentracije otopina levodope i pimavanserina koje su se koristile u mjerenju iznosile su 4×10^{-6} mol*dm⁻³. Dobiveni voltamogrami prikazani su u nastavku, na slici 26.



Slika 26. Pravokutnovalni voltamogrami dobiveni mjerenjem otopine samog dopamina koncentracije 4×10^{-6} mol/dm³ (crvena krivulja) i otopina levodope i pimavanserina koncentracije 4×10^{-6} mol/dm³ uz dodatak dopamina koncentracije 2.5×10^{-7} mol/dm³ (zelena krivulja), 5×10^{-7} mol/dm³ (plava krivulja) i 4×10^{-6} mol/dm³ (tirkizna krivulja), dobiveni pri optimalnim uvjetima.

Iz voltamograma se najprije, mjerenjem otopine samog dopamina (crvena krivulja), može vidjeti da se strujni vrh dopamina nalazi na vrijednosti potencijala gdje se otprilike nalazi i strujni vrh levodope. To se donekle i moglo očekivati, s obzirom da levodopa i dopamin imaju jako slične strukture – levodopa se dekarboksilacijom pretvara u dopamin. U mjerenju koje odgovara tirkiznoj liniji, na potencijalu od otprilike 0.37 V, može se vidjeti samo jedan strujni vrh koji je posljedica oksidacije i levodope i dopamina. On je značajno veće struje nego očekivano za ispitivanu koncentraciju levodope. Stoga se može zaključiti da dopamin ne utječe na određivanje pimavanserina pravokutnovalnom voltametrijskom metodom korištenjem modificirane elektrode, ali smeta u određivanju levodope kad su njegove koncentracije veće od 5×10^{-7} mol/dm³ budući da im se strujni vrhovi preklapaju. Međutim kad se uzmu u obzir koncentracije dopamina koje se mogu očekivati u plazmi (2×10^{-10} mol/dm³) zaključujemo da dopamin ne bi interferirao niti s određivanjem levodope u uzorcima plazme.

U sljedećem se ispitivanju željelo provjeriti, može li se pimavanserin i levodopa odrediti u kombinaciji s jednim drugim antipsihotikom – kvetiapiinom. Koncentracija kvetiapina koja je korištena u ispitivanju je 1×10^{-5} mol/dm³, a levodope i pimavanserina 4×10^{-6} mol/dm³. Najprije je snimljen voltamogram samog kvetiapina, a potom otopine u kojoj su kvetiapin, levodopa i pimavanserin spomenutih koncentracija. Dobiveni rezultati su prikazani u nastavku (slika 27), a mjerenja su provedena pri već spomenutim uvjetima u poglavlju 3.5. uvjeti mjerenja, na GCE modificiranoj na način kao što je opisano u poglavlju 3.4. priprema elektroda.

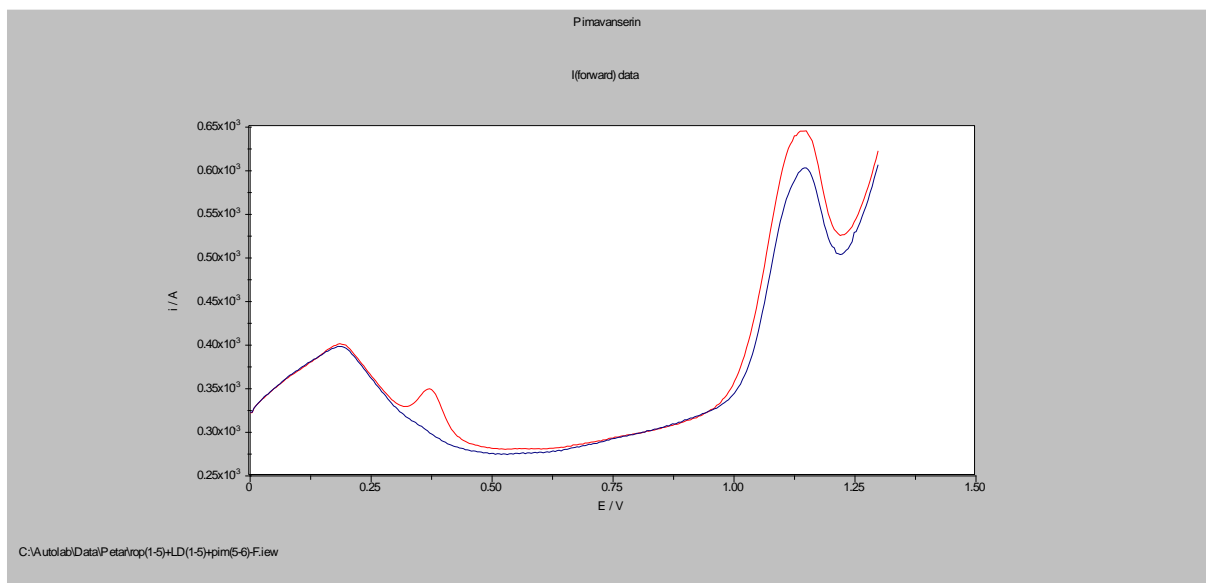


Slika 27. Voltamogrami dobiveni mjerenjem otopine samog kvetiapina ($c=1 \times 10^{-5}$ mol/dm³) (plava krivulja) i mjerenjem otopine pimavanserina i levodope ($c=4 \times 10^{-6}$ mol/dm³) kojoj je dodan kvetiapina ($c=1 \times 10^{-5}$ mol/dm³) (crvena krivulja) pri optimalnim uvjetima.

Nakon mjerenja otopine kvetiapina, iz dobivenog voltamograma koji je na slici prikazan plavom krivuljom, može se vidjeti da kvetiapin pokazuje oksidacijsku struju pri potencijalu od otprilike 1,12 V. Moglo se očekivati da će u sljedećem mjerenju, kada se mjere sva tri analita zajedno (kvetiapin, levodopa i pimavanserin), pik kvetiapina interferirati s pikom pimavanserina koji ima strujni vrh pri vrijednosti potencijala od 1,07 V. To je sljedećim mjerenjem i potvrđeno. Na voltamogramu koji odgovara crvenoj krivulji, ne vide se posebno strujni vrhovi oksidacije pimavanserina i kvetiapina, već su spojeni u jedan široki i slabo definirani strujni vrh. Može se zaključiti da kvetiapin interferira u analizi pimavanserina,

međutim modificirana elektroda bila bi pogodna za istovremeno određivanje levodope i kvetiapina koji se također koristi kao antipsihotik u liječenju bolesnika s PB-i.

Može li se ropinirol kao česta terapija u liječenju PB-a, odrediti u kombinaciji s pimavanserinom i levodopom, bila je svrha sljedećeg ispitivanja. Najprije je snimljen voltamogram ropinirola koncentracije $1 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, a potom otopine u kojoj se nalaze ropinirol već prethodno spomenute koncentracije i pimavanserin koncentracije $5 \times 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ i levodopa koncentracije $1 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$. Prethodnim pretraživanjem znanstvenih radova može se pronaći da se ropinirol oksidira pri vrijednosti potencijala od otprilike 1,20 V te se stoga može očekivati interferencija sa strujnim vrhom pimavanserina (Nigović i sur., 2013). Rezultati su prikazani dolje u nastavku (slika 28), a mjerenja su provedena na modificiranoj elektrodi na način kao što je opisano u poglavlju 3.4. priprema elektroda, te pod uvjetima navedenima u poglavlju 3.5. uvjeti mjerenja.



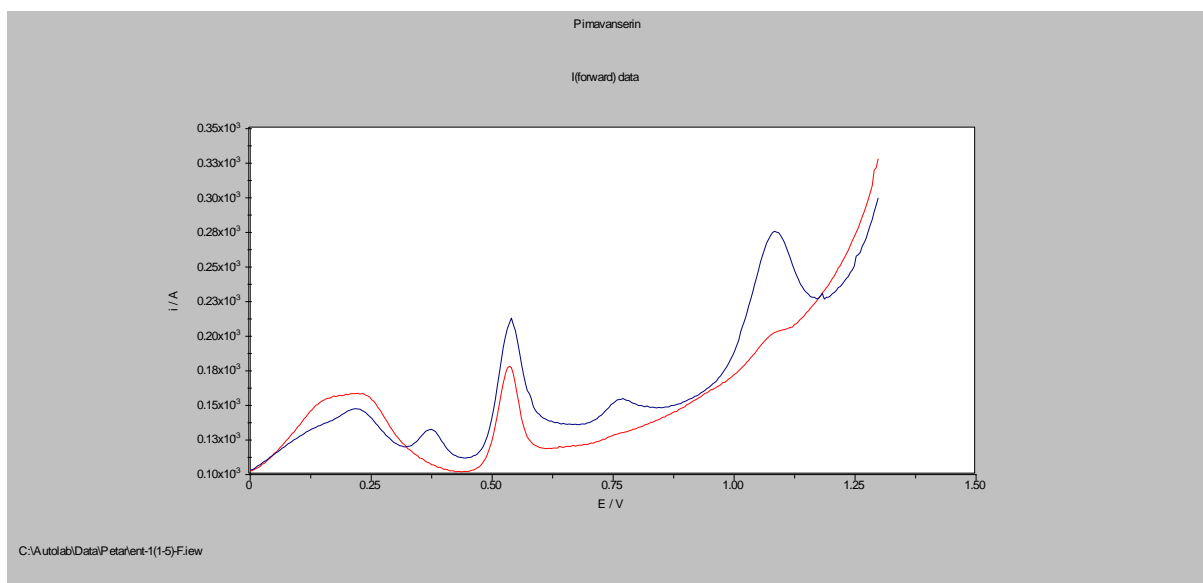
Slika 28. Voltamogrami ropinirola koncentracije $1 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ (plavi voltamogram) i otopina levodope ($c=1 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$), pimavanserina ($c=5 \times 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$) i ropinirola ($c=1 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$) (crveni voltamogram) pri optimalnim uvjetima.

Na slici 28 vidi se da ropinirol pokazuje strujni vrh pri potencijalu koji je svojom vrijednošću vrlo blizu potencijala strujnog vrha pimavanserina (plava krivulja), a mjerenjem otopine u kojoj su oba lijeka zajedno s levodopom vide se samo dva pika jer interferiraju strujni vrhovi oksidacije ropinirola i pimavanserina (crvena krivulja) pa vidimo za oba lijeka samo jedan strujni vrh, a ne dva.

Ako se levodopa primijeni kao monoterapija za liječenje PB-a, postoji vrlo velika vjerojatnost da neće moći postići svoj maksimalni učinak, budući da se dopa-dekarboksilazom dekarboksilira u dopamin, a također se COMT-om može metilirati u 3-O-metildopu, a sve se to događa prije nego što prođe krvno-moždanu barijeru. Zbog toga se s levodopom koriste njezini „lijekovi čuvari“ – inhibitori dopa-dekarboksilaze (benzerazid, karbidopa...) i inhibitori COMT-a (entakapon, tolkapon, opikapon).

Mogućnost određivanja pimavanserina i levodope u kombinaciji s entakaponom pravokutnovalnom voltametrijskom metodom bila je svrha sljedećeg ispitivanja.

Najprije je pripremljena otopina entakapona koncentracije 1×10^{-5} mol/dm³ i snimljen je njegov voltamogram. Zatim je pripremljena otopina levodope i pimavanserina koncentracije 4×10^{-6} mol/dm³ te entakapona koncentracije 1×10^{-5} mol/dm³. Mjerenje je izvedeno na GCE, koja je modificirana nanomaterijalima na način kao što je opisano u poglavlju 3.4. priprema elektroda, a ispitivanje je provedeno pri uvjetima koji su navedeni u poglavlju 3.5. uvjeti mjerenja. Dobiveni voltamogram je prikazan u nastavku na slici 29.



Slika 29. Pravokutnovalni voltamogrami dobiveni mjerenjem otopine samog entakapona ($c=1 \times 10^{-5}$ mol/dm³) (crvena krivulja) i mjerenjem otopine pimavanserina i levodope ($c=4 \times 10^{-6}$ mol/dm³) kojoj je dodan entakapon ($c=1 \times 10^{-5}$ mol/dm³) (plava krivulja).

Entakapon pokazuje strujni vrh, koji je posljedica njegove oksidacijske na potencijalu od 0,54 V, što se jasno može iščitati s voltamograma na slici 29 (crvena krivulja). Na plavome voltamogramu se jasno vide tri strujna vrha: 1) strujni vrh pri vrijednosti potencijala od 0,37 V koji pripada levodopi i posljedica je njezine oksidacije, 2) strujni vrh pri vrijednosti potencijala od 0,54 V koji pripada entakaponu i posljedica je njegove oksidacije i 3) strujni vrh koji je posljedica oksidacije pimavanserina na potencijalu od 1,07 V. Može se uočiti i pik na otprilika 0,77 V koji pripada oksidacijskom produktu levodope, što je već i dokazano jednim od prethodnih ispitivanja (voltamogram na slici 16). Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da entakapon ne smeta u određivanju pimavanserina i levodope pravokutnovalnom voltametrijskom metodom te da modificirana elektroda pokazuje dobru selektivnost i potencijal za razvoj analitičke metode za istovremeno određivanje pimavanserina, levodope i

entakapona budući da u literaturi još uvijek nije objavljena niti jedna analitička metoda koja je razvijena za istovremenu analizu ova tri antiparkinsonika.

5. ZAKLJUČCI

Mjerenjima su dobiveni odgovori o mogućnosti određivanja pimavanserina u kombinaciji s različitim tvarima pravokutnovalnom voltametrijskom metodom, uz prethodno pretkoncentriravanje analita tijekom 60 sekundi na površini elektrode od staklastog ugljika koja je modificirana nanomaterijalima (smjesom GrNP i MWCNT 1:1, koncentracije 1 mg/mL, u 0,3% Nafionu), pri frekvenciji od 75 Hz, amplitudi pulsa od 20 mV i porasta potencijala 4 mV.

Ispitivanjem oksidacije pimavanserina u kombinaciji s levodopom pri različitim koncentracijama, ustanovljeno je kako ova dva spomenuta analita ne interferiraju, odnosno ne smetaju u međusobnom određivanju pravokutnovalnom voltametrijskom metodom uz prethodno pretkoncentriravanje na površini modificirane elektrode. Strujni vrhovi su im jasno definirani i dobro odvojeni. Levodopa se oksidira pri potencijalu 0,37 V, a pimavanserin na 1,07 V. Dobivena je linearna ovisnost izmjerenih jakosti struja o koncentraciji pimavanserina u rasponu od 5×10^{-7} mol/dm³ do 9×10^{-6} mol/dm³, dok su za levodopu ustanovljena dva područja linearnosti. Prvo područje linearnosti je u rasponu koncentracija od 1×10^{-6} mol/dm³ do 2×10^{-5} mol/dm³, a drugo od 2×10^{-5} mol/dm³ do 4×10^{-5} mol/dm³. Usporedba nagiba kalibracijskih pravaca, dobivenih pri promjeni koncentracije jednog analita dok je drugi konstante vrijednosti s onima kad se mijenjaju koncentracije oba lijeka, ukazuje da pimavanserin i levodopa ne utječu međusobno na njihovo istovremeno određivanje, uključujući i adsorpciju lijeka na nanokompozitni sloj razvijenog senzora. Prilikom analize na voltamogramima je uočen i treći strujni vrh na potencijalu 0,77 V, a mjerenjem otopine same levodope zaključeno je da se radi o njezinom elektroaktivnom oksidacijskom produktu.

Tijekom mjerenja pimavanserina i levodope u kombinaciji s glukozom, natrijevim kloridom, kalijev kloridom, natrijevim karbonatom i natrijevim hidrogenfosfatom ustanovljeno je da ni jedan od ispitivanih spojeva ne utječe na određivanje pimavanserina i levodope. Također, ni mokraćna kiselina ne utječe na mogućnost određivanja, s obzirom da njezin strujni vrh pri potencijalu 0,55 V ne interferira sa strujnim vrhovima pimavanserina i levodope. Oksidacijski pik dopamina opažen pri 0,37 V nije utjecao na mogućnost određivanja samog pimavanserina, ali utječe na određivanje levodope iznad koncentracije 5×10^{-7} mol/dm³ što je značajno više od njegove koncentracije očekivane u serumu.

U kombinaciji s ostalim lijekovima koji se primjenjuju u liječenju PB-i, kvetiapin pokazuje oksidacijski vrh pri vrijednosti potencijala 1,12 V, blizu strujnog vrha potencijala pimavanserina pa interferira s njegovim određivanjem. Isto je i s ropinirolom, koji također

daje strujni vrh na iznosu potencijala koji je vrlo blizu vrijednosti potencijala pimavanserina, pa se ni on u kombinaciji s pimavanserinom ne može odrediti. Entakapon je u ispitivanju dao jedan oksidacijski strujni vrh na potencijalu 0,54 V. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da entakapon ne smeta u određivanju pimavanserina i levodope pravokutnovalnom voltametrijskom metodom te da modificirana elektroda pokazuje dobru selektivnost i potencijal za razvoj analitičke metode za istovremeno određivanje pimavanserina, levodope i entakapona budući da u literaturi još uvijek nije objavljena niti jedna analitička metoda koja je razvijena za istovremenu analizu ova tri antiparkinsonika.

6.POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

6.1. KRATICE

CNT – ugljikove nanocijevi (eng. *carbon nanotubes*)

COMT – katehol-O-metiltransferaza (eng. *catechol-O-methyltransferaze*)

CVD – eng. *Chemical vapour deposition*

CYP3A4 – citokrom P450 3A4

CYP3A5 – citokrom P450 3A5

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (eng. *deoxyribonucleic acid*)

DOPA – 3,4-dihidroksifenilalanin

E_{acc} – potencijal akumulacije

FDA – Američka Agencija za hranu i lijekove (eng. *Food and Drug Administration*)

GCE – staklasta ugljikova elektroda (eng. *glassy carbon electrode*)

GrNP – grafenove nanopločice (eng. *graphene nanoplates*)

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

MWCNT – višeslojne ugljikove nanocijevi (eng. *multi walled carbon nanotubes*)

PB – Parkinsonova bolest

SWCNT – jednoslojne ugljikove nanocijevi (eng. *single walled carbon nanotubes*)

SWV – pravokutnovalna voltometrija (eng. *square wave voltammetry*)

SŽS – središnji živčani sustav

t_{acc} – vrijeme akumulacije

7. LITERATURA

- Ambrosi A., Chua CK., Bonanni A., Pumera M. Electrochemistry of Graphene and Related Materials. *Chemical reviews*. 2014. 7150-7165.
- Brusač E. 2018. Oksidacija i adsorpcija nepafenaka na površini elektrode modificirane različitim nanomaterijalima. Diplomski rad. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu. Farmaceutsko – biokemijski fakultet.
- Buzea C., Pacheco I., Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*. 2007. 18-43.
- Cruz MP. Pimavanserin (Nuplazid): A Treatment for Hallucinations and Delusions Associated With Parkinson's Disease. *Drug Forecast*. 2017. 368-371.
- CVD Graphene, 2017., <https://www.acsmaterial.com/>, pristupljeno 01.07.2022.
- Dascalescu D, Apetrei C. Voltammetric Determination of Levodopa Using Mesoporous Carbon—Modified Screen-Printed Carbon Sensors. *Sensors*. 2021. 1-22.
- Dekanski AB., Stevanović J., Stevanović R., Nikolić BZ., Jovanović VM. Glassy carbon electrodes I. Characterization and electrochemical activation. *Carbon*. 2001. 39. 1195-1205.
- Ereš Z. Grafen. *Osvježimo znanje*. 2019. 137-138.
- Kounaves SP. Voltammetric techniques. U: Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry. Settle F, urednik, Upper Saddle River, New Jersey, Prentice Hall PTR, 1997, str. 709-725.
- Kurbanoglu S., Ozkan SA. Electrochemical carbon based nanosensors: A promising tool in pharmaceutical and biomedical analysis. Ankara, Turska, Ankara University. 2017. 439-457.
- Mauritz KA., Moore RB. State of Understanding of Nafion. *Chem. Rev.*, 2004, 104, 4535-4586.
- Meltzer HY., Mills R., Revell S., Williams H., Johnson A., Bahr D., Friedman JH. Pimavanserin, a serotonin_{2A} receptor inverse agonist, for the treatment of Parkinson's disease psychosis. *Neuropsychopharmacology*. 2010. 35. 881-892.
- Nigović B., Behetič S. Elektroanalitika u farmaciji. *Farm. Glas*. 2007. 63. 163-175.
- Nigović B., Jurić S., Mornar A., Malenica I. Electrochemical studies of ropinirole, an anti-Parkinson's disease drug. *J. Chem. Sci*. 2013. 1197–1205.

Piljac I. Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu. 2010. 89-94.

Pimavanserin, 2018., <http://www.go.drugbank.com>, pristupljeno 25. 05. 2022.

Pimavanserin, 2021., <https://go.drugbank.com/>, pristupljeno 24.06.2022.

Product information: Pimavanserin, 2017., <https://www.caymanchem.com/>, pristupljeno 03.05.2022.

Rao CNR., Biswas K., Subrahmanyama KS., Govindaraja A. Graphene, the new nanocarbon. *Journal of materials chemistry*. 2009. 2457-2469.

Scholz F. Voltammetric techniques of analysis: the essentials. Greifswald, Njemačka, Institute of Biochemistry, University of Greifswald. 2015. 1-24.

Shao Y., Wang J., Wu H., Liu J., Aksay IA., Lina Y. Graphene Based Electrochemical Sensors and Biosensors: A Review. *Electroanalysis Wiley-VCH*. 2009. 1027-1036.

Sinha A., Dhanjai, Jain R., Zhao H., Karolia P., Jadon N. Voltammetric sensing based on the use of advanced carbonaceous nanomaterials: a review. *Microchimica Acta*. 2018. 1-30.

Srivastava AK., Upadhyay SS., Rawool CR., Punde NS., Rajpurohit AS. Voltammetric Techniques for the Analysis of Drugs using Nanomaterials based Chemically Modified Electrodes. *Current Analytical Chemistry*. 2015. 249-276.

Tiwari SK., Sahoo S., Wang N., Huczko A. Graphene research and their outputs: Status and prospect. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*. 2020. 1-20.

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

Vuletić V. Parkinsonova bolest – nove spoznaje. *Medicus*. 2018. 28. 27-32.

Yoo E-H., Lee SY. Glucose biosensors: An overview of use in clinical practice. *Sensors*. 2010, 10. 4558 – 4576.

8. SAŽETAK/SUMMARY

8.1. SAŽETAK

Pimavanserin je antipsihotik s velikim potencijalom u liječenju deluzija i halucinacija u Parkinsonovoj bolesti, vrlo čestoj kroničnoj neurodegenerativnoj bolesti.

Svrha ovog rada bila je ispitivanje selektivnosti voltametrijske metode prilikom istovremenog određivanja pimavanserina i levodope u kombinaciji s različitim lijekovima i tvarima. Za ispitivanje je odabrana pravokutnovalna voltametrijska tehnika, a mjerenja su napravljena na površini elektrode od staklastog ugljika koja je modificirana nanomaterijalima (smjesa grafenovih nanopločica i grafitiziranih višeslojnih ugljikovih nanocjevčica 1:1, koncentracije 1 mg/mL, u 0,3% Nafionu), uz prethodno pretkoncentriravanje analita tijekom 60 sekundi, pri frekvenciji 75 Hz, amplitudi pulsa od 20 mV i porastu potencijala 4 mV.

Ispitivanjem je ustanovljeno kako pimavanserin i levodopa međusobno ne interferiraju pri mjerenju novom voltametrijskom metodom. Strujni vrh pimavanserina nalazio se pri vrijednosti potencijala od 1,07 V, a strujni vrh levodope pri 0,37 V. Utvrđena su i područja linearnosti za oba lijeka.

Tvari koje se mogu pronaći u tjelesnim tekućinama, kao što su glukoza, natrijev klorid, kalijev klorid, karbonati, fosfati i mokraćna kiselina, ne smetaju prilikom istovremenog određivanja pimavanserina i levodopa.

Neki lijekovi kao što su kvetiapin i ropinirol smetaju u određivanju pimavanserina, budući da su im oksidacijski vrhovi preblizu oksidacijskom vrhu pimavanserina i s njime interferiraju. Oksidacijski pik dopamina opažen pri 0,37 V nije utjecao na mogućnost određivanja pimavanserina, ali jest na određivanje levodope pri koncentraciji većoj od 5×10^{-7} mol/dm³, što je značajno više od njegove očekivane koncentracije u serumu.

Entakapon u mjerenjima nije utjecao na mogućnost određivanja pimavanserina i levodope, budući da njegov strujni vrh na potencijalu 0,54 V ne interferira ni sa strujnim vrhom pimavanserina niti sa strujnim vrhom levodope.

8.2. SUMMARY

Pimavanserin is an antipsychotic with great potential in the treatment of delusions and hallucinations in Parkinson's disease, a very common chronic neurodegenerative disease.

The aim of these thesis was examination of selectivity of votammetric method during simultaneous determination of pimavanserin and levodopa in combination with different drugs and substances. For examination was chosen square wave voltammetry technique, and the measurements were made on the surface of glassy carbon electrode, which was modified with nanomaterials (mixture of graphene nanoplates and graphitized multi-walled carbon nanotubes 1:1, concentration of 1 mg/mL, in 0,3% Nafion), with previous preconcentration of analyte for 60 seconds, at the frequency of 75 Hz, with pulse amplitude of 20 mV and increase of potential of 4mV.

Determination have proven that pimavanserin and levodopa don't interfere with each other when they are measured with new voltammetric method. Pimavanserin shown current peak at potential of 1,07 V, and levodopa shown current peak at 0,37 V. Linearity ranges for both drugs were also determined.

Substances that can be found in body liquids, such as glucose, sodium chloride, potassium chloride, carbonates, fosfates and uric acid, do not interfere in simultaneously determination with pimavanserin and levodopa.

Some medications such as quetiapine and ropinirole interfere in determination of pimavanserin, because their oxidation peaks are too close to oxidation peak pimavanserin and with it they interfere. Oxidation peak of dopamine observed at 0,37 V din't affect on possibillity of determination of pimavanserin, but it interfere with possibillity of determination of levodopa at concentration higher than 5×10^{-7} mol/dm³, what is significantly higher than expected serum concentration.

In the measurements, entacapone did not affect the ability to determine pimavanserin and levodopa, since its current peak at a potential of 0.54 V doesn't interfere with the current peak of pimavanserina or the current peak of levodopa.

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 VOLTAMETRIJSKE METODE ZA ISTOVREMENO ODREĐIVANJE PIMAVANSERINA I LEVODOPE

Petar Fuš

SAŽETAK

Pimavanserin je antipsihotik s velikim potencijalom u liječenju deluzija i halucinacija u Parkinsonovoj bolesti, vrlo čestoj kroničnoj neurodegenerativnoj bolesti. Svrha ovog rada bila je ispitivanje selektivnosti voltametrijske metode prilikom istovremenog određivanja pimavanserina i levodope u kombinaciji s različitim lijekovima i tvarima. Za ispitivanje je odabrana pravokutnovalna voltametrijska tehnika, a mjerenja su napravljena na površini elektrode od staklastog ugljika koja je modificirana nanomaterjalima (smjesa grafenovih nanopločica i grafitiziranih višeslojnih ugljikovih nanocjevčica 1:1, koncentracije 1 mg/mL, u 0,3% Nafionu), uz prethodno pretkoncentriravanje analita tijekom 60 sekundi, pri frekvenciji 75 Hz, amplitudi pulsa od 20 mV i porastu potencijala 4 mV. Ispitivanjem je ustanovljeno kako pimavanserin i levodopa međusobno ne interferiraju pri mjerenju novom voltametrijskom metodom. Strujni vrh pimavanserina nalazio se pri vrijednosti potencijala od 1,07 V, a strujni vrh levodope pri 0,37 V. Utvrđena su i područja linearnosti za oba lijeka. Tvari koje se mogu pronaći u tjelesnim tekućinama, kao što su glukoza, natrijev klorid, kalijev klorid, karbonati, fosfati i mokraćna kiselina, ne smetaju prilikom istovremenog određivanja pimavanserina i levodope. Neki lijekovi kao što su kvetiapin i ropinirol smetaju u određivanju pimavanserina, budući da su im oksidacijski vrhovi preblizu oksidacijskom vrhu pimavanserina i s njime interferiraju. Oksidacijski pik dopamina opažen pri 0,37 V nije utjecao na mogućnost određivanja pimavanserina, ali jest na određivanje levodope pri koncentraciji većoj od 5×10^{-7} mol/dm³, što je značajno više od njegove očekivane koncentracije u serumu. Entakapon u mjerenjima nije utjecao na mogućnost određivanja pimavanserina i levodope, budući da njegov strujni vrh na potencijalu 0,54 V ne interferira ni sa strujnim vrhom pimavanserina niti sa strujnim vrhom levodope.

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

Rad sadrži: 63 stranica, 29 grafičkih prikaza, 2 tablice i 27 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Pimavanserin, levodopa, pravokutnovalna voltametrija, selektivnost, elektroda modificirana nanomaterjalima, *stripping* voltametrija

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

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

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

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

Rad prihvaćen: kolovoz 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

SELECTIVITY OF THE VOLTAMMETRIC METHOD FOR THE SIMULTANEOUS DETERMINATION OF PIMAVANSERIN AND LEVODOPA

Petar Fuš

SUMMARY

Pimavanserin is an antipsychotic with great potential in the treatment of delusions and hallucinations in Parkinson's disease, a very common chronic neurodegenerative disease. The aim of these thesis was examination of selectivity of votammetric method during simultaneous determination of pimavanserin and levodopa in combination with different drugs and substances. For examination was chosen square wave voltammetry technique, and the measurements were made on the surface of glassy carbon electrode, which was modified with nanomaterials (mixture of graphene nanoplates and graphitized multi-walled carbon nanotubes 1:1, concentration of 1 mg/mL, in 0,3% Nafion), with previous preconcentration of analyte for 60 seconds, at the frequency of 75 Hz, with pulse amplitude of 20 mV and increase of potential of 4mV. Determination have proven that pimavanserin and levodopa don't interfere with each other when they are measured with new voltammetric method. Pimavanserin shown current peak at potential of 1,07 V, and levodopa shown current peak at 0,37 V. Linearity ranges for both drugs were also determined. Substances that can be found in body liquids, such as glucose, sodium chloride, potassium chloride, carbonates, fosfates and uric acid, do not interfere in simultaneously determination with pimavanserin and levodopa. Some medications such as quetiapine and ropinirole interfere in determination of pimavanserin, because their oxidation peaks are too close to oxidation peak pimavanserin and with it they interfere. Oxidation peak of dopamine observed at 0,37 V din't affect on possibillity of determination of pimavanserin, but it interfere with possibillity of determination of levodopa at concentration higher than 5×10^{-7} mol/dm³, what is significantly higher than expected serum concentration. In the measurements, entacapone did not affect the ability to determine pimavanserin and levodopa, since its current peak at a potential of 0.54 V doesn't interfere with the current peak of pimavanserina or the current peak of levodopa.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry. Thesis includes: 63 pages, 29 figures, 2 tables and 27 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Pimavanserin, levodopa, square wave voltammetry, selectivity, nanomaterial-modified electrode, *stripping* voltammetry

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

Reviewers: **Biljana Nigović, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Miranda Sertić, Ph.D. Associate 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: august 2022.