

Iva Mitrović

**Selektivna elektroanalitička metoda za
određivanje sulfasalazina**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

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

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Biljani Nigović na mentorstvu, savjetima i pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada. Način na koji se prof. dr. sc. Biljana Nigović posvetila ovom radu je inspirativan i motivirajući. Veliko hvala i ostalim djelatnicima Zavoda za analitiku i kontrolu lijekova koji su moj boravak na zavodu učinili ugodnim.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. SULFASALAZIN.....	2
1.2. ELEKTROANALITIČKE METODE.....	5
1.2.1. Voltometrija.....	6
1.2.1.1. Ciklička voltometrija.....	7
1.2.1.2. Pravokutnovalna voltometrija.....	9
1.2.2. Elektrode.....	10
1.2.2.1. Ugljikove elektrode.....	11
1.2.2.2. Elektroda od staklastog ugljika.....	11
1.2.2.3. Ugljkovi nanomaterijali.....	12
1.2.2.4. Modifikacije elektroda s bizmut nanočesticama.....	13
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	14
3. MATERIJALI I METODE.....	16
3.1. KEMIKALIJE.....	17
3.2. RADNI INSTRUMENTI.....	18
3.3. UVJETI MJERENJA.....	18
3.4. PRIPREMA ELEKTRODE.....	19
3.5. PRIPREMA OTOPINA.....	19
3.5.1. Otopine sulfasalazina.....	19
3.5.2. Otopina Britton-Robinson pufer.....	20
3.5.3. Otopine za ispitivanje interferencija.....	20
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	22
5. ZAKLJUČAK.....	35
6. LITERATURA.....	37

7. SAŽETAK/SUMMARY.....	41
--------------------------------	-----------

7.1. SAŽETAK.....	42
-------------------	----

7.2. SUMMARY.....	43
-------------------	----

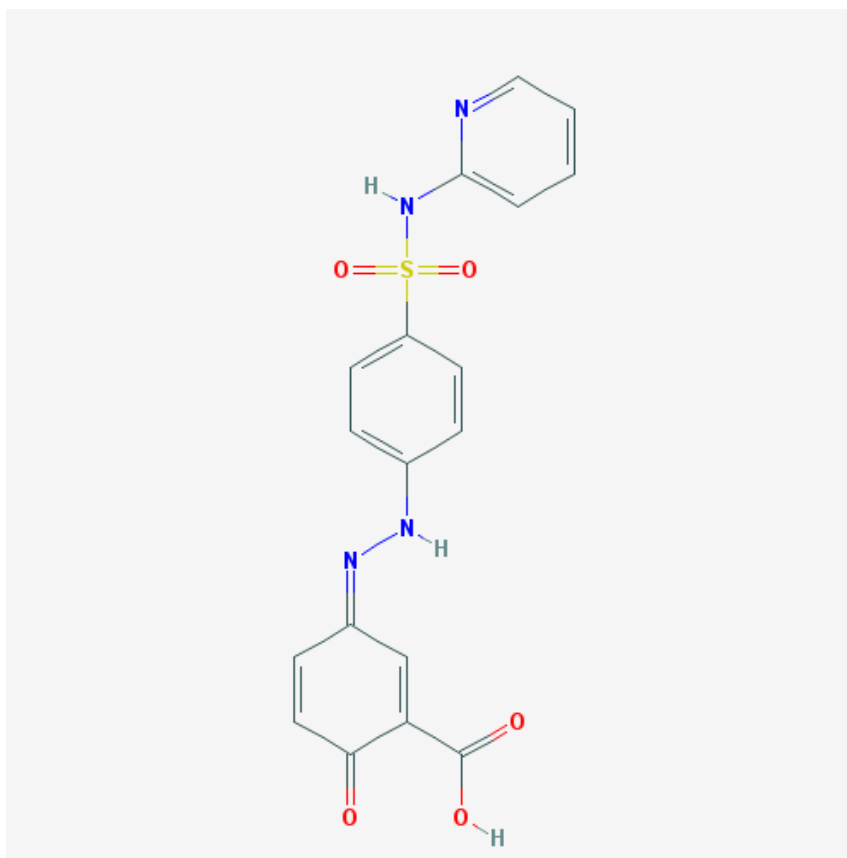
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

1.1. SULFASALAZIN

Sulfasalazin, 6-okso-3-((4-(piridin-2-ilsulfamoil)fenil)hidraziniliden] cikloheksa-1,4-dien-1-karboksilna kiselina, se ubraja u antireumatike koji modificiraju bolest (slika 1). Metabolizira se u sulfapiridin i 5-aminosalicilnu kiselinu (5-ASA, mesalazin). Djelotvoran je u liječenju reumatoidnog artritisa, juvenilnom artritisu i u ankilozatnom spondilitisu te u liječenju upalne crijevne bolesti koja obuhvaća dva različita poremećaja: ulcerozni kolitis i Chronovu bolest.

Početna doza za liječenje reumatoidnog artritisa je 0,5 – 1 g / dnevno, postupno se povećava do 1 g 2 - 3 puta na dan, a maksimalna dnevna doza je 10 g. Za liječenje Chronove bolesti za odrasle preporučena doza za vrijeme akutnih napadaja je 1 – 2 g 4 puta na dan, a za održavanje remisije se smanjuje do 0,5 g 4 puta na dan. Preporuke su identične i za ulcerozni kolitis i proktitis. Kod djece starije od 2 godine za vrijeme akutnog napadaja preporučuje se 40 – 60 mg/kg na dan, a za održavanje remisije 20 – 30 mg/kg na dan (Francetić i sur. , 2015).



Slika 1. Struktura sulfasalazina (preuzeto s: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Sulfasalazin i njegovi aktivni metaboliti posjeduju imunomodulatorno i antibakterijsko djelovanje. Smatra se da je za aktivnost najvažnije pucanje azo-veze, čime nastane sulfapiridin i 5-ASA koja je aktivna komponenta i pripisuje joj se protuupalno djelovanje. Sulfapiridin služi samo kao nosač 5-ASA čija učinkovitost proizlazi iz inhibicije sinteze prostaglandina i lipooksigenaznog metaboličkog puta arahidonske kiseline (Francetić Igor i sur., 2015). Prepostavlja se da 5-ASA utječe i na proizvodnju upalnih citokina preko inhibicije aktivnosti transkripcijskog čimbenika NF- κ B koji je važan za ekspresiju proupalnih citokina. 5-ASA također može inhibirati funkciju stanica prirodnih ubojica, limfocita sluznice i makrofaga te hvatati reaktivne kisikove metabolite (Katzung i sur., 2011). Ne apsorbira se dobro u gastrointestinalnom traktu što ga čini pogodnim lijekom za ulcerozni kolitis i Chronovu bolest, svega 10 - 15 % nepromijenjenog lijeka se oralno apsorbira (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Nakon cijepanje 85% sulfapiridin se apsorbira te se acetilira u acetilsulfapiridin, a prsten hidroksilira. 5-ASA se nakon apsorpcije N-acetilira u epitelu crijeva i u jetri, pri čemu nastane metabolit bez značajnog protuupalnog učinka. Završni metabolit sulfapiridina se izlučuje bubrezima (Katzung i sur., 2011).

Kad bi se 5-ASA uzela sama kao djelatna tvar, 80% 5-ASA bi se apsorbiralo iz tankog crijeva i uopće nebi djelatna tvar stigla do distalnog dijela tankog crijeva ili do debelog crijeva u znatnijim količinama. Da se prevlada ta brza apsorpcija, 5-ASA je vezana azo-vezom te je tako izrazito smanjena apsorpcija ishodnog lijeka iz tankog crijeva jer u završnom dijelu ileuma i u debelom crijevu rezidente bakterije cijepaju azo-vezu s pomoć enzima azoreduktaza. Tako su viske koncentracija aktivnog oblika dostupne u završnom ileumu i u debelom crijevu (Katzung i sur., 2011).

Kod reumatoidnog artritisa djelovanje je vidljivo nakon 1 do 3 mjeseca, s karakterističnim padom C-reaktivnog proteina i drugih indikatora upale. Protuupalno djelovanje 5-ASA je izgleda najvažnije u liječenju upalnih crijevnih bolesti, te se očituje u smanjenon intezitetu upale. Ono je u prvom redu lokalno (www.halmed.hr).

Štetni učinci sulfasalazina se većinom pripisuju sistemskim učincima sulfapiridina te spori acetilatori sulfapiridina imaju izraženije nuspojave od brzih acetilatora.. Nuspojave su najčešće vezane uz dozu te uključuju mučninu, probavne poremećaje, glavobolje, artralgijske, mijalgije, supresiju koštane srži i slabost. Moguća je i preosjetljivost na sulfapiridina i 5-

ASA. Kako uzimanje lijeka smanjuje apsorpciju i daljnu preradu folne kiseline preporučuje se nadomjestak 1 mg/dnevno folne kiseline (Katzung i sur., 2011).

Ulcerozni kolitis je upalna bolest crijeva koja zahvaća debelo crijevo. Etiologija bolesti je još nerazriješena, a najčešće se javlja od 15. do 30. godine. Upala je ograničena na sluznicu, a najčešće se manifestira proljevima s primjesom krvi i sluzi u stolici s osjećajem nelagode i grčevite boli. Chronova bolest je kronična transmuralna upalna bolest crijeva koja najčešće zahvaća tanko crijevo, odnosno terminalni ileum, ali može zahvatiti bilo koji dio probavnog sustava. Za razliku od ulceroznog kolitisa, ovdje upala nije kontinuirana već segmentna, nema rektalnog krvarenja. Osnovni simptomi su kronični proljevi praćeni bolom u trbuhu, gubitak na težini, mučnine i povišena temperatura, a javlja se od 15. do 25. godine. Značajnije je izražena obiteljska predispozicije nego kod ulceroznog kolitisa, no i ovdje etiologija nije sasvim poznata (Kujundžić i sur., 2003).

Reumatoidni artritis je autoimuna bolest u kojoj su zglobovi, obično zglobovi šake i stopala, simetrično zahvaćeni upalom koja uzrokuje otok, bol, a često i propadanje unutrašnjosti zgloba. Etiologija bolesti je nepoznata. Početak bolesti je obično između 25. i 50. godine života, ali se može pojaviti u bilo kojoj životnoj dobi. Reumatoidni artritis može započeti iznenada, s istodobnom upalom više zglobova. Obično započinje jedva primjetno, postupno zahvaćajući različite zglobove. Upala je obično simetrična: kad je zahvaćen zglob na jednoj strani tijela, isti zglob je također zahvaćen na drugoj strani tijela. Tipično je da promjene započinjaju na malim zglobovima prstiju ruke i noge, šaka, stopala, na ručnom zglobu, laktu i gležnjevima. Zglobovi su bolni, često ukočeni, osobito nakon ustajanja iz kreveta i dužeg mirovanja. Neki ljudi se osjećaju umorni i slabi, osobito u rano prijepodne (www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik).

U Republici Hrvatskoj raspoloživi pripravci sulfasalazina su Salazopyrin EN 500 mg želučanootporne tablete i Sulfasalazin Krka EN 500 mg želučanootporne tablete (www.halmed.hr).

1.2. ELEKTORANALITIČKE METODE

Elektroanalitičke metode čine skupinu analitičkih metoda kod kojih se podatak o koncentraciji, aktivitetu ili drugom termodinamičkom svojstvu određivane molekulske vrste dobiva u ovisnosti o električnom naponu, struji ili naboju (Wang, 2000) Prema signalu pobude mogu se dijeliti se na:

- potenciometriju
- voltometriju
- kronoamperometriju
- elektrogravimetriju
- kronopotenciometriju
- kulometriju
- konduktometriju

Signal pobude je posljedica odvijanje elektrokemijske reakcije na radnoj elektrodi i mjerenoj varijabli iz koje se dobiva željeni analitički ili drugi podatak o ispitivanoj otopini. Imaju široku primjenu u farmaciji (Brooks i Tsai, 1996) pa tako se mogu koristiti za identifikaciju i određivanje ljekovitih tvari u različitim uzorcima, od farmaceutskih sirovina do bioloških tekućina nakon primjene terapijske doze. Njihove prednosti su visoka osjetljivost, brzina i selektivnost, a u prilog im ide i to što ne zahtjevaju provođenje postupaka odijeljivanje prije mjerenja, dok s druge strane tehnike poput tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, plinske i tankoslojne kromatografije zahtjevaju kompleksne predanalitičke postupke i skupe instrumente (Yang i sur., 2013).

Imaju primjenu u različitim stadijima istraživanje i razvoja lijekova. Europska farmakopeja zahtjeva za kontrolu čistoće pročišćene vode, visoko pročišćene vode i vode za injekcije primjenu konduktometrije. U farmakopejski postupcima također se primjenjuje i potenciometrijska titracija za određivanje sadržaja ljekovitih i pomoćnih tvari te onečišćenja. Na primjer koristi se za određivanje sadržaja lidokain hidroklorida i određivanje čistoće ioheksola (European Pharmacopoeia 5th ed., 2004). Elektrokemijskih senzori se također korise i u rutinskim analizama (Kauffman, 2002), a jedan od najpoznatiji primjera rutinske primjene elektroanalitike metode je glukometar. Amperometarski biosenzor glukoze koristi se

za uobičajeno određivanje glukoze u krvi. U ovom slučaju koristi se enzimaska elektroda s glukoza oksidazom (Behetić i Nigović, 2007).

1.2.1. VOLTAMETRIJA

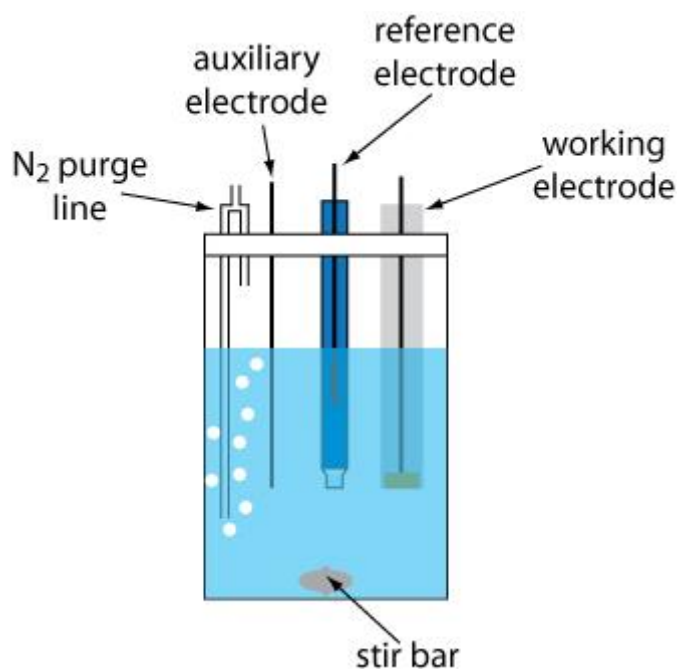
Voltometrija obuhvaća skupinu elektroanalitičkih metoda kod kojih se podaci o analitu dobivaju iz mjerenja jakosti struje u ovisnosti o priključenom naponu pri uvjetima koji izazivaju polarizaciju indikatorske ili radne elektrode (Skoog, West i Hooler, 1999). Voltometrija se temelji na mjerenju struje radne elektrode koja nastaje kontinuiranim mijenjanjem potencijala (Behetić i Nigović, 2007). Ova metoda se razvila iz *polarografije*, koja je primjer voltometrije s kapajućom živinom elektrodom. Upotrebljavaju ju kemičari raznih specijalnosti za proučavanje oksidacije i redukcije, te proces adsorpcije (Skoog, West i Hooler, 1999), a ima primjenu u *screening testovima* i određivanju lijekova u dozirnim oblicima i biološkim tekućinama. Voltamogram je prikaz ovisnosti struje o potencijalu.

Najčešće se primjenjuju voltometrijske metode:

- ciklička
- diferencijalna pulsna
- pravokutnovalna
- stripping voltometrija (metoda otapanja pretkoncentriranog analita)

Osnovne jedinice instrumenta su: računalo, potenciostat i elektrokemijski članak. Potenciostat nametne potencijal i mjeri jakost struje, a elektrokemijski članak služi kao nosač otopine analita u kojoj su uronjene elektrode. U voltometrijskim mjerenjima upotrebljavaju se tri elektrode: radna elektroda, pomoćna ili protuelektroda i referentna elektroda (slika 2.). Između radne i referentne elektrode se mjeri potencijal – signal pobude, a između radne i pomoćne elektrode se mjeri struja – signal odaziva. Elektrode trebaju biti konstantne površine da bi mjerenja bila reproducibilna (Behetić i Nigović, 2007).

Potencijal radne elektrode se održava na određenoj poznatoj vrijednosti ili se mijenja linearno s vremenom. Potencijal referentne elektrode tijekom pokusa ostaje stalan, a pomoćna elektroda omogućuje tok struje od izvora kroz otopinu do mikroelektrode – radne elektrode. Izvor signala je promijenjivi izvor istosmjerne struje.

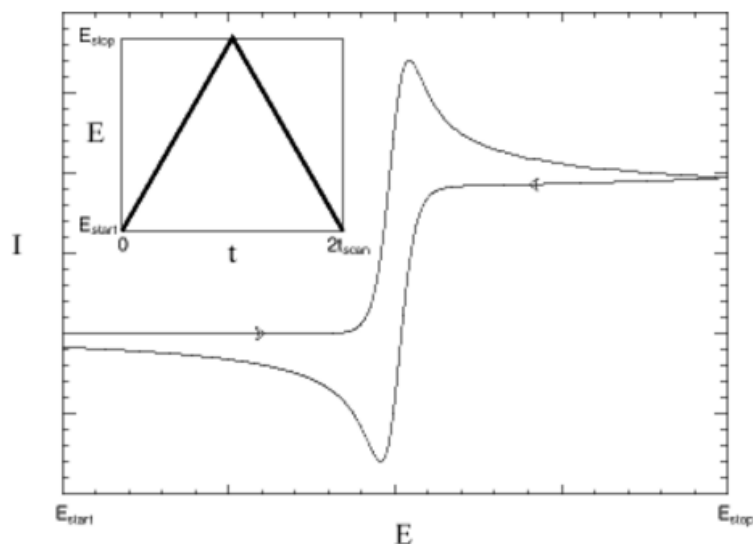


Slika 2. Tri elektrode u elektrokemijskoj ćeliji (preuzeto s: <http://community.asdlib.org/>)

1.2.1.1. CIKLIČKA VOLTAMETRIJA

Ciklička voltametrija se primjenjuje za istraživanje kinetike i mehanizma redoks reakcije, određivanje redoks potencijala, određivanje broja izmijenjenih elektrona, primjenjuje se i u istraživanju adsorpcijskih procesa i kemijskih reakcija koje prethode ili slijede prijenos elektrona (Wang, 2000). Unatoč širokoj primjeni, ova metoda se ne koristi za kvantativne analize lijekova jer je granica detekcije u optimalnim uvjetima 10^{-5} - 10^{-6} M.

U cikličkoj voltametriji potencijal radne elektrode se mijenja linearno dok ne dosegne određenu vrijednost, nakon čega mijenja smjer promjene potencijala i dobije se ciklički voltamogram (slika 3.). Jakost struje raste kako se približava redoks potencijalu analita, a kad se potencijal promijeni preko karakterističnog redoks potencijala nastaje strujni vrh. Potencijal se potom vraća na početnu vrijednost te dolazi do oksidacije/redukcije produkta koji su nastali u prvoj polovici ciklusa. Oblik ovog voltamograma ovisi o brzinama prijenosa elektrona, prijenosu tvari i kemijskim reakcijama koje prate redoks reakcije (Behetić i Nigović, 2007).



Slika 3. Ciklički voltamogram i potencijalni oblik vala (preuzeto s:

<http://compton.chem.ox.ac.uk/>)

Za cikličku voltametriju najvažniji parametri su potencijali vrha redukcije (E_{pc}) i oksidacije (E_{pa}) te vršne jakosti struje (i_{pc} i i_{pa}). Potencijal vrha je karakterističan za svaki spoj, a ovisi o njegovoj sposobnosti da primi ili otpusti elektrone.

Broj izmijenjenih elektrona (n) može se odrediti iz razlike potencijala vrhova (ΔE_p) prema jednadžbi:

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

Pri čemu je R opća plinska konstanta i iznosi $R = 8.314\ 472\ \text{J K}^{-1}\ \text{mol}^{-1}$. T je apsolutna temperatura, a F je Faradayeva konstanta i iznosi $F = 9.648\ 533\ 99 \times 10^4\ \text{C mol}^{-1}$.

Ako je proces prijenosa elektrona brži od ostalih procesa u otopinu poput difuzije, ta reakcija je reverzibilna. U tom slučaju moguće je preko Randles-Ševčikove jednadžbe povezati koncentraciju i vršnu koncentraciju.

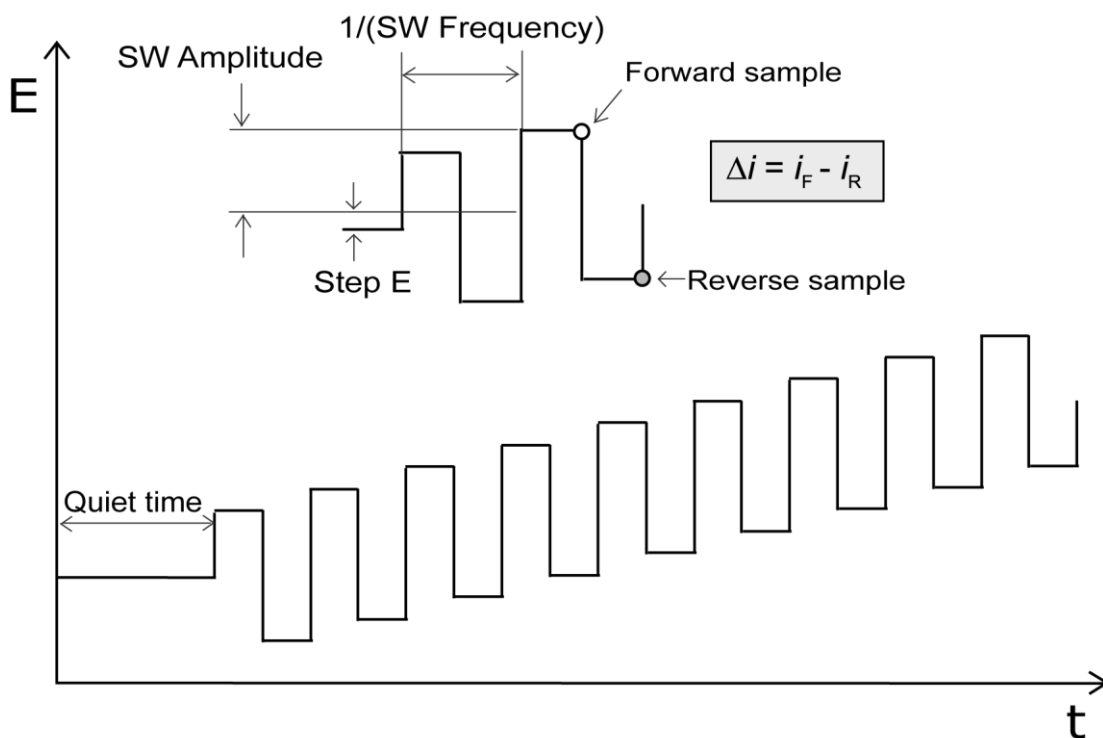
$$i_p = 2.69 \times 10^5 \times n^{\frac{3}{2}} \times A \times D^{\frac{1}{2}} \times C_0 \times v^{\frac{1}{2}}$$

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

1.2.1.2. PRAVOKUTNO VALNA VOLTAMETRIJA

Pravokutno valna voltometrija se temeljni na ekstremno brzim promjenama potencijal, a to joj omogućavaju frekvencije od 1 do 100 ciklusa u sekundi. Brzina je ujedno i najveća prednost ove metode. Signal pobude dobije se kad se niz pravokutnovalnih pulseva doda na stepeničast signalni potencijala (Wang, 2000). Struja se mjerni jednom na početku polaznog pulsa te još jednom na kraju pulsa suprotnog smjera (slika 4.). Polazni puls proizvodi katodnu struju, a povratni puls anodnu. Razlika tih struja proporcionalna je koncentraciji analita u otopini, a potencijal maksimuma može se upotrijebiti za potvrdu identiteta analita (Behetić i Nigović, 2007).

Za ralik od cikličke voltametrije i linearne, širi je dinamički raspon i niži limit detekcije zbog efektivnog razlikovanja kapaciteta struje. Mogu se analitički odrediti koncentracije od svega 10 nM. Još jedna velika prednost je to što su razlike struje veće od bilo polazne ili povratne struje te je visinu pika najčešće lako očitati (Dogan-Topal i sur., 2010).



Slika 4. Naponski signal pobude u pravokutnovalnoj voltametriji (preuzeto s: https://commons.wikimedia.org/wiki/Main_Page)

1.2.2. ELEKTRODE

Elektroda je elektronski vodič u kontaktu s ionskim vodičem, a izrađuje se od metala kao što su platina, zlato, srebno, iridij, bizmut, olovo i živa ili od grafita, staklastog ugljika i čađe. (Komorsky-Lovrić i Lovrić, 2007)

Elektroanalitičke metode i elektrokemijski senzori su jako atraktivni zbog visoke detektabilnosti, jednostavnosti i niske cijene. Krute elektrode se koriste kao radne elektrode u voltametrijskom mjerenju, a pojavile su se prije šesdesetak godina. Svojstva voltametrijske tehnike uvelike ovise o materijalu radne elektrode, kemijskim i fizičkim svojstvima površine elektrode, primijenjenom potencijalu i adsorpciji i primijenjenom filmu na površini elektrode, što povećava sposobnost površine elektrode da detektire određenu tvar. Krute elektrode se najbrže razvijaju od svih elektroda i može se zaključiti da predstavljaju široko korišten i praktičan materijal za izradu elektrode. Problem kod krutih elektroda je kako kontrolirati reproducibilnost, no s druge strane mehanički su stabilnije od živine elektrode i imaju širi anionski raspon, a i jednostavnije su za korištenje. S vremenom su analitički kemičari naučili kako poboljšati reproducibilnost te su razvijene različite površine i dodaci kojima su poboljšanje i selektivnosti i osjetljivost.

Najčešće korišteni materijali za izradu krutih elektroda su ugljik, platina, rutenij i zlato, a mogu biti korišten i srebro, nikal, bizmut i bakar za neke specifične eksperimente. Krute elektrode mogu biti različitih dimenzija i oblika, npr. tubularne, prstenaste, planarne, makro- ili mikroelektrode (Uslu i Ozkan, 2007).

Kompozitne krute elektrode (eng. *Composite solid electrode*) se sastoje od najmanje jednog vodiča i jedne izolacijske faze koje se miješaju zadržavajući svoje konačno kruto stanje. Ove elektrode su intenzivno razvijene i korištene zadnjih dvadeset godina. Prednost CSE su niske cijene, mala težina, visok omjer signala i šuma, širok potencijalni raspon, čišćenje, kompatibilnosti s konceptom „zelene analitičke kemije“ te mogućnost njihove modifikacije (Navratil i Barek, 2011).

Pri izboru krute elektrode treba uzeti u obzir redoks ponašanje ispitivane tvari, pozadinsku struju, raspon potencijala, reproducibilnost površine, mehanička svojstva, cijenu, dostupnost, električnu provodljivost i toksičnost materijala.

Krute elektrode mogu biti elektrode od plemenitih metala ili ugljikove elektrode (Uslu i Ozkan, 2007)

1.2.2.1. Ugljikove elektrode

Ugljikove elektrode (eng. *carbon-based electrodes*) imaju širi raspon potencijala u kojem se mogu koristiti za razliku od ostalih krutih elektroda. Osim što imaju širok raspon potencijala, imaju i nisku pozadinsku struju, kemijski bogatu površinu, kemijsku inertnost, nisku cijenu i prikladne su za različite modifikacije. S druge strane, prijenos elektrona je brži na elektrodi od plemenitih metala nego na ugljikovoj elektrodi (Uslu i Ozkan, 2007).

Podjela ugljikovih elektroda:

1. Homogene

- Elektroda od staklastog ugljika
- Grafitne mikroelektrode
- Fulereni
- Ugljikove nanočestice
- Dijamantne elektrode

2. Heterogene

- Elektrode od ugljikove paste
- Modificirane elektrode od ugljikove paste

Ugljikove elektrode dijele istu osnovnu strukturu šesteročlanog aromatskog prstena i sp^2 hibridizaciju, ali se međusobno razlikuju u relativnoj gustoći površine. Visok stupanj delokalizacije π elektrona zajedno sa slabim Van der Waalsovima vezama osigurava dobru električnu provodljivost.

Visoka učinkovitost površine elektrode ovisi o vrsti ugljika koja se koristi i pripremi elektrode (Uslu i Ozkan, 2007).

1.2.2.2. Elektroda od staklastog ugljika

Elektrode od staklastog ugljika (eng. *glassy carbon electrode*, GCEs) ujedinjuju neke značajke stakla sa značajkama industrijskog ugljika. GCEs su jako popularne zbog izvrsnih električkih i mehaničkih svojstava, širokog raspona potencijala, inertnosti materijala i relativno dobrih reproducibilnih svojstava. Priprema se oprezno kontroliranim zagrijavanjem

predmodeliranog polimernog smolastog tijela u inertnoj atmosferi. Visoko je otporna u kiselim uvjetima. Posjeduje izotropna svojstva i ne zahtjeva posebnu orijentaciju u uređaju. Uspješno se polira s malim česticama aluminijevog oksida ($\sim 0.05 \mu\text{m}$) na tankoj tkanini za poliranje. O čišćenju elektrode ovisi njen učinak. Staklasti ugljik ima nisku gustoću, malu termalnu ekspanziju, visoku otpornost prema koroziji te dobru termalnu i električnu provodljivost (Uslu i Ozkan, 2007).

1.2.2.3. Ugljikovi nanomaterijali

Različiti nanomaterijali veličina od 1 do 100 nm u jednoj ili više dimenzija su privukli pozornosti znanosti i tehnologije u posljednje vrijeme. Različiti alotropske modifikacije ugljika koje su otkriveni u zadnjih tridesetak godina, poput nanodijamanta, fullerena, ugljikovih nanovlakana, ugljikovih nanocjevčica i grafena te njegovi derivati, zajedničkim imenom se zovu ugljikovi nanomaterijali (CNs). Zbog svoji izvrsnih svojstava, kemijske stabilnosti, velike površine, širokog raspona potencijala, biokompatibilnosti, pojačanih elektronskih karakteristika i elektrokatalitičke aktivnosti, našli su svoje mjesto među elektrokemijskim sensorima.

Ugljikove nanocjevčice (CNTs) su otkrivene 1991., a odtad su doživile ubrzan razvoj. Mogu se podijeliti na dva tipa, jednozidne CNTs (single-walled CNTs) koje se sastoje od jedne cjevčice grafita i višezidne CNTs (multi-walled CNTs) koje se sastoje od više kružnih cjevčica grafita smještenih jedne u drugu. Senzori s CNTs općenito imaju veću osjetljivost, nižu granicu detekcije i bržu kinetiku prijenosa elektrona (Yang i sur., 2013.). Najjednostavniji način za izradu ovakih elektroda je priprema suspenzije CNTs, nanošenje malog volumena suspenzije na elektrodu te otparavanje otapala i zaostajanje sloja CNTs na površini elektrode (Yanez-Sedeno, Riu, Pingarron i Rius, 2010).

Grafen su pokazao kao zanimljiv materijal s širokim područjem primjene u elektronici, pohrani energije i biotehnologiji zbog odličnih fizikalno-kemijskih svojstava uključujući veliku površinu, termalnu i električnu provodljivost i mehaničnu izdržljivost. Grafen je 2D ploča ugljikovih atoma u heksagonalnoj konfiguraciji s atomima povezanim sp^2 vezama. To je najtanji i najjači izmjeren materijal u svemiru. Prednost grafena u odnosu na CNTs je niža cijena i veća čistoća materijala (Yang i sur., 2013). Svojstva grafena kao što su velika površina, povećanje mobilnosti nositelja naboja i visoka stabilnost čine ga pogodnom

platformom za vezivanje metalnih nanočestica u svrhu modificiranja elektrode (Adhikari i sur., 2015).

1.2.2.4. Modifikacije elektroda s bizmutovim nanočesticama

Fine nanomaterijale je moguće koristiti kao modifikatore elektroda da bi povećali učinkovitost elektrode. Da bi se elektroda mogla tako modificirati potrebno je postići uniformnost veličine, oblika i gustoće nanomaterijala (Oyama, 2010).

Bizmutove elektrode su superiorne nad živinim u području negativnog potencijala. Toksičnost bizmuta je manja u odnosu na živu, a prednost je i to što je bizmut pri sobnoj temperaturi u čvrstom stanju pa omogućuje veću fleksibilnost u izradi senzora. Elektrode s bizmutom su dizajnirane 2000. godine i odmah su primijenjene u elektroanalitičke svrhe za određivanje metalnih iona u otopinama.

Bizmut film elektrode (BiFEs) predstavljaju tip bizmutove elektrode koja se koristi u organskoj elektroanalitici. Radi se o *ex situ* ili *in situ* nanosenog tankog filma bizmuta na površinu elektrode koja može biti od bakra, staklastog ugljika, krutog srebrnog amalgama, ugljike paste (Lezi i sur., 2012).

Da bi se omogućila šira primjena bizmutovih elektroda, predstavljena je elektroda kod koje su bizmutove nanočestice integrirane na površinu elektrode, za razliku od bizmutovog filma koji zahtjeva predpripremu. Takav tip elektrode s bizmutom priprema se s nanosuspencijom bizmutovih nanočestica u etanolnoj otopini Nafiona. Nafion ionomeri su bili razvijeni od strane E. I. DuPoint kompanije, a čine ih kopolimeri perfluoriranih vinila s tetrafluoretilenom (Mauritz i Moore, 2004) U ovom slučaju Nafion se koristi zbog njegove sposobnosti da tvori film u kojem će nanočestice bizmuta biti jednolično dispergirane te dobre adhezivnosti koja time povećava stabilnost elektrode. Površina modificirane elektrode bizmutovim nanočesticama pokazuje izvrsnu sinergiju i značajno povećava voltametrijski odgovor analiziranih tvari (Nigović i sur., 2017).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Sulfasalazin je protuupalni lijek koji se koristi za liječenje kroničnih stanja poput reumatoidnog artiritisa, ulceroznog kolitisa i Chronove bolesti. Budući da se radi o terapiji koju će pacijenti uzimati dugoročno važno je znati da je postignuta koncentracija lijeka u biološkim tekućinama dovoljno visoka da djeluje protuupalno, ali da je i optimalna kako bi nuspojave lijeka bile manje. Sulfasalazin može uzrokovati jetrene i hematološke nuspojave. Oprez je potreban kod pacijenata s oštećenom bubrežnom i jetrenom funkcijom, bronhalnom astmom, alergijskom dijatezom te manjkom enzima glukoza-6-fosfat dehidrogenaze. Potreban je oprez u osoba koje sporo razgrađuju sulfapiridin jer se nuspojave pojavljuju kad je dnevna doza lijeka veća od 4 grama (Francetić Igor i sur., 2015). Praćenjem koncentracije sulfasalazina u biološkim tekućinama prikladnim analitičkim metodama osigurava se pacijentu da je doza koju uzima djelotvorna i da djeluje lokalno na upalu što omogućuje sigurniju primjenu lijeka.

Prednost elektroanalitičkih metoda nad nekim drugim metoda je njihova brzina, što omogućuje da se rezultati dobiju kroz kratko vrijeme te da se više uzoraka može analizirati u kraćem vremenu. U literaturi je opisan mehanizam ireverzibilne redukcije sulfasalazina na elektrodi od staklastog ugljika (Mandić i sur., 2004). Zatim, razvijena je elektroanalitička metoda za određivanje sulfasalazina na bizmutovoj film elektrodi u koncentracijskom rasponu od 5×10^{-6} do 3.5×10^{-4} M sulfasalazina (Nigović i sur., 2009).

Cilj ovog rada bio je ispitivanje selektivnosti metode za određivanje sulfasalazina na modificiranoj elektrodi od staklastog ugljika kombinacijom nanomaterijala, ugljikovim nanocjevčicama i bizmutovim nanočesticama, kako bi se razvila nova elektroanalitička metoda za određivanje nižih koncentracija sulfasalazina i time omogućilo određivanje koncentracije lijeka u biološkim tekućinama.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. KEMIKALIJE

Rabljene su sljedeće kemikalije:

- Sulfasalazin (Agencija za lijekove i medicinske proizvode)
- Sulfasalazin 500 mg tbl (Krka d.d.)
- Mesalazin (Pliva d.o.o.)
- Fosfatna kiselina 85% (Lach - Ner)
- Octena kiselina (Panreac Quimica)
- Borna kiselina (Sigma – Aldrich)
- Natrijev hidroksid (Sigma – Aldrich)
- Bizmut nanočestice, 80 nm (US Research Nanomaterials, Inc.)
- Ugljikove nanocjevčice (Sigma - Aldrich)
- Nafion (Sigma – Aldrich)
- $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (Sigma - Aldrich)
- Sulfadiazin, minimum 99% (Sigma – Aldrich)
- Askorbinska kiselina (Sigma – Aldrich)
- Dopamin hidroklorid (Sigma – Aldrich)
- Glukoza, bezvodne (Kemika)
- Folna kiselina, 97% (Sigma – Aldrich)
- Olsalazin (Sigma - Aldrich)
- KNO_3 (Kemika)
- $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (Laphoma, Skopje)
- Na_2CO_3 , bezvodni (Lach – Ner)
- KH_2PO_4 , bezvodni (Kemika)
- Limunska kiselina monohidrat (T.T.T.)
- Laktoza monohidrat (Fluka)
- NaCl (Merck)
- $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (Kemika)
- $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (Kemika)
- $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma – Aldrich)
- Ultra čista voda

3.2. RADNI INSTRUMENTI

Za provođenje voltametrijskih mjerenja, odnosno cikličke voltamerije i pravokutnovalne voltamerije, korišten je potenciostat μ -Autolab (Eco Chemie) kontroliran programom GPES 4.9. Radna elektroda koje je korištena je elektroda od staklastog ugljika (2 mm promjera, Metrohm). Površina elektrode od staklastog ugljika modificirana je bizmutovim nanočesticama, ugljikovim nanočesticama, nanosuspenzijom bizmutovih nanočestica i ugljikovih nanocjevčica te grafenom u otopini Nafiona. Korištena referentna elektroda je Ag/AgCl/KCl (zasićeni), a kao pomoćna je korištena platinska elektroda.

Za potrebe određivanja pH vrijednosti ispitivanih i puferskih otopina upotrebljavao se digitalni pHmetar Mettler Toledo s kombiniranom staklenom elektrodom (Mettler). Kalibriranje je napravljeno sa standardnim otopinama pufera poznatih pH vrijednosti: $\text{pH}_1=7,00\pm 0,01$ i $\text{pH}_2=4,00\pm 0,01$.

Čišćenje elektrode i poboljšavanje topljivosti otopina je urađeno pomoću ultrazvučne kupelji Emlasonic S30H, Elma.

Sve vaganja supstancija su napravljena na analitičkoj vagi Mettler Toledo AG245.

3.3. UVJETI MJERENJA

Ciklički voltamogrami sulfasalazina su snimljeni na elektrodi od staklastog ugljikova, elektrodi modificiranoj s grafenom, elektrodi modificiranoj s bizmutovim nanočesticama, elektrodi s ugljikovim nanocjevčicama i na elektrodi modificiranoj suspenzijom ugljikovih nanočestica i bizmutovim nanočesticama. Kao osnovni elektrolit korišten je Britton-Robinson pufer u rasponu pH od 3 do 5. Ciklički voltamogrami snimljeni su u rasponu potencijala od 0 do -0.8 V pri brzini promjene potencijala od 100 mV/s. Mjerenja su izvršena pri sobnoj temperaturi (22 ± 2). Korišten je elektrokemijski članak od 20 mL.

Za pravokutnovalnu voltametriju je provedena optimizacija parametra. Praćena je promjena visine pika u Britton-Robinsonovom puferu pri pH 3, pri promjeni frekvencije i pri amplitudi pulsa 50 mV. Snimljeni su pravokutnovalni voltamogrami pri 25 Hz, 50 Hz i 75 Hz te je zaključeno da je pik bolji pri 50 Hz. Zatim, praćen je izgled pika pri promjeni amplitude

pulsa te su snimljeni pravokutnovalni voltamogrami pri amplitudi pulsa 25 mV, 50 mV i 75 mV, dok je frekvencija bila 50 Hz te je zaključeno da je optimalna vrijednost amplitude pulsa 50 mV. Ispitan je optimalan porast potencijala snimanjem pravokutnovalnog voltamograma pri porastu potencijala u rasponu od 2 do 4 mV. Odabrana je optimalna vrijednost porasta potencijala od 2 mV.

Iz optimizacije zaključeno je da su optimalni parametri pri amplitudi pulsa 50 mV, frekvenciji 50 Hz i 2 mV porasti potencijala za pravokutnovalne voltamograme u Britton-Robinsonovom pufer pH 3. Pri tim uvjetima snimljeni su pravokutnovalni voltamogrami smjese sulfasalazina i mogućih interferencija, s time da je korištena koncentracija sulfasalazina 5×10^{-6} M te različite koncentracije interferencija.

3.4. PRIPREMA ELEKTRODE

Elektroda se između modifikacije površina treba polirati na filter papiru, isprati destiliranom vodom i posušiti. Nakon toga se mikropipetom nanese 7 μ L odgovarajuće suspenzija nanomaterijala te ostavi da otapalo ispari. Modificirana elektroda se nakon toga uroni u otopinu osnovnog elektrolita i naprave dva skena cikličkom voltametrijom kako bi se dobila stabilna struja. Između mjerenja površina elektrode očisti se elektrokemijski u čistom Britton-Robinsonovom pufer pH 3 promjenom potencijala od -0.15 do 0.7 V.

3.5. PRIPREMA OTOPINA

3.5.1. Otopine sulfasalazina

- Matične otopine

Matična otopine sulfasalazina koncentracija 1×10^{-3} M je pripremljena u tikvici od 20,0 mL. Na analitičkoj vagi odvagane se 0.0084 g sulfasalazina, kvantitativno se prenese u tikvicu te otopi u kapi NaOH koncentracije 2 M i ultračistoj vodi te nadopuni ultračistom vodom do oznake. NaOH se dodaje rade loše topljivosti sulfasalazina u vodenom i kiselom mediju.

Matična otopina sulfasalazina koncentracije 1×10^{-4} M se pripremila iz matične otopine koncentracija 1×10^{-3} M. 2,0 mL matične otopine sulfasalazina koncentracije 1×10^{-3} su se kvantitativno prenijela u tikvicu od 20,0 mL te nadopunila do oznake ultračistom vodom.

Matična otopina sulfasalazina koncentracije 1×10^{-5} M se pripremila iz matične otopine koncentracija 1×10^{-3} M. 2 μ L matične otopine sulfasalazina koncentracije 1×10^{-3} su se kvantitativno prenijela u tikvicu od 20,0 mL te nadopunila do oznake ultračistom vodom.

- Radne otopine

Radne otopine se pripremaju iz matične otopine, tako da se određeni volumen (Tablica 1.) prenese u tikvicu od 20,0 mL i nadopuni do oznake otopinom Britton-Robinson pufera odgovarajućeg pH.

Matična otopina	Radna otopina	Volumen matične otopine
1×10^{-3} M	5×10^{-5} M	1 mL
	1×10^{-5} M	200 μ L
	5×10^{-6} M	100 μ L
1×10^{-4} M	1×10^{-6} M	200 μ L
	5×10^{-7} M	100 μ L
	1×10^{-7} M	50 μ L
	5×10^{-8} M	10 μ L
1×10^{-5} M	1×10^{-8} M	50 μ L

Tablica 1. Izrada radnih otopina sulfasalazina

3.5.2. Otopina Britton-Robinson pufera

Britton-Robinson puferom može se postići široki raspon pH (od 1,8 do 11,98). Priprema se tako da se pipetira 20,0 mL octene kiseline, borne kiseline i fosfatne kiseline (CH_3COOH , H_3BO_3 i H_3PO_4). Sve tri kiseline su jednake koncentracije od 0,5 M. Do oznake se napuni ultračistom vodom u tikvicu od 250,0 mL. Različite vrijednosti pH se postižu dodavanjem odgovarajućeg volumena 0,2 M otopine NaOH uz pomoć pH-metra.

3.5.3. Otopine za ispitivanje interferencija

Za ispitivanje interferencija potrebno je pripremiti otopine organskih i anorganskih supstancija različitih koncentracija. Sve interferenciju su pripremane u tikvicama od 20,0 mL, osim sulfadiazina koji je pripremljen u tikvici od 10,0 mL, a dopamin i olsalazin su pripremljeni u tikvicama od 5,0 mL. Na analitičkoj vagi su prethodno odvagane određena mase izabranih supstancija, kvantitativno prenesene u tikvice te nadopunjene odgovarajućim otapalom do oznake (Tablica 2.). Odgovarajući alikvot tako priređene otopine uzima se te dodaje u radnu otopinu sulfasalazina koja je koncentracije 5×10^{-6} M i volumena 20,0 mL.

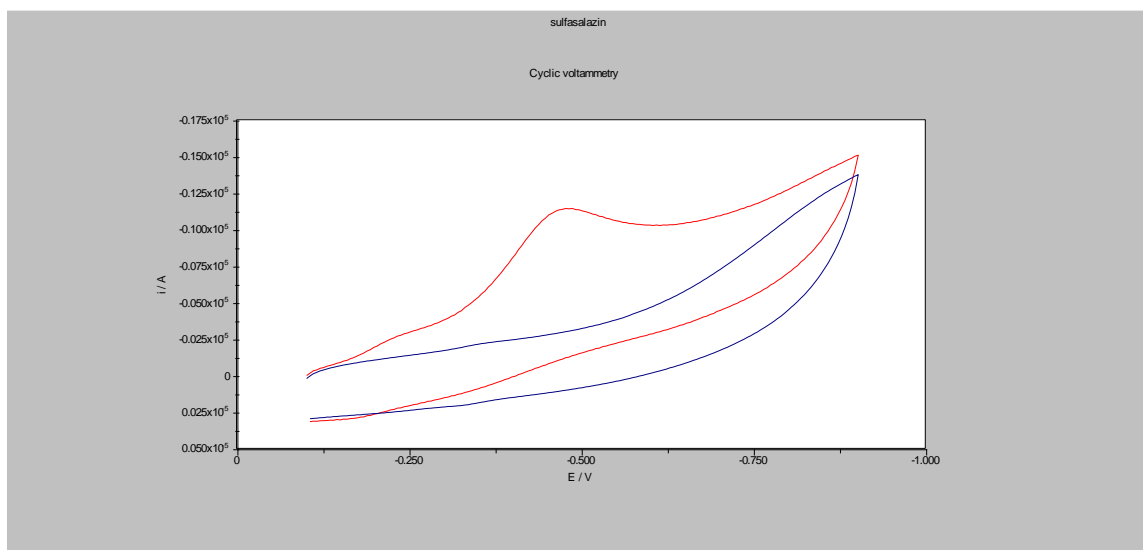
Supstancija	Odvaga / g	Otapalo	Alikvot / μ L	Odnos koncentracija supstancija : sulfasalazin
KNO ₃	0,5038	Voda	200	500:1
ZnSO ₄	0,8044	Voda	200	500:1
Na ₂ CO ₃	0,6288	Voda	200	250:1
KH ₂ PO ₄	0,6828	Voda	200	500:1
CuSO ₄ x 5H ₂ O	1,2484	Voda	100	250:1
MgSO ₄ x 7H ₂ O	1,2324	Voda	200	500:1
NaCl	0,2965	Voda	400	1000:1
FeCl ₃ x 6H ₂ O	0,1767	Voda	800	200:1
Laktoza	1,8371	Voda	120	500:1
Glukoza	0,9076	Voda	200	500:1
Limunska kiselina	1,0446	Voda	120	300:1
Askorbinska kiselina	0,0171	Voda	133	200:1
Dopamin	0,0009	Voda	100	5:1
Folna kiselina	0,0087	Voda	100	1:0.1
Sulfadiazin	0,017	Voda	100	1:1
Olsalazin	0,0014	Voda	100	1:1
Mesalazin	0,0015	Voda	100	1:1

Tablica 2. Priprema otopina za ispitivanje interferencija

4. REZULTATI I RASPRAVA

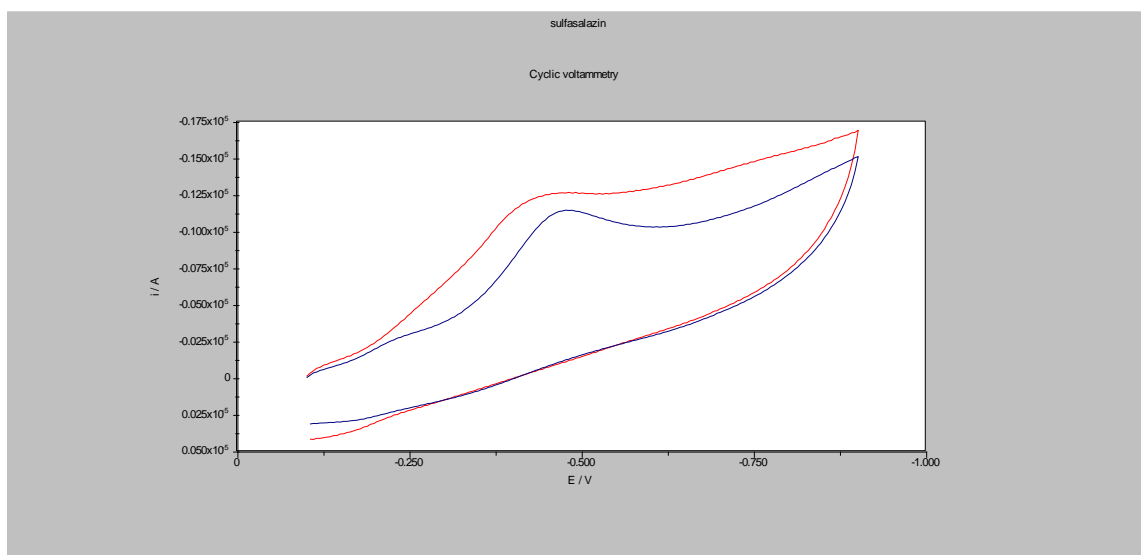
Na početku je bilo potrebno odabrati najpogodniju modifikaciju elektrode od staklastog ugljika za određivanje koncentracije sulfasalazina u otopini pufera. Zbog problema topljivosti sulfasalazina u kiselom i vodi, trebalo je prilagoditi pH pufera topljivosti sulfasalazina te je iz pokusa primjećeno da pH mora biti 3 ili veći da bi topljivost bila dostatna. Korišten je Britton-Robinson pufer (BR) jer ima širok raspon pH koji se može pripremiti, od 1,8 do 11,98, ovisno o dodatku NaOH.

Prva mjerenja cikličkom voltametrijom su rađena na elektrodi od staklastog ugljika. Prvo se uvijek mjeri osnovni elektrolit, što je u ovom slučaju Britton- Robinsonov pufer pri pH 3.5, a prvo mjerenje se ponavlja. Nakon što se izmjeri osnovni elektrolit, mjeri se uzorak te je primjećen strujni vrh redukcije sulfasalazina na -0,450 V pri koncentraciji sulfasalazina 5×10^{-5} M (slika 5.). Tijekom mjerenja dolazi do redukcije azo-veze sulfasalazina i prijenosa dva elektrona što se u ovom slučaju zamjećuje kao strujni vrh. Pri mjerenju samog BR pufera nije primjećen strujni vrh. Elektoredukcija je praćena cikličkom voltametrijom u rasponu od -0.15 V do -0.95 V. Nakon što su odabrani optimalni parametri koji su davali najbolji strujni vrh, napravljeni su eksperimenti cikličkom voltametrijom s modificiranim elektrodama od staklastog ugljika.



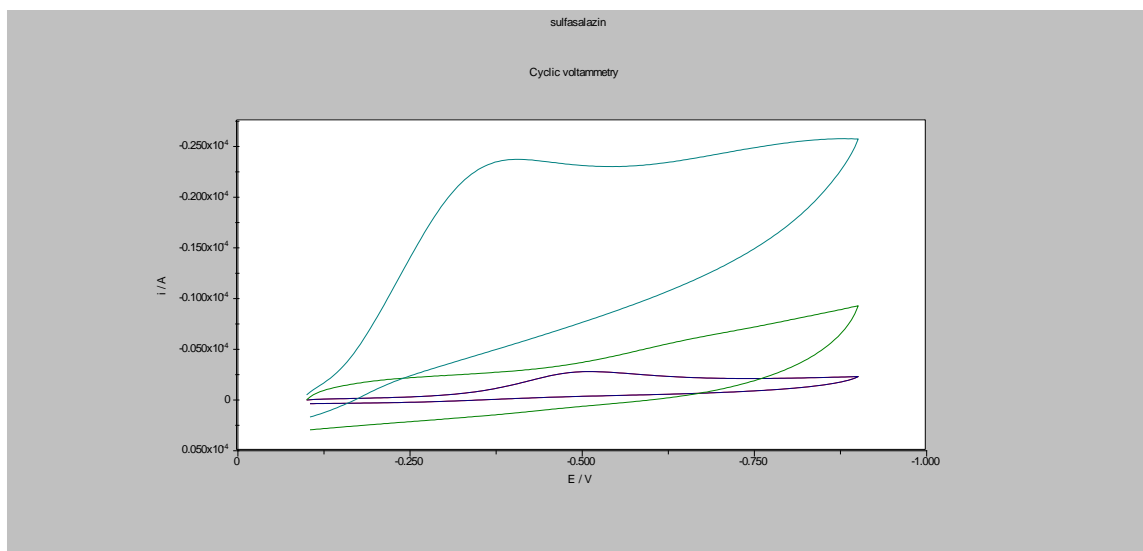
Slika 5. Ciklički voltamogram sulfasalazina koncentracije 5×10^{-5} M snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u BR puferu pH 3.5 (crveno) i sam pufer BR pH 3.5 na istoj elektrodi (plavo)

Prva modifikacija elektrode načinjena je dodatkom grafena u 0.3 % Nafionu. Nafion se dodaje jer povećava viskoznost polimera te doprinosi manjem razlijevanju suspenzije nanomaterijala. Primjećeno je povećanje strujnog vrha cikličkog voltamograma već ovakvom modifikacijom, a strujni vrh je pomaknut na pozitivnije vrijednosti što se vidi na slici 6. Za ovo mjerenje korištena je otopina sulfasalazina koncentracije 5×10^{-5} M u BR puferu pH 3.5.

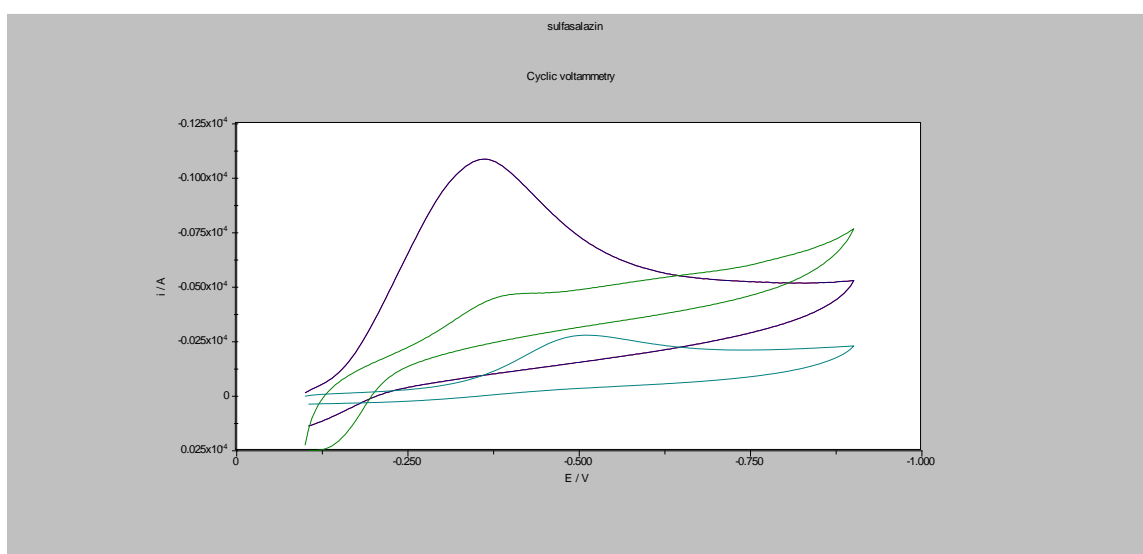


Slika 6. Ciklički voltamogram sulfasalazina koncentracije 5×10^{-5} M snimljen na elektrodi od staklastog ugljika modificiranoj grafenom u 0.3 % nafionu u BR puferu pH 3.5 (crveno) i snimljen na elektrodi od staklastog ugljika (plavo)

Slijedeća modifikacija elektrode bila je dodatak ugljikovih nanocjevčica u 0.3 % Nafionu. Rezultat je bio očekivan te je na slici 7. prikazano koliko je strujni vrh i samim time osjetljivost ovakve metode veće nego od osjetljivost same elektrode od staklastog ugljika. Ugljikove nanocjevčice u obliku suspenzije povećavaju površinu elektrode i na taj način povećavaju i osjetljivost. Za mjerenje cikličke voltametrije korištena je otopina sulfasalazina koncentracije 1×10^{-4} M u BR puferu pH 3, te sam BR pufer pH 3.



Slika 7. Ciklički voltamogram sulfasalazina koncentracije 1×10^{-4} M u BR puferu pH 3 snimljen na elektrodi od staklastog ugljika (plavo), na elektrodi modificiranoj s ugljikovim nanocjevčicama u 0.3 % Nafionu (cijan) i sam pufer BR pH 3 na elektrodi s ugljikovim nanocjevčicama u 0.3 % Nafionu (zeleno)

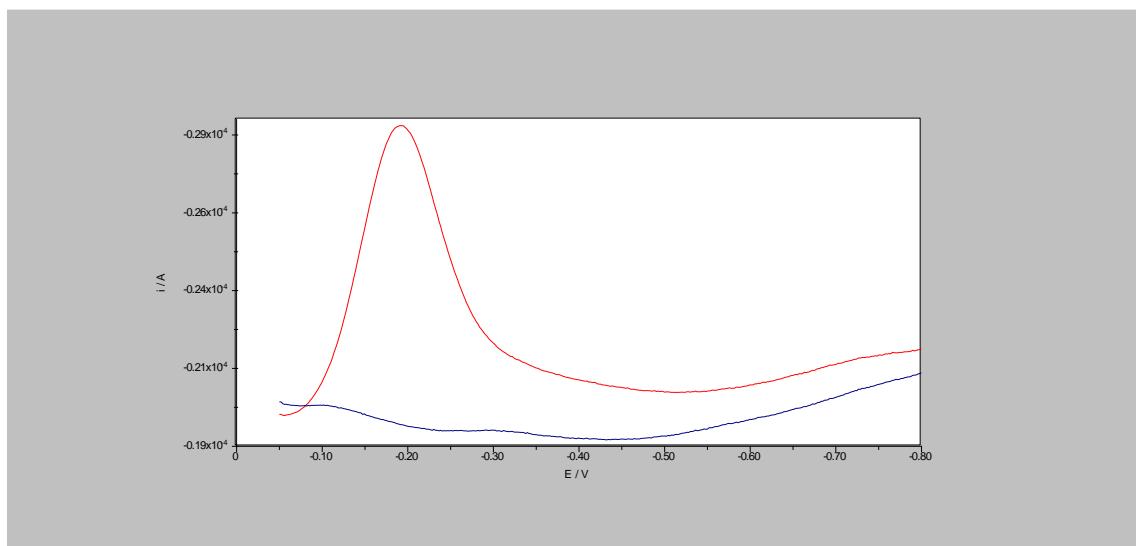


Slika 8. Ciklički voltamogram sulfasalazina koncentracije $c=1 \times 10^{-4}$ M u BR puferu pH 3 snimljeno na elektrodi od staklastog ugljik (cijan), na elektrodi modificiranoj s bizmutovim nanočesticama u 0.3 % Nafionu (plavo) i sam pufer BR pH 3 na istoj elektrodi (zeleno)

Slika 8. prikazuje ciklički voltamogram sulfasalazina snimljen na elektrodi od staklastog ugljika modificiranoj bizmutovim nanočesticama u 0.3% Nafionu te se može vidjeti usporedba strujnih vrhova lijeka dobivenih na modificiranoj i nemedificiranoj

elektrodi. Strujni vrh nastao redukcijom sulfasalazina na elektrodi s bizmutovim nanočesticama je znatno viši i nalazi se na pozitivnijem potencijalu što ukazuje na elektrokatalitička svojstva metalnih nanočestica. Za ovo mjerenje korištena je otopina sulfasalazina koncentracije 1×10^{-4} M u BR puferu pH 3, a prikazan je i ciklički voltamogram samog BR pufera pH 3.

Najboljom se pokazala modifikacije elektrode od staklastog ugljika s nanosuspencijom bizmutovih nanočestica i ugljikovih nanocjevčica u 0.3 % Nafionu. Na slici 9. prikazan je pravokutnovalni voltamogram otopine sulfasalazina koncentracije 1×10^{-5} M u pufer BR pH 3 te je strujni vrh redukcije sulfasalazina vidljiv na potencijalu od -0.20 V u usporedbi s voltamogramom samog BR pufer pH 3. Sva daljna mjerenja su rađena na ovoj površini elektrode koja se pokazala najosjetljivijom.



Slika 9. Pravokutnovalni voltamogram sulfasalazina koncentracije 1×10^{-5} M u pufer BR pH 3 snimljen na elektrodi od ugljikovih nanocjevčica s bizmutom u 0.3 % Nafionu (crveno), sam pufer BR pH 3 na istoj elektrodi (plavo)

Prije nego što je ispitivana interferencija određenih supstancija, trebalo je optimizirati uvjete mjerenja pravokutno valne voltametrije da osjetljivost metode bude što veća. Odabrani su optimalni instrumentalni parametri koji su davali najbolji strujni vrh, frekvencija 50 Hz, amplitudi pulsa 50 mV i porast potencijala od 2 mV. Zatim, napravljena su mjerenja s različitim volumenima nanosuspencije kojom je modificirana elektroda te je mjerena veličina strujnog vrha sulfasalazina. Mjerenja su napravljena s volumenima 3 μ L, 5 μ L i 7 μ L nanosuspencija ugljikovih nanocjevčica i bizmutovin nanočestica u omjeru 1:1 koncentracije

1 mg/mL, a povećanje volumena je pratilo i povećanje jakosti struje od 3.91 μA do 18 μA koje je postignuto s volumenom od 7 μL .

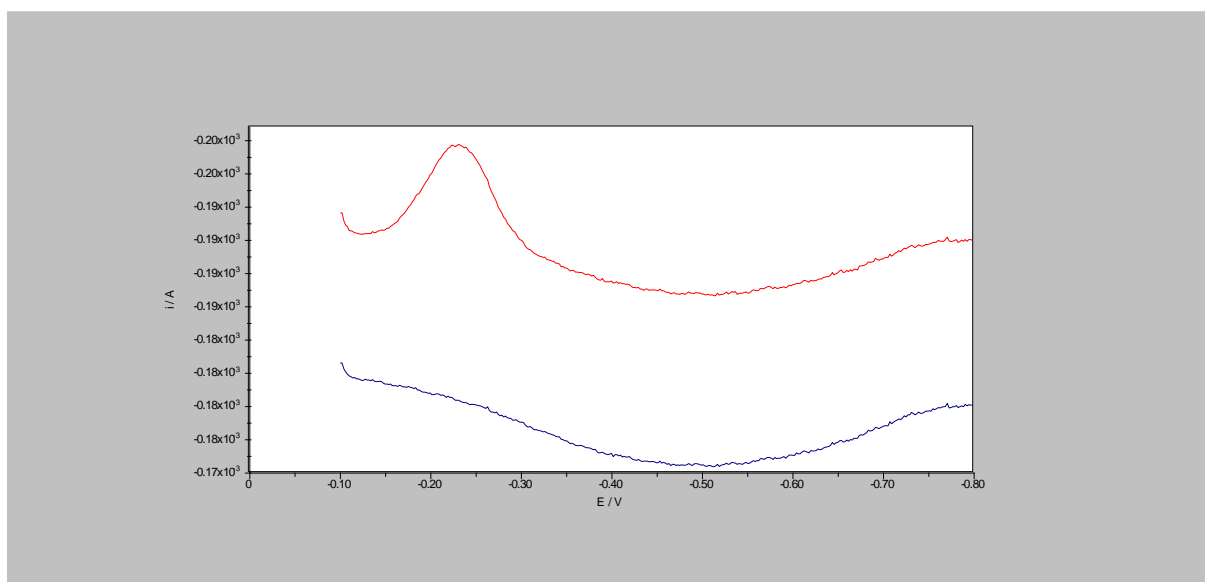
Da bi se dokazala primjenjivost ove elektroanalitičke metode bilo je potrebno ispitati selektivnost metode za određivanje sulfasalazina na elektrodi modificiranoj ugljikovim nanocjevčicama i bizmutovim nanočesticama. Selektivnost metode se ispitala promatranjem utjecaja interferencija drugih spojeva na struju redukcije sulfasalazina. Snimljeni su pravokutnovalni voltamogrami prvo same interferencija u otapalu, a potom su snimljeni pravokutnovalni voltamogrami smjese sulfasalazina i interferencije u određenom omjer. Kao moguće intereferencija su uzeti anorganski i organski spojevi te lijekovi, a prikazani su u tablici 3. gdje se vidi koncentracijski odnos ispitivane interferencije i sulfasalazina. Koncentracija sulfasalazina u ispitivanjima je bila 5×10^{-6} M u BR puferu pH 3.5. U mjerenjima se pratilo i hoće li se pojaviti novi strujni vrh uz strujni vrh sulfalazina. Iz podataka u tablici 3. vidljivo je da samo folna kiselina i olsalazin pri uvjetima ove elektroanalitičke metode pokazuju strujni vrh.

Interferencije	Odnos koncentracija interferencija i sulfasalazina	Koncentracija interferencije u otopini / M	Potencijal pri kojem se javlja novi pik / V
KNO_3	500:1	2.5×10^{-3}	-
ZnSO_4	500:1	2.5×10^{-3}	-
Na_2CO_3	250:1	1.25×10^{-3}	-
KH_2PO_4	500:1	2.5×10^{-3}	-
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	250:1	1.25×10^{-3}	-
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	500:1	2.5×10^{-3}	-
NaCl	1000:1	5×10^{-3}	-
$\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$	200:1	1×10^{-3}	-
Laktoza	500:1	2.5×10^{-3}	-
Glukoza	500:1	2.5×10^{-3}	-
Limunska kiselina	300:1	1.5×10^{-3}	-

Askorbinska kiselina	200:1	1×10^{-3}	-
Dopamin	5:1	2.5×10^{-5}	-
Folna kiselina	1:0.1	5×10^{-7}	-0.620
Sulfadiazin	1:1	5×10^{-6}	-
Olsalazin	1:1	5×10^{-6}	-0.125, -0.300
Mesalazin	1:1	5×10^{-6}	-

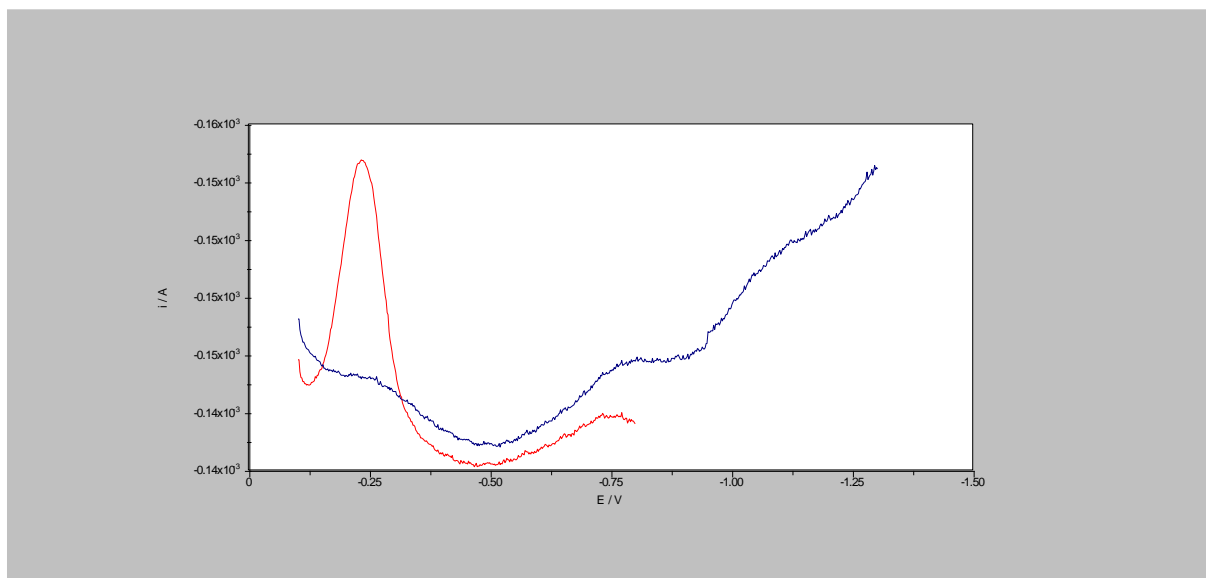
Tablica 3. Ispitivanje interferencija na reduksijski vrh sulfasalazina

Ispitivana je intereferencija lijeka mesalazina koji se koristi u istoj indikaciji kao i sulfalazin. Mesalazin je zapravo strukturno 5-aminosalicilna kiselina. Koncentracija mesalazina i sulfasalazina su u smjesi bili iste. Iz voltamograma na slici 10. vidi se da mesalazin ne interferira sa strujnim vrhom sulfasalazina, što se slaže s hipotezom jer u slučaju mesalazina nema redukcije azo-veze.



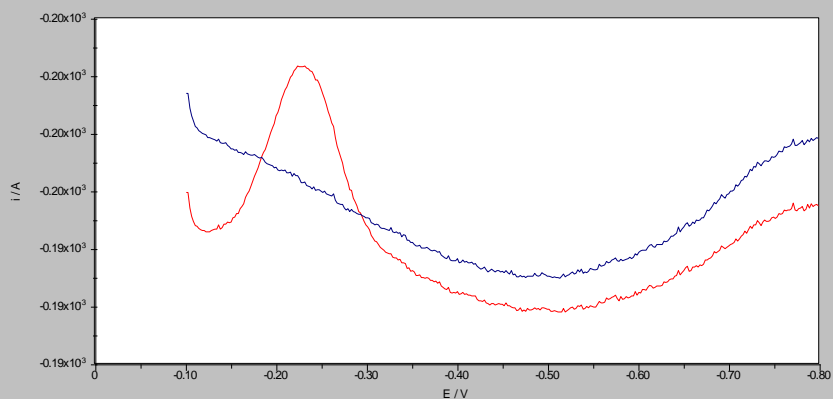
Slika 10. Pravokutnovalni voltamogram mesalazina koncentracije 1×10^{-4} M u pufer BR pH 3.5 snimljen na elektrodi od ugljikovih nanocjevčica s bizmutovim nanočesticama u 0.3 % Nafionu (plavo) i sulfasalazina koncentracije 5×10^{-6} M uz mesalazin u omjeru 1:1 (crveno)

Također je ispitivana i interferencija sulfasalazina sa sulfadiazinom. Sulfadiazin je sulfonamid koji je strukturno sličan sulfasalazinu. U smjesi je koncentracija oba lijeka bila 5×10^{-6} M. Iz pravokutnovalnog voltamograma na slici 11. vidljivo je da niti sulfadiazin ne interferira sa sulfasalazinom te je strujni vrh redukcije očuvan.

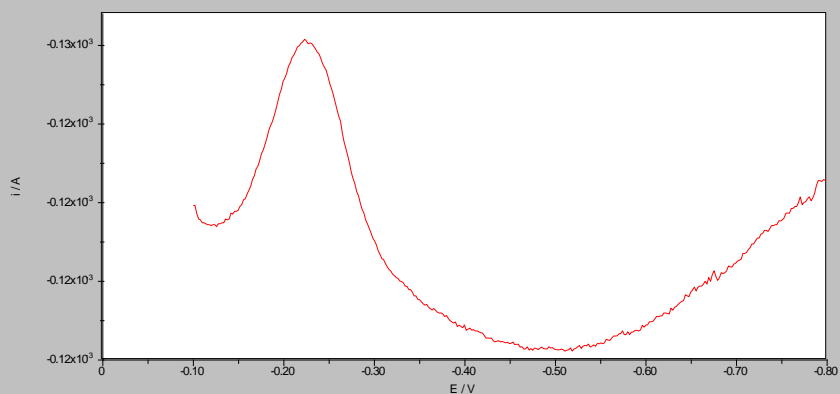


Slika 11. Pravokutnovalni voltamogram sulfadiazina koncentracije 1×10^{-4} M u pufer BR pH 3.5 snimljen na elektrodi od ugljikovih nanocjevčica s bizmutovim nanočesticama u 0.3 % Nafionu (plavo) i sulfasalazina koncentracije 5×10^{-6} M uz sulfadiazin u omjeru 1:1 (crveno)

Ispitivana je i interferencija s askorbinskom kiselinom. Na slici 12. prikazan je voltamogram na kojem je vidljivo da ukoliko se snima sama askorbinska kiselina nema pojave strujnog vrha te se vidi da smjesa sulfasalazina i 200 puta veće koncentracije askorbinske kiseline daje samo jedan strujni vrh redukcije sulfasalazina.



Slika 12. Pravokutnovalni voltamogram askorbinske kiseline koncentracije 1×10^{-3} M u pufer BR pH 3.5 snimljen na elektrodi od ugljikovih nanocjevčica s bizmutovim nanočesticama u 0.3 % Nafionu (plavo) i sulfasalazina koncentracije 5×10^{-6} M uz askorbinsku kiselinu u omjeru 1:200 (crveno)

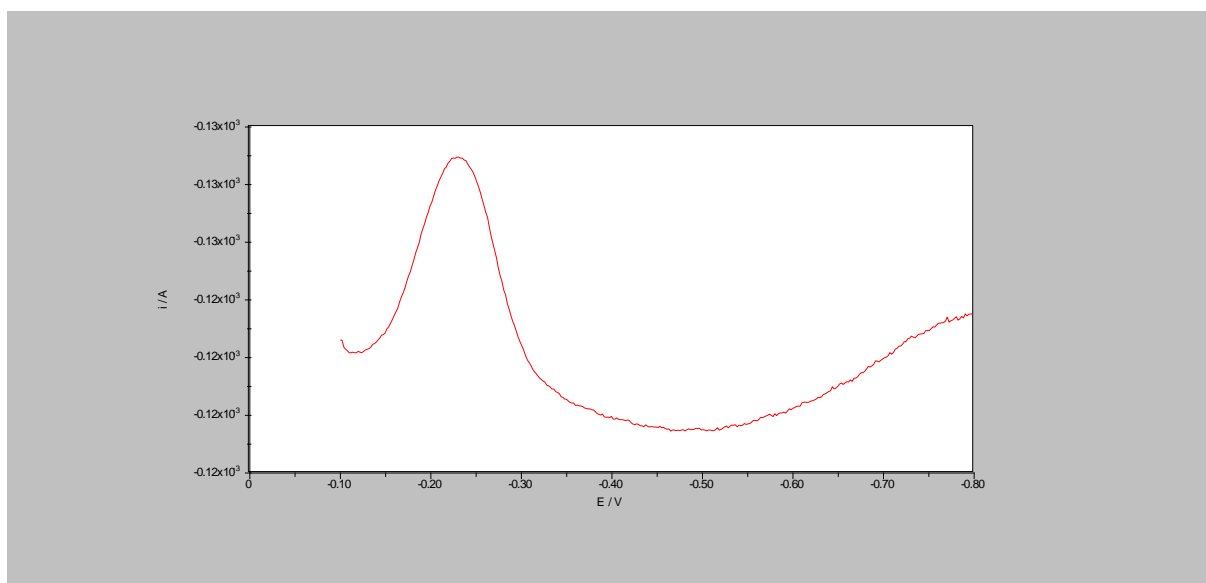


Slika 13. Pravokutnovalni voltamogram sulfasalazina koncentracije 5×10^{-6} M s dopaminom u omjeru 1:5 u pufer BR pH 3.5 snimljen na elektrodi modificiranoj ugljikovim nanocjevčicama i bizmutovim nanočesticama u 0.3 % Nafionu

Ispitivana je interferencija sulfasalazina s dopaminom u smjesi gdje je koncentracija dopamina 5 puta manja od koncentracije sulfasalazina. Iz pravokutnovalnog voltamogramana

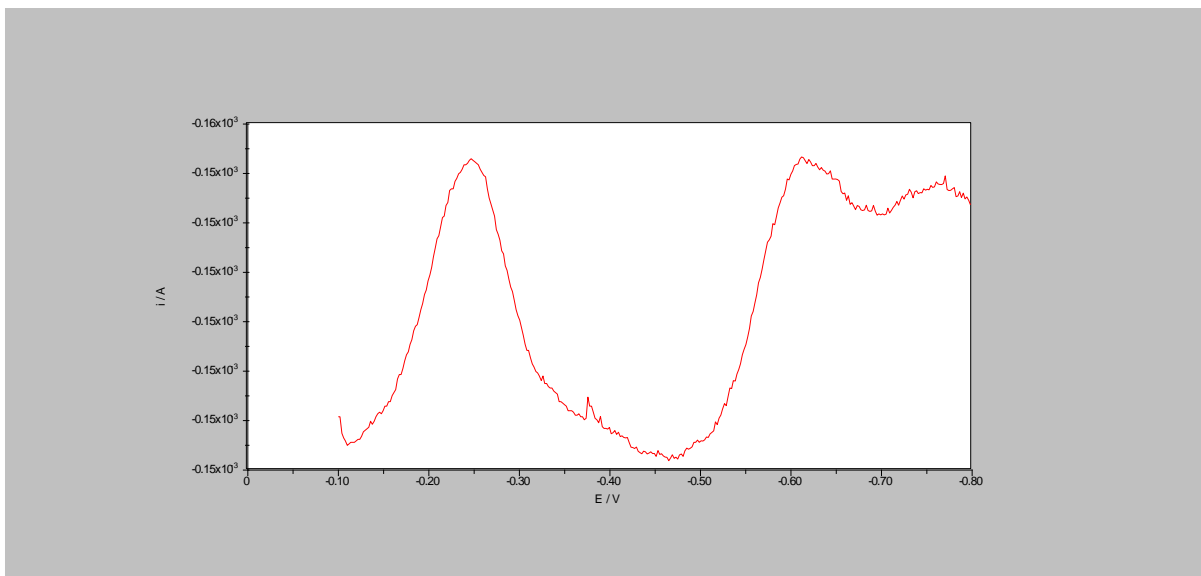
prikazanog na slici 13. vidljivo je da nema interferencija te je strujni vrh redukcije sulfasalazina sačuvan.

Osim toga ispitivana je interferencija sulfasalazina s uobičajenim spojevima koji se mogu naći u biološkom uzorku jer je metoda pokazala dovoljnu osjetljivost da se koristi za ispitivanje bioloških uzoraka. Ispitivana je smjesa glukoze i sulfasalazina gdje je koncentracija glukoze 500 puta veća te se iz voltamograma na slici 14. vidi da nema interferencija između ta dva spoja.



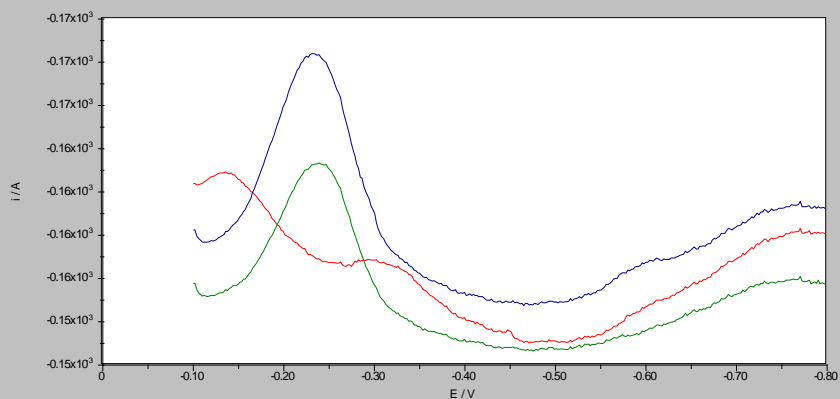
Slika 14. Pravokutnovalni voltamogram sulfasalazina koncentracije 5×10^{-6} M s glukozom u omjeru 1:500 u pufer BR pH 3.5 snimljen na elektrodi modificiranoj ugljikovim nanocjevčicama i bizmutovim nanočesticama u 0.3 % Nafionu

Na slici 15. prikazan je pravokutnovalni voltamogram smjese sulfasalazina i folne kiseline. Folna kiselina se koristi kao suplement u terapiji uz sulfasalazin jer često dolazi do njenog deficita. Za ispitivanje interferencije korištena je 10 puta manja koncentracija folne kiseline. Iz voltamograma možemo primijetiti da se uz strujni vrh sulfasalazina pri -0.250 V, pojavio i dodatni vrh na $E_p = -0.620$ V koji označava folnu kiselinu, no taj pik ne interferira pikom redukcije sulfasalazina

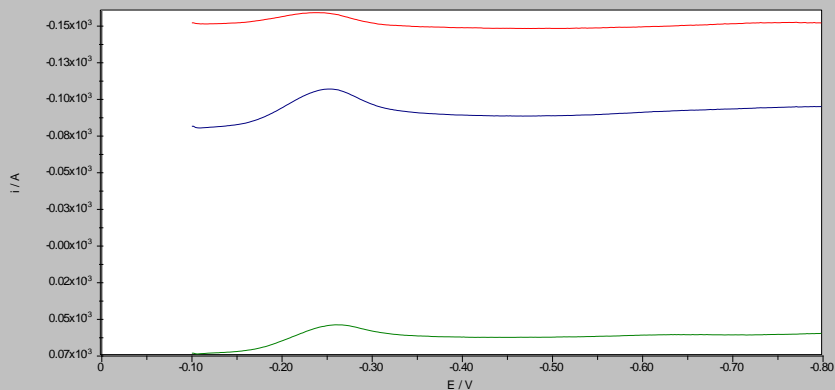


Slika 15. Pravokutnovalni voltamogram sulfasalazina koncentracije 5×10^{-6} M s folnom kiselinom u omjeru 1:0.1 u pufer BR pH 3.5 snimljen na modificiranoj ugljikovim nanocjevčicama i bizmutovim nanočesticama u 0.3 % Nafionu

Snimljeni su pravokutnovalni voltamogrami sulfasalazina, olsalazine i smjese oba lijeka u istim koncentracija što je prikazano na slici 16. Olsalazin je također lijek koji se koristit u liječenju Chronove bolesti i ulceroznog kolitisa te je strukturno sličan sulfasalazinu, ali za razliku od sulfasalazina u slučaju olsalazina dvije molekule 5–aminosalicilne kiseline su povezane azo - vezom. Na pravokutnovalnom voltamogramu samog olsalazina vide se dva manja pika redukcije olsalazina umjesto jednog jer je metoda prilagođena za ispitivanje sulfasalazina. U slučaju redukcije olsalazina na modificiranoj elektrodi potencijali struje povratnog i polaznog pulsa se ne preklapaju pa se pri prikazu neto struje vide dva vrha. Iz voltamograma snimljenog u otopini smjese sulfasalazina i olsalazina vidi se da dolazi do interferencija s olsalazinom jer se strujni vrh redukcije sulfasalazina povećao.



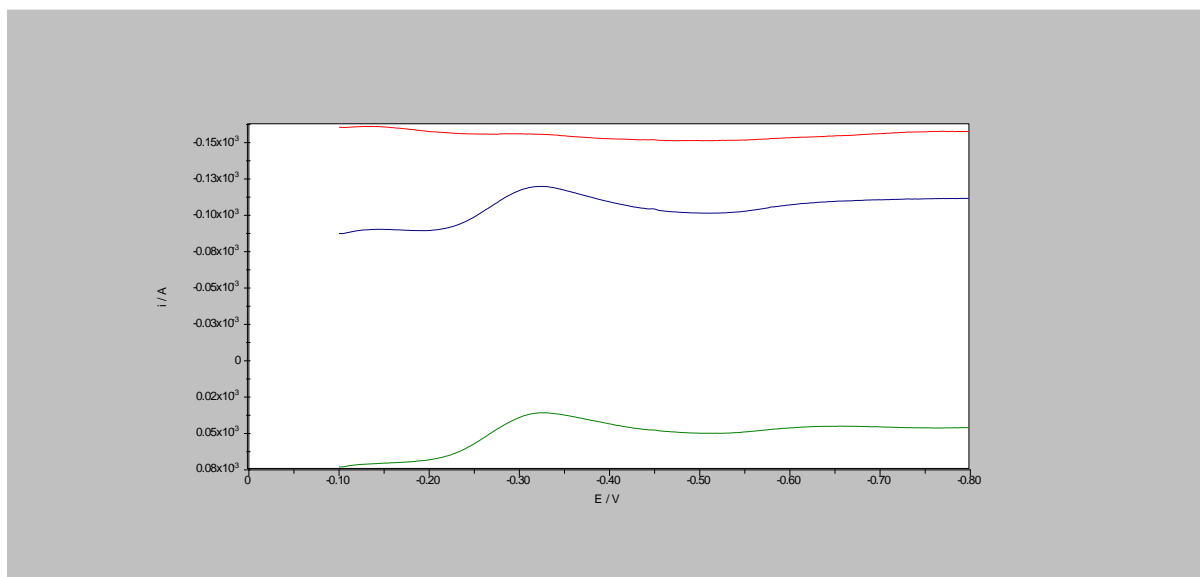
Slika 16. Pravokutnovalni voltamogram olsalazina koncentracije 5×10^{-5} M u pufer BR pH 3.5 snimljen na elektrodi modificiranoj ugljikovim nanocjevčicama i bizmutovim nanočesticama u 0.3 % Nafionu (crveno) i sulfasalazina koncentracije 5×10^{-6} M (zeleno) i smjese sulfasalazina iste koncentracije s olsalazinom u omjeru 1:1 (plavo)



Slika 17. Pravokutnovalni voltamogram sulfasalazina koncentracije 5×10^{-6} M u pufer BR pH 3.5 snimljen na elektrodi modificiranoj ugljikovim nanocjevčicama i bizmutovim nanočesticama u 0.3 % Nafionu: neto struja (crveno), struja polaznog pulsa (plavo), struja povratnog pulsa (zeleno)

Pik koji si vidi prilikom snimanja pravokutnovalnog voltamograma rezultat je razlike struja mjenjenih na početku polaznog pulsa i na kraju pulsa suprotnog smjera, što je prikazano na slici 17. kao neto struja. U ovom slučaju pri polaznom pulsu dolazi do redukcije azo veze, a kako je reakcija reverzibilna, dobiveni produkt se oksidira pri povratnom pulsu. Razlika koje se dobije je proporcionalna koncentraciji analita u otopini. Sulfasalazin pokazuje strujni vrh pri koncentraciji 5×10^{-6} M na -0.25 V.

Na slici 18. jer prikazan pravokutnovalni voltamogram olsalazina koncentracije 5×10^{-6} M u BR pufer te je snimljena struja polaznog pulsa i povratnog pulsa. Za razliku od sulfasalazina, olsalazin pokazuje maksimum potencijala na -0.325 V.



Slika 18. Pravokutnovalni voltamogram olsalazina koncentracije 5×10^{-6} M u pufer BR pH 3.5 snimljen na elektrodi modificiranoj ugljikovim nanocjevčicama i bizmutovim nanočesticama u 0.3 % Nafionu: neto struja (crveno), struja polaznog pulsa (plavo), struja povratnog pulsa (zeleno)

5. ZAKLJUČAK

Za potrebe razvoja nove elektroanalitičke metode za određivanje niskih koncentracija sulfasalazina istraživane su modifikacije površine elektrode od staklastog ugljika različitim nanomaterijalima. Cikličkom voltametrijom ispitivan je utjecaj modifikacije na voltametrijski odgovor sulfasalazina koji nastaje uslijed redukcije azo veze. Ispitane su modifikacije površine elektrode s grafenom, ugljikovim nanocjevčicama, bizmutovim nanočesticama i nanosuspensijom bizmutovih nanočestica i ugljikovih nanocjevčica. Najviši strujni vrh zabilježen je na površini modificiranoj kombinacijom nanomaterijala, bizmutovih nanočestica i ugljikovih nanocjevčica.

Da bi se metoda mogla koristiti u detekciji, identifikaciji i kvantifikaciji sulfasalazina, trebalo je ispitati selektivnost metode, odnosno kako interferencije drugih molekula utječu na redukciju sulfasalazina u uvjetima ove metode. U svrhu ispitivanja mogućih interferencija korištena je pravokutnovalna voltametrija, a ispitani su lijekovi poput sulfadiazina, olsalazina i mesalazina. Osim toga ispitane su i neke pomoćne tvari koji se mogu naći u tabletama poput laktoze i molekule koje se nalaze u biološkim tekućinama. Također je ispitana i moguća interferencija s folnom kiselinom koja je čest dodatak prehrani koji se koristi tijekom terapije sulfasalazinom.

Interferencije je pokazao samo olsalazin koji se kao i sulfasalazin koristi u liječenju Chronove bolesti i ulceroznog kolitisa. Do interferencije je došlo jer se kod olsalazina također reducira azo veza na bliskom potencijalu redukcije sulfasalazina. Kako ti lijekovi djeluju na isti način u terapiji se neće koristiti zajedno pa opažene interferencije nisu značajne.

Folna kiselina uzrokuje pojavu novog strujnog vrha na voltamogramu, ali taj strujni vrh ne interferira sa strujnim vrhom sulfasalazina u uvjetima koji se koriste za mjerenje. Ostale supstancije nisu pokazale interferenciju.

Za daljnji razvoj metode potrebno je validirati ostale parametre nove elektrokemijske metode i dokazati mogućnosti primjene metode za određivanje lijeka u biološkoj tekućini.

6. LITERATURA

Abhikari BR, Govindhan M, Chen A. Carbon nanomaterials based electrochemical sensors/biosensors for the sensitive detection of pharmaceutical and biological compounds, *Sensors*, 2015, 15, 22490-22508.

Brooks MA, Tsai EW, Electrochemistry in Pharmaceutical Analysis in Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry, Kissinger PT, Heineman WR, urednici, New York-Basel , Marcel Dekker Inc., 1996, 769-812.

Cyclic voltammogram & potential waveform, 2012
<http://compton.chem.ox.ac.uk/john/Thesis/1/1.html> , pristupljeno 26.4.2017.

Dogan-Topal B, Ozkan SA, Uslu B. The analytical application of square wave voltammetry on pharmaceutical analysis. *TOCBMJ*, 2010, 3, 56-73.

European Pharmacopoeia, 5th ed., Council of Europe, Strasbourg, 2004.

Electrochemical Cell for Voltammetry, 2013,
<http://community.asdlib.org/imageandvideoexchangeforum/2013/07/31/electrochemical-cell-for-voltammetry/> , pristupljeno 26.4.2017.

Francetić I, Macan D, Krznarić Ž, Pavlić-Renar I, Barić I i sur. Lijekovi s učinkom na probavni sustav i mijenu tvari. U: Farmakoterapijski priručnik. Makar-Aušperger K, Reiner Ž, urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2015, str.108.

Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Lijekovi za liječenje bolesti probavnog sustava. U: Temeljna i klinička farmakologija. Trkulja V, Klarica M, Šalković-Perišić M, urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2011, str.1088-1089.

Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Nesteroidni protuupalni lijekovi, antireumatici koji modificiraju bolest, neopioidni analgetici i lijekovi za liječenje uloga. U: Temeljna i klinička farmakologija. Trkulja V, Klarica M, Šalković-Perišić M, urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2011, str. 621-641.

Kauffmann JM. Biosensors in the pharmaceutical domain. *Annal Pharm Fr*, 2002, 60, 28-37.

Komorsky-Lovrić Š, Lovrić M. Voltometrija. 2007, Zagreb, Institut „Ruđer Bošković“.

Kujundžić M i sur. Klinička patofiziologija za studente Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2003, str. 95-97.

Lezi N, Vyskočil V, Economou A, Barek J. Electroanalysis of Organic Compounds at Bismuth Electrodes: A Short Review. *Sensing in Electroanalysis*, 2012,7, 71-78.

Mandić Z, Nigović B, Šimunić B. The mechanism and kinetics of the electrochemical cleavage of azo bond of 2-hydroxy-5-sulfophenyl-azo-benzoic acid. *Electrochim Acta*, 2004, 49, 607-615.

Mauritz KA, Moore RB. State of Understanding of Nafion, *Chem Rev*, 2004, 104, 4535-4585.

Navratil T, Barek J. Analytical Applications of Composite Solid Electrodes. *Crit Rev Anal Chem*, 2009, 39, 131-147.

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

Nigović B, Šimunić B, Hocevar S. Voltammetric measurements of aminosalicylate drugs using bismuth film electrode. *Electrochim Acta*, 2009, 54, 5678-5683.

Nigović B, Jurić S, Mitrović I. Bismuth nanoparticles-carbon nanotubes modified sensor for sulfasalazine analysis, *Talanta*, 2017, 164, 201-208.

Oyama M. Recent Nanoarchitectures in Metal Nanoparticle-modified Electrodes for Electroanalysis. *Anal Sci*, 2010, 26.

Reumatoidni artritis, 2014, <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-za-pacijente/bolesti-kostiju-zglobova-i-misica/bolesti-zglobova-i-vezivnog-tkiva/reumatoidni-artritis>, pristupljeno 26.2.2017.

Skoog DA, West D, Holler JF, Osnove analitičke kemije, Zagreb, Školska knjiga, 1999, str. 453-484.

Square-wave voltammetry, 2011, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Square-wave_voltammetry.png, pristupljeno 26.4.2017.

Sulfasalazine - PubChem, 2017, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5353980>, pristupljeno 13.04.2017.

Sulfasalazin Krka EN 500 mg želučanootporne tablete, Sažetak opisa svojstava lijeka, 2013, <http://www.halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/UP-I-530-09-13-02-137.pdf>, pristupljeno 13.04.2017.

Uslu B, Ozkan SA. Solid Electrodes in Electroanalytical Chemistry: Present Application and Prospect for High Throughput Screening of Drug Compounds. *Comb Chem High T Scr*, 2007, 10, 495-513.

Wang J. Analytical Electrochemistry. New York, Wiley - VHC Publishers, 2000.

Yanez-Sedeno P, Riu J, Pingarron JM, Rius FX. Electrochemical sensing based on carbon nanotubes, *Trends Anal Chem*, 2010, 29, 9.

Yang X, Feng B, He X, Li F, Ding Y, Fei J. Carbon nanomaterial based electrochemical sensors for biogenic amines, *Microchim Acta*, 2013, 180, 935-956.

7. SAŽETAK/SUMMARY

7.1. SAŽETAK

Sulfasalazin je antireumatik koji se koristi u liječenju, reumatoidnog artritisa, ankiloznog spondilitisa, juvenilnog artiritisa, Chronove bolesti i ulceroznog kolitisa. Djeluje protuupalno i antibakterijski.

U ovom radu cikličkom voltametrijom ispitivan je utjecaj modifikacije površine elektrode od staklastog ugljika na voltametrijski odgovor sulfasalazina koji nastaje uslijed redukcije azo veze. Ispitane su modifikacije površine elektrode s grafenom, ugljikovim nanocjevčicama, bizmutovim nanočesticama i nanosuspensijom bizmutovih nanočestica i ugljikovih nanocjevčica. Najviši strujni vrh zabilježen je na površini modificiranoj kombinacijom nanomaterijala, bizmutovih nanočestica i ugljikovih nanocjevčica, pri potencijalu od -0.2 V.

Zatim, ispitana je selektivnost nove elektroanalitičke metode praćenjem utjecaja interferencija drugih molekula na strujni vrh redukcije sulfasalazina pravokutnovalnom voltametrijom. Ispitivane su interferencije anorganskih tvari poput KNO_3 , ZnSO_4 , Na_2CO_3 , KH_2PO_4 , CuSO_4 , MgSO_4 , NaCl i FeCl_3 te organskih molekule poput glukoze, laktoze, folne kiseline, askorbinske kiseline, dopamina i limunske kiseline te interferencije lijekova mesalazina, olsalazina i sulfadiazina. Elektroanalitička metoda razvijena na modificiranoj površini elektrode sinergističkim djelovanjem bizmutovih nanočestica i ugljikovih nanocjevčica pokazala je izvrsnu selektivnost i potencijal za voltametrijsko određivanje sulfasalazina u biološkim tekućinama.

7.2. SUMMARY

Sulfasalazine is a disease-modifying antirheumatic drug and is used in the treatment of rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, juvenile arthritis, Chron's disease and ulcerative colitis. It has anti-inflammatory and antibacterial characteristics.

In this paper, effect of the modification of the surface of glassy carbon electrode on the voltammetric response of sulfasalazine due to reduction of the azo-link was studied by cyclic voltammetry. Studied modifications of the surface were electrode with graphen, carbon nanotubes, bismuth nanoparticles and nanocomposite of bismuth nanoparticles and carbon nanotubes. The highest current peak was recorded on the surface modified with combination of nanomaterials, bismuth nanoparticles and carbon nanotubes at potential of -0.2 V.

Then, the selectivity of the method was investigated by monitoring the influence of the interference of other molecules to the peak current of sulfasalazine reduction by square wave voltammetry. The investigated molecules were inorganic molecules such as KNO_3 , ZnSO_4 , Na_2CO_3 , KH_2PO_4 , CuSO_4 , MgSO_4 , NaCl and FeCl_3 , organic molecules such as glucose, lactose, folic acid, ascorbic acid, dopamine and citric acid, and interferences of drugs mesalazine, olsalazine and sulfadiazine. The electroanalytical method developed on the modified surface of electrode by the synergistics effect of bismuth nanoparticles and carbon nanotubes showed excellent selectivity and potential for voltammetric determination of sulfasalazine in biological fluids.

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

SELEKTIVNA ELEKTROANALITIČKA METODA ZA ODREĐIVANJE SULFASALAZINA

Iva Mitrović

SAŽETAK

Sulfasalazin je antireumatik koji se koristi u liječenju, reumatoidnog artritisa, ankiloznog spondilitisa, juvenilnog artritisa, Chronove bolesti i ulceroznog kolitisa. Djeluje protuupalno i antibakterijski.

U ovom radu cikličkom voltametrijom ispitivan je utjecaj modifikacije površine elektrode od staklastog ugljika na voltametrijski odgovor sulfasalazina koji nastaje uslijed redukcije azo veze. Ispitane su modifikacije površine elektrode s grafenom, ugljikovim nanocjevčicama, bizmutovim nanočesticama i nanosupenzijom bizmutovih nanočestica i ugljikovih nanocjevčica. Najviši strujni vrh zabilježen je na površini modificiranoj kombinacijom nanomaterijala, bizmutovih nanočestica i ugljikovih nanocjevčica, pri potencijalu od -0.2 V.

Zatim, ispitana je selektivnost nove elektroanalitičke metode praćenjem utjecaja interferencija drugih molekula na strujni vrh redukcije sulfasalazina pravokutnovalnom voltametrijom. Ispitivane su interferencije anorganskih tvari poput KNO_3 , ZnSO_4 , Na_2CO_3 , KH_2PO_4 , CuSO_4 , MgSO_4 , NaCl i FeCl_3 te organskih molekule poput glukoze, laktoze, folne kiseline, askorbinske kiseline, dopamina i limunske kiseline te interferencije lijekova mesalazina, olsalazina i sulfadiazina. Elektroanalitička metoda razvijena na modificiranoj površini elektrode sinergističkim djelovanjem bizmutovih nanočestica i ugljikovih nanocjevčica pokazala je izvrsnu selektivnost i potencijal za voltametrijsko određivanje sulfasalazina u biološkim tekućinama.

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

Rad sadrži: 43 stranica, 18 grafičkih prikaza, 3 tablica i 30 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Sulfasalazin, ciklička voltetrija, pravokutnovalna voltetrija, bizmut nanočestice, ugljikove nanocjevčice, modificirana elektroda

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

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

Dr. sc. Željko Maleš, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Branka Zorc, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: svibanj 2017.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

SELECTIVE ELECTROANALYTICAL METHOD FOR DETERMINATION OF SULFASALAZINE

Iva Mitrović

SUMMARY

Sulfasalazine is a disease-modifying antirheumatic drug and is used in the treatment of rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, juvenile arthritis, Chron's disease and ulcerative colitis. It has anti-inflammatory and antibacterial characteristics.

In this paper, effect of the modification of the surface of glassy carbon electrode on the voltammetric response of sulfasalazine due to reduction of the azo-link was studied by cyclic voltammetry. Studied modifications of the surface were electrode with graphen, carbon nanotubes, bismuth nanoparticles and nanocomposite of bismuth nanoparticles and carbon nanotubes. The highest current peak was recorded on the surface modified with combination of nanomaterials, bismuth nanoparticles and carbon nanotubes at potential of -0.2 V.

Then, the selectivity of the method was investigated by monitoring the influence of the interference of other molecules to the peak current of sulfasalazine reduction by square wave voltammetry. The investigated molecules were inorganic molecules such as KNO_3 , ZnSO_4 , Na_2CO_3 , KH_2PO_4 , CuSO_4 , MgSO_4 , NaCl and FeCl_3 , organic molecules such as glucose, lactose, folic acid, ascorbic acid, dopamine and citric acid, and interferences of drugs mesalazine, olsalazine and sulfadiazine. The electroanalytical method developed on the modified surface of electrode by the synergistics effect of bismuth nanoparticles and carbon nanotubes showed excellent selectivity and potential for voltammetric determination of sulfasalazine in biological fluids.

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

Thesis includes: 43 pages, 18 figures, 3 tables and 30 references. Original is in Croatian language.

Keywords: sulfasalazine, cyclic voltammetry, square wave voltammetry, bismuth nanoparticles, carbon nanotubes, modified electrode.+

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

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

Željko Maleš, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Branka Zorc, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: May 2017.