

# Pregled odabranih metoda za određivanje klozapina u farmakološkim pripravcima i biološkim uzorcima

---

**Golubić, Glorija**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:542489>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-26**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**PREGLED ODABRANIH METODA ZA ODREĐIVANJE**  
**KLOZAPINA U FARMAKOLOŠKIM PRIPRAVCIMA I BIOLOŠKIM**  
**UZORCIMA**

**ZAVRŠNI RAD**

**GLORIJA GOLUBIĆ**

**Matični broj: 440**

**Split, rujan 2021.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE**

**PREGLED ODABRANIH METODA ZA ODREĐIVANJE**  
**KLOZAPINA U FARMAKOLOŠKIM PRIPRAVCIMA I BIOLOŠKIM**  
**UZORCIMA**

**ZAVRŠNI RAD**

**GLORIJA GOLUBIĆ**

**Matični broj: 440**

**Split, rujan 2021.**

**UNIVERSITY OF SPLIT  
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY  
UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMISTRY**

**REVIEW OF SELECTED METHODS FOR DETERMINATION OF  
CLOZAPINE IN PHARMACOLOGICAL PREPARATIONS AND  
BIOLOGICAL SAMPLES**

**BACHELOR THESIS**

**GLORIJA GOLUBIĆ**

**Parent number: 440**

**Split, September 2021.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu

Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu

Preddiplomski studij Kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Tema rada je prihvaćena na VI. Elektronskoj sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta.

Mentor: doc. dr. sc. Maša Buljac

### PREGLED ODABRANIH METODA ZA ODREĐIVANJE KLOZAPINA U FARMAKOLOŠKIM PRIPRAVCIMA I BIOLOŠKIM UZORCIMA

Glorija Golubić, 440

#### Sažetak:

Klozapin je lijek koji spada u skupinu atipičnih antipsihotika. Koristi se kao terapija za shizofreniju rezistentnu na liječenje. Kako bi se poboljšao klinički ishod liječenja i smanjila mogućnost nuspojava, u novije vrijeme se primjenjuje terapijsko praćenje koncentracije lijeka u krvi. Iz navedenih razloga, razvoj preciznih i osjetljivih analitičkih metoda za određivanje klozapina u različitim uzorcima popularna je tema brojnih istraživačkih radova. Rad opisuje odabrane kromatografske i voltametrijske metode analize uzoraka te njihovu praktičnu primjenu za određivanje klozapina u farmaceutskim oblicima i različitim biološkim uzorcima. Na temelju pregleda različitih znanstvenih radova, ovaj rad uspoređuje rezultate metoda određivanja klozapina i prikazuje prednosti i nedostatke opisanih metoda.

**Ključne riječi:** shizofrenija, klozapin, kromatografija, voltometrija ugljikove elektrode

**Rad sadrži:** 64 stranica, 24 slika, 0 tablica, 0 priloga, 40 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

#### Sastav Povjerenstva za obranu:

1. doc.dr.sc. Lea Kukoč Modun

Predsjednik

2. izv. prof. dr. sc. Marijo Buzuk

Član

3. doc. dr. sc. Maša Buljac

Mentor

**Datum obrane:** 27.9.2021.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

**University of Split**

**Faculty of Chemistry and Technology Split**

**Undergraduate study of Chemistry**

**Scientific area: Natural sciences**

**Scientific field: Chemistry**

**Thesis subject** was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. VI

**Mentor: Maša Buljac, PhD, assistant prof.**

### REVIEW OF SELECTED METHODS FOR DETERMINATION OF CLOZAPINE IN PHARMACOLOGICAL PREPARATIONS AND BIOLOGICAL SAMPLES

Glorija Golubić, index number: 440

#### Abstract:

Clozapine is a drug that belongs to the group of atypical antipsychotics. It is used as a therapy for treatment-resistant schizophrenia. In order to improve the clinical outcome of treatment and reduce the possibility of side effects, therapeutic monitoring of drug concentration in the blood has recently been applied. For these reasons, the development of precise and sensitive analytical methods for the determination of clozapine in various samples is a popular topic of numerous research papers. This paper describes selected chromatographic and voltammetric methods of sample analysis and their practical application for the determination of clozapine in pharmaceutical forms and different biological samples. Based on a review of various scientific papers, this paper compares the results of clozapine determination methods and presents the advantages and disadvantages of the described methods.

**Keywords:** schizophrenia, clozapine, chromatography, voltammetry, carbon electrodes

**Thesis contains:** 64 pages, 24 figures, 0 tables, 0 insets, 40 literature references

**Original in:** Croatian

#### Defence committee:

1. Lea Kukoč Modun, PhD assistant prof.

Chair person

2. Marijo Buzuk, PhD associate prof.

Member

3. Maša Buljac, PhD assistant prof.

Supervisor

**Defence date:** September 27 2021.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35

*Završni rad je izrađen u Zavodu za Kemiju okoliša, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Maše Buljac, u razdoblju od lipnja do rujna 2021. godine.*



## ZAHVALA

*Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Maši Buljac na stručnoj pomoći i strpljenju prilikom izrade ovog rada.*

*Također zahvaljujem svojoj prijateljici Antei na nevjerovatnom strpljenju i podršci tijekom izrade rada i cijelog studiranja.*

*Glorija*

## **ZADATAK ZAVRŠNOG RADA**

Zadatak ovog završnog rada je:

- Opisati kromatografske i voltametrijske metode za analizu klozapina
- Opisati praktičnu primjenu različitih metoda za analizu klozapina u farmakološkim pripravcima i biološkim uzorcima

## **SAŽETAK**

Klozapin je lijek koji spada u skupinu atipičnih antipsihotika. Koristi se kao terapija za shizofreniju rezistentnu na liječenje. Kako bi se poboljšao klinički ishod liječenja i smanjila mogućnost nuspojava, u novije vrijeme se primjenjuje terapijsko praćenje koncentracije lijeka u krvi. Iz navedenih razloga, razvoj preciznih i osjetljivih analitičkih metoda za određivanje klozapina u različitim uzorcima popularna je tema brojnih istraživačkih radova. Rad opisuje odabrane kromatografske i voltametrijske metode analize uzoraka te njihovu praktičnu primjenu za određivanje klozapina u farmaceutskim oblicima i različitim biološkim uzorcima. Na temelju pregleda različitih znanstvenih radova, ovaj rad uspoređuje rezultate metoda određivanja klozapina i prikazuje prednosti i nedostatke opisanih metoda.

**Ključne riječi:** shizofrenija, klozapin, kromatografija, voltametrija, ugljikove elektrode

## **SUMMARY**

Clozapine is a drug that belongs to the group of atypical antipsychotics. It is used as a therapy for treatment-resistant schizophrenia. In order to improve the clinical outcome of treatment and reduce the possibility of side effects, therapeutic monitoring of drug concentration in the blood has recently been applied. For these reasons, the development of precise and sensitive analytical methods for the determination of clozapine in various samples is a popular topic of numerous research papers. This paper describes selected chromatographic and voltammetric methods of sample analysis and their practical application for the determination of clozapine in pharmaceutical forms and different biological samples. Based on a review of various scientific papers, this paper compares the results of clozapine determination methods and presents the advantages and disadvantages of the described methods.

**Keywords:** schizophrenia, clozapine, chromatography, voltammetry, carbon electrodes

## SADRŽAJ

|  |    |
|--|----|
| 1. UVOD.....   | 1  |
| 2. OPĆI DIO.....   | 4  |
| 2.1 SHIZOFRENIJA .....   | 5  |
| 2.2 ANTIPSIHOTICI.....   | 5  |
| 2.2.1 Farmakokinetika .....  | 5  |
| 2.2.2 Farmakodinamika .....  | 6  |
| 2.2.3 Indikacije.....  | 6  |
| 2.2.4 Nuspojave .....  | 6  |
| 2.3 KLOZAPIN.....  | 7  |
| 2.3.1 Sinteza klozapina .....  | 8  |
| 2.3.2. Farmakokinetika i metabolizam .....                                       | 9  |
| 2.3.3 Farmakodinamika .....  | 9  |
| 2.3.4 Indikacije.....  | 10 |
| 2.3.5 Nuspojave .....  | 10 |
| 2.3.6 Doziranje .....  | 10 |
| 2.4 TERAPIJSKO PRAĆENJE ANTIPSIHOTIKA.....                                       | 11 |
| 3. TEHNIKE (METODE) .....  | 13 |
| 3.1 KROMATOGRAFIJA.....  | 14 |
| 3.1.1 OSNOVNA PODJELA KROMATOGRAFSKIH TEHNIKA.....                               | 14 |
| 3.1.1.1 Plošna kromatografija .....  | 14 |
| 3.1.1.2 Kolonska kromatografija .....  | 15 |
| 3.1.2 TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA .....  | 15 |
| 3.1.2.1 Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti .....                    | 16 |
| 3.1.3 PLINSKA KROMATOGRAFIJA .....   | 17 |
| 3.1.3.1 Maseni spektrometar .....  | 19 |
| 3.2 VOLTAMetriJA .....   | 20 |
| 3.2.1 Primjena voltametrijskih metoda za analizu farmaceutski aktivnih tvari ... | 20 |
| 3.2.2 Diferencijalna pulsna voltametrija .....                                   | 21 |
| 3.2.3 Voltametrija linearne promjene potencijala .....                           | 23 |
| 3.2.4 Ciklička voltametrija.....   | 24 |
| 3.2.5 Metode otapanja - <i>Stripping</i> analiza .....                           | 25 |
| 3.2.6 Čvrste elektrode.....  | 26 |
| 3.2.5.1 Ugljikove elektrode .....  | 26 |
| 3.2.5.1.1 Elektrode od staklastog ugljika.....                                   | 27 |
| 3.3 IMUNOLOŠKI TEST - BUDUĆNOST DIJAGNOSTIKE.....                                | 29 |
| 3.3.1 Enzimski povezani imunosorbentni test .....                                | 29 |
| 3.3.2 Radioimunološki test .....   | 29 |
| 4. PREGLED PRIMJENE ODABRANIH METODA ZA ANALIZU KLOZAPINA                        | 32 |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>4.1 GC-MS METODA ZA ISTOVREMENO ODREĐIVANJE KLOZAPINA I NORKLOZAPINA U LJUDSKOJ PLAZMI.....</b>  | <b>33</b> |
| 4.1.1 Primjena opisane metode u analizi uzoraka plazme psihijatrijskih pacijenata .....   | 34        |
| <b>4.2 OPTIMIZACIJA I VREDNOVANJE HPLC-UV METODE ZA ANALIZU KLOZAPINA I NJEGOVIH METABOLITA U LJUDSKOJ PLAZMI.....</b>                          | <b>36</b> |
| 4.2.1 Optimizacija metode .....   | 37        |
| 4.2.2 Vrednovanje metode .....  | 37        |
| <b>4.3 USPOREDBA IMUNOTESTA I LC-MS/MS METODE ZA TERAPEUTSKO PRAĆENJE KLOZAPINA .....</b>   | <b>40</b> |
| 4.3.1 Određivanje razine klozapina u serumu .....   | 41        |
| <b>4.4 USPOREDBA LC I LSV METODA ZA ODREĐIVANJE KLOZAPINA U TABLETAMA .....</b>   | <b>43</b> |
| 4.4.1 LC metoda.....  | 43        |
| 4.4.2 LSV metoda.....   | 44        |
| <b>4.5 VOLTAMETRIJSKO ODREĐIVANJE KLOZAPINA U TABLETAMA.....</b>  | <b>46</b> |
| 4.5.1 Određivanje klozapina .....   | 46        |
| <b>4.6 ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE I ODREĐIVANJE KLOZAPINA NA ELEKTRODI OD STAKLASTOG UGLJIKA MODIFICIRANOJ ELEKTROKEMIJSKOM OKSIDACIJOM.....</b> | <b>49</b> |
| 4.6.1 Predtretiranje radne elektrode i priprema uzoraka .....   | 49        |
| 4.6.2 Voltametrijsko ponašanje klozapina na modificiranoj elektrodi .....   | 50        |
| 4.6.3 Optimizacija uvjeta za predobradu radne elektrode .....   | 51        |
| 4.6.4 Adsorpcijsko ponašanje klozapina .....  | 51        |
| 4.6.5 Utjecaj pH vrijednosti, vremena akumulacije i akumulacijskog potencijala na voltametrijski odziv .....                                    | 52        |
| 4.6.6 Određivanje klozapina u farmaceutskim pripravcima.....  | 53        |
| <b>5. ZAKLJUČAK .....</b>   | <b>55</b> |
| <b>6. LITERATURA.....</b>   | <b>60</b> |

## **1. UVOD**

Shizofrenija je teška mentalna bolest koju karakteriziraju pozitivni simptomi (halucinacije i deluzije), negativni simptomi (emocionalna tupost, otuđivanje od društva) i kognitivni deficiti. Antipsihotični lijekovi koriste se za liječenje shizofrenije i drugih psihoza. Općenito, antipsihotici se primjenjuju u oralnim dozama od samo nekoliko miligrama dnevno i široko se metaboliziraju u tijelu. Stoga je koncentracija ovih lijekova u plazmi vrlo niska (razine u pg-ng/mL).

Proboj u liječenju shizofrenije postignut je uvođenjem klopazina, prvog atipičnog antipsihotika. Klopazin, triciklički derivat dibenzodiazepina, klasificiran je kao atipični antipsihotik zbog svojih složenih farmakoloških svojstava i različitih učinaka koje proizvodi u usporedbi s onima koje pokazuju tipični antipsihotički lijekovi. Klopazin je vrlo učinkovit protiv svih simptoma shizofrenije i uspješno se koristi u pacijenata koji ne reagiraju na klasične neuroleptičke lijekove.

Terapijsko praćenje lijekova (TDM, engl. *Therapeutic Drug Monitoring*) podrazumijeva određivanje količine određenih lijekova u krvi kako bi se utvrdilo da li je primljena doza sigurna i učinkovita. Za većinu lijekova nisu potrebna terapijska praćenja, međutim određene vrste lijekova poput onih za liječenje kardiovaskularnih bolesti, antipsihotici te lijekovi za bipolarni poremećaj moraju proći ispitivanja kako bi se osiguralo da primljena doza ne izaziva opasne nuspojave. Potreba za terapijskim praćenjem pacijenata koji su na terapiji i dalje je evidentna jer je početak nuspojava često povezan s visokim koncentracijama lijekova u plazmi. Terapijsko praćenje pacijenata može značajno poboljšati znanje o farmakološkim interakcijama među različitim antipsihotičnim lijekovima, kao i povećati usklađenost pacijenata, što dovodi do veće učinkovitosti liječenja. Štoviše, TDM se pokazao posebno korisnim u izbjegavanju teških nuspojava uzrokovanih visokim dozama lijekova ili njihovom interakcijom s drugim lijekovima.

Određivanje klopazina od velike je važnosti zbog čega su razvijene brojne analitičke metode poput kromatografskih i voltometrijskih metoda za određivanje klopazina u farmaceutskim pripravcima i biološkim uzorcima. Istraživanje terapijskih i toksičnih učinaka lijeka zahtjeva osjetljive metode za određivanje vrlo niskih koncentracija lijeka u različitim oblicima.



Cilj ovog završnog rada je ukazati na važnost terapijskog praćenja klozapina u svrhu poboljšanja liječenja te opisati primjenu najučinkovitijih kromatografskih i voltametrijskih metoda za određivanje klozapina u različitim farmaceutskim i biološkim uzorcima.

## **2. OPĆI DIO**

## 2.1 SHIZOFRENIJA

Shizofrenija je psihotični poremećaj karakteriziran halucinacijama i deluzijama koji zahvaća 1% populacije. Naziv potječe od grčkih riječi ”*Shizo*” (cijepanje) i ”*phren*” (um) te ga je prvi dodijelio Eugen Bleuler 1908. godine. Simptomi shizofrenije dijele se na pozitivne i negativne. Pozitivni simptomi uključuju halucinacije, deluzije, poremećaje razmišljanja i disorganiziran govor, dok negativni simptomi uključuju manjak motivacije i govora, udaljavanje od društva i emocionalnu tupost. Shizofrenija se smatra neurorazvojnim poremećajem, dok neka istraživanja na obiteljima i blizancima ukazuju i na genetsku podlogu koje uključuju brojne mutacije (delecije i insercije) multiplih gena. Postoje tri glavne hipoteze koje objašnjavaju patogenezu shizofrenije: dopaminska, serotoniniska i glutaminska. Navedene hipoteze pretpostavljaju da je uzrok nastanka shizofrenije posljedica poremećaja u ravnoteži ovih neurotransmitera.<sup>[1]</sup>

## 2.2 ANTIPSIHOTICI

Antipsihotici su lijekovi korišteni za liječenje shizofrenije i ostalih psihotičnih poremećaja. Kategorizirani su u dvije skupine lijekova: prva generacija ili ”tipični” antipsihotici i druga generacija tj. ”atipični”. Druga generacija lijekova je uvedena zbog brojnih ekstrapiramidalnih nuspojava povezanih s dopaminergičkom blokadom uzrokovanom prvom generacijom lijekova. Samim time dobili su ime ”atipični” jer imaju drugačiji mehanizam djelovanja<sup>[1]</sup>

### 2.2.1 Farmakokinetika

Apsorpcija antipsihotika nije potpuna i većina njih prolazi metabolizam ”prvog prolaska” čime im se smanjuje bioraspodivnost u sistemskoj cirkulaciji. Antipsihotici su liposolubilni, vežu se jako za plazma proteine (92-99%) i imaju veliki volumen distribucije. Većina antipsihotika metabolizira se putem oksidacije ili metilacije u jetri nakon čega se izlučuju urinom.<sup>[1]</sup>

### **2.2.2 Farmakodinamika**

Prva generacija antipsihotika koju predvodi klorpromazin blokira prvenstveno dopaminske D2 receptore, zbog čega uzrokuju pojavu ekstrapiramidalnih simptoma. Ekstrapiramidalni su simptomi povezani s prejakom blokadom D2 receptora, a nalikuju na simptome Parkinsonove bolesti, primjerice tremor, usporeni rad srca (bradikardija), teškoće u govoru i krutost lica.<sup>[1]</sup>

Druga generacija lijekova blokira D2 receptore u manjoj mjeri, ali zato blokira i 5-HT<sub>2</sub> receptore zbog čega rjeđe uzrokuju ekstrapiramidalne simptome.

Antipsihotici nisu selektivni antagonisti već blokiraju i druge receptore osim D2 i 5-HT<sub>2</sub>, prvenstveno muskarinske, adrenergičke i histaminske receptore. Afinitet vezanja za specifične receptore varira od lijeka do lijeka zbog čega svaki ima drugačiji klinički učinak i drugačiji profil neželjenih učinaka.<sup>[1]</sup>

### **2.2.3 Indikacije**

Shizofrenija je glavna i najpoznatija indikacija za korištenje antipsihotika, međutim nije jedina. Antipsihotici su indicirani također u shizoafektivnim poremećajima i u bipolarnom poremećaju za kontrolu manične faze te za liječenje depresije u kombinaciji s antidepresivima.<sup>[1]</sup>

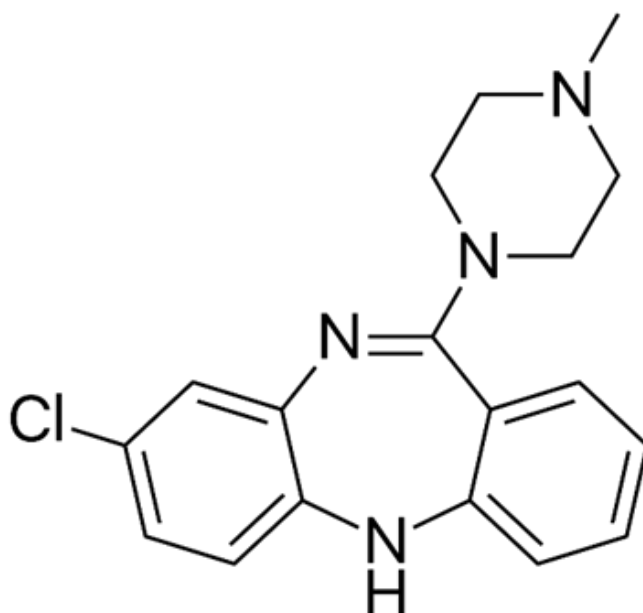
### **2.2.4 Nuspojave**

Ekstrapiramidalni simptomi pojavljuju se kao posljedica blokade dopaminergičkih neurona. U pacijenata liječenih tipičnim antipsihoticima mogu se pojaviti akatizija (nemir) i simptomi parkinsonizma, primjerice bradikardija (usporeni pokreti) te tardivna diskinezija (nevoljni pokreti).<sup>[1]</sup>

Korištenje antipsihotika ujedno može uzrokovati povećanje tjelesne mase, ortostatsku hipotenziju (nagli pad tlaka tijekom ustajanja), probleme s vidom, suhoću usta i zatvor. Navedene nuspojave posljedica su interakcije lijekova s ostalim nedopaminskim receptorima, primjerice adrenergičkim ili muskarinskim receptorima.<sup>[1]</sup>

## 2.3 KLOZAPIN

Klozapin je triciklički derivat dibenzodiazepina, 8-klor-11-(4-metil-1-piperazinil)-5H-dibenzo [b, e] [1,4] diazepin koji je slabo topljiv u vodi, dok je topljiv u acetonu, a u kloroformu iznimno dobro topljiv. Klozapin je prvi atipični antipsihotik koji se koristi za liječenje pozitivnih i negativnih simptoma shizofrenih pacijenata koji su rezistentni na liječenje tradicionalnim neuroleptičkim lijekovima. Također se koristi za smanjenje rizika suicidalnog ponašanja kod pacijenata sa shizofrenijom i shizoafektivnim poremećajem. Sintetiziran je prvi put u Švicarskoj 1958. godine, a zatim identificiran 1959. godine.

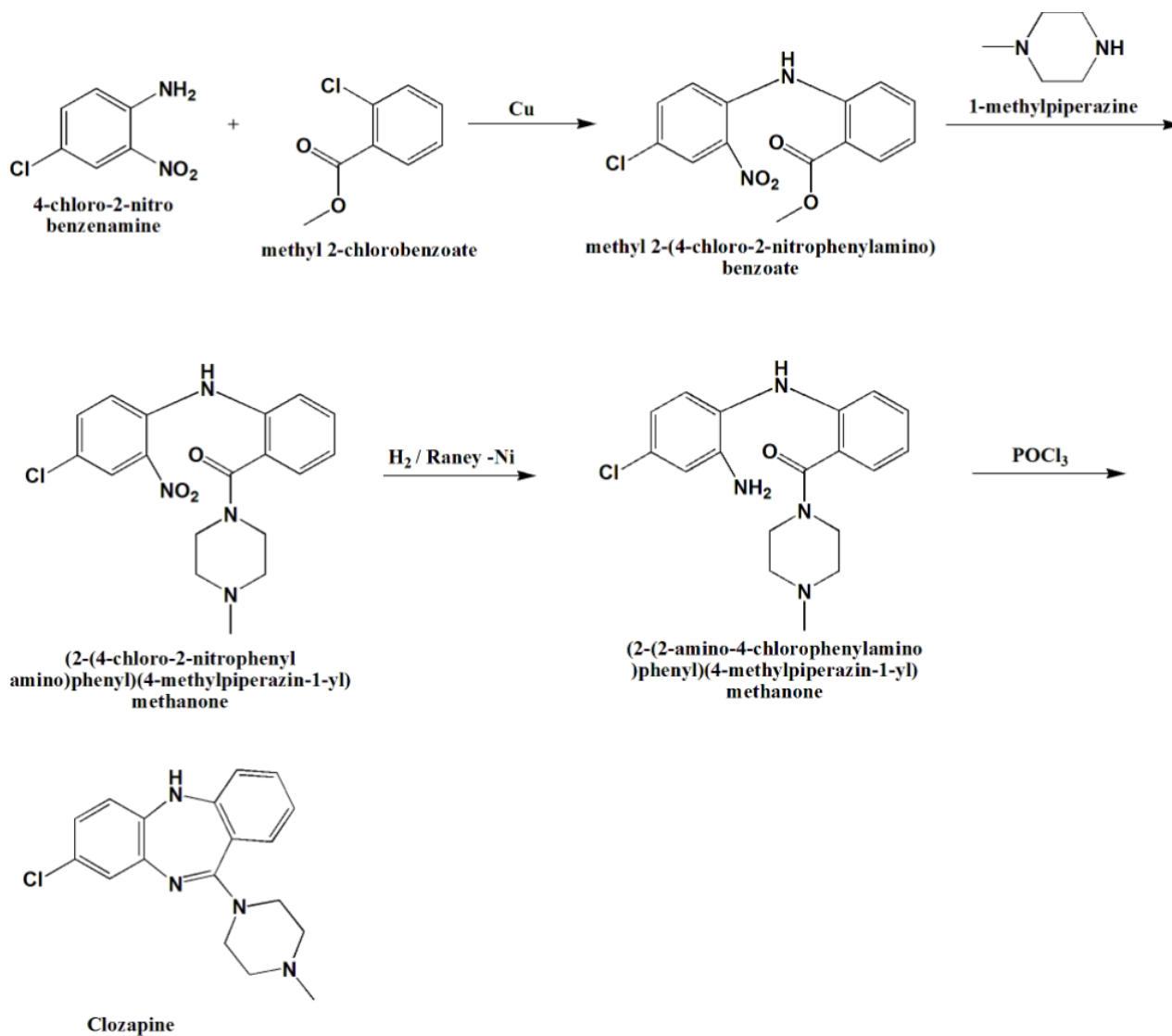


**Slika 1.** Struktura klozapina <sup>[2]</sup>

Klozapin se pojavljuje kao blijedožuti kristalni prah bez mirisa i okusa, molekulske mase 326,83 g/mol i tališta 183-184 °C.<sup>[3]</sup>

### 2.3.1 Sinteza klozapina

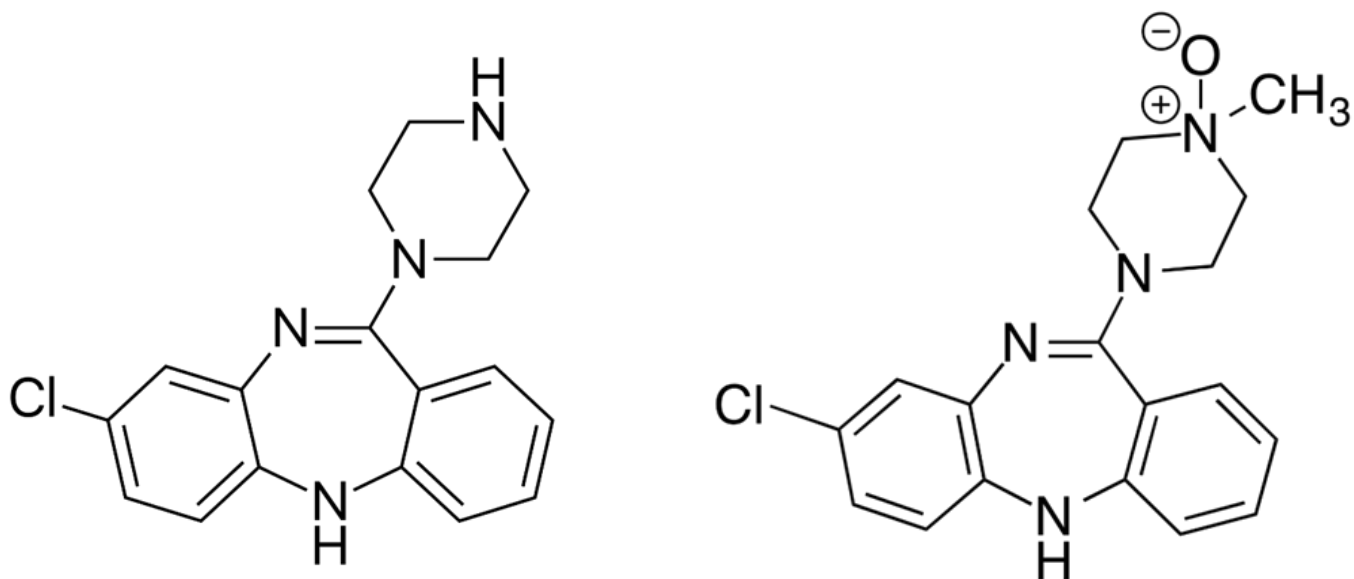
1. 4-kloro-2-nitroanilin se u prisutnosti bakra acilira metilnim esterom o-klorbenzojeve kiseline kako bi nastao odgovarajući difenilamin. Esterska grupa u nastalom difenilaminu u se u reakciji s N-metil piperazinom pretvara u amid.
2. Nitro-skupina amida reducira se u prisutnosti Raney-nikla u amin pomoću vodika
3. Reakcijom produkta s fosfornim oksikloridom dolazi do heterociklizacije u željeni klozapin<sup>[3]</sup>



Slika 2. Sinteza klozapina <sup>[3]</sup>

### 2.3.2. Farmakokinetika i metabolizam

Klozapin je lijek koji se nakon oralne primjene gotovo potpuno apsorbira iz crijeva, ali njegova bioraspoloživost varira od 12% do 90% zbog efekta prvog prolaska. Naime prilikom prolaska kroz jetru dio lijeka se metabolizira zbog čega se koncentracija koja ulazi u sistemsku cirkulaciju smanjuje i iznosi prosječno 50 – 60%.<sup>[4]</sup> Vršna se koncentracija u plazmi dostiže 2h nakon oralne administracije te se većina klozapina u krvi veže za plazma proteine (97%). Poluživot lijeka je prosječno 12h. Klozapin se najvećim dijelom metabolizira u jetri putem citokrom P450 sustava u norklozapin (NCLZ, engl. *Norclozapine*), aktivni metabolit lijeka, i klozapin N-oksid (CLZNO, engl. *Clozapine N-oxide*), inaktivni metabolit lijeka.<sup>[5]</sup>



Slika 3. Strukture norklozapina (lijevo) i klozapin N-oksida (desno) <sup>[6,7]</sup>

### 2.3.3 Farmakodinamika

Točan mehanizam djelovanja klozapina još uvijek nije u potpunosti otkriven. Klozapin se slabije veže za D2 receptore, u usporedbi s antipsihoticima I. generacije, zbog čega svoje

efekte ostvaruje putem ostalih receptora. Smatra se da je klozapinov visok afinitet za D4 dopaminske receptore i 5HT2 serotoninске receptore uzrok njegove efikasnosti.<sup>[8]</sup>

Od ostalih receptora klozapin se još veže za alfa 1 i 2 adrenergičke receptore, M1 muskarinske receptore i histaminske H1 i H2 receptore koji bi isto mogli doprinijeti njegovoj učinkovitosti <sup>[9]</sup>

### **2.3.4 Indikacije**

EMA ( engl. *European Medicines Agency*) navodi liječenje shizofrenije rezistentne na terapiju (lijek trećeg izbora) kao i liječenje pacijenata sa shizofrenijom s teškim, neizlječivim neurološkim nuspojavama na druge antipsihotike, kao primarnu indikaciju za korištenje klozapina. Također se može koristiti prilikom liječenja Parkinsonove bolesti zbog neuroloških nuspojava drugih lijekova koje se ne mogu liječiti standardnom terapijom.<sup>[10]</sup> FDA (engl. *Food and Drugs Administration*) također odobrava korištenje klozapina za smanjenje suicidalnog ponašanja u pacijenata sa shizofrenijom ili shizoafektivnim poremećajima.<sup>[11]</sup>

### **2.3.5 Nuspojave**

Zbog raznolikog profila receptora za koje se klozapin veže, ovaj lijek ima brojne nuspojave koje su glavna prepreka njegovom učestalijem korištenju .

Kao i ostali antipsihotici klozapin može dovesti do pojave ortostatske hipotenzije, zatvora, povećanja tjelesne mase i dijabetesa, ali u usporedbi s antipsihoticima I. generacije ovaj lijek rijetko uzrokuje ekstrapiramidalne simptome.<sup>[4]</sup>

Najopasnija je nuspojava agranulocitoza odnosno smanjenje broja bijelih krvnih stanica ispod 500/mm<sup>3</sup>. Smanjenje broja leukocita može dovesti do infekcije različitim oportunističkim bakterijama i gljivicama što može dovesti do smrti pacijenta.<sup>[4]</sup>

### **2.3.6 Doziranje**

Klozapin je lijek čija se doza mora polako titrirati. Pacijent započinje prvi dan s 12,5 mg jednom ili dvaput, a drugi dan uzima 25 mg jednom ili dvaput. Nakon toga doza se polako povisuje za 25-50 mg dnevno do ciljane doze od 300 – 450 mg/dan, a maksimalna dnevna doza iznosi 900 mg. U slučaju izostanka terapijskog odgovora ili izraženih nuspojava



preporuča se određivanje koncentracije klopazina u plazmi kako bi se doza mogla korigirati. Terapijski raspon iznosi od 350 do 690 ng/mL.<sup>[12]</sup>

## **2.4 TERAPIJSKO PRAĆENJE ANTIPSIHOTIKA**

Terapijsko praćenje lijekova klinička je praksa mjerenja razine lijekova u krvi radi postizanja ciljnih koncentracija u svrhu poboljšanja učinkovitosti lijeka i smanjenja nuspojava. Cilj TDM -a je korištenje podataka o razini lijeka za optimizaciju kliničkih ishoda i za propisivanje primjerenih doza. TDM je koristan kod slučajeva nereagiranja na terapijske doze, kod praćenja podnošljivosti na lijekove te kod promatranja farmakokinetičkih interakcija lijekova čime se omogućava bolja personalizirana farmakoterapija.

TDM se manje koristi kod ljudi kojima je dijagnosticirana shizofrenija nego u drugim medicinskim područjima ponajprije zbog varijacija u dokazima i nedostataka jasno definiranih terapijskih raspona za većinu antipsihotičnih lijekova. Unatoč tome, TDM se primjenjuje za praćenje klopazina. Budući da je klopazin najučinkovitiji lijek za shizofreniju, uklanjanje prepreka za njegovu uporabu i određivanje najbolje doze omogućava bolesnicima i s najtežim slučajevima shizofrenije najbolju priliku za oporavak.

Osim što povećava učinkovitost, praćenje koncentracije klopazina u serumu može pomoći pri pridržavanju propisane terapije. Nepridržavanje plana uzimanja lijekova često je povezano s rehospitalizacijama, recidivima, težim postizanjem remisije ali i povećanim rizikom od samoubojstva. Smanjenje razine klopazina u serumu kada pacijent postane simptomatičan može poslužiti kao rani pokazatelj nepridržavanja terapije, pa potiče kliničku intervenciju za sprječavanje štetnih posljedica.

Nadalje, druga prednost praćenja koncentracije klopazina u serumu je pomno praćenje nuspojava i toksičnosti tijekom farmakokinetičkih promjena u bolesnika. Klopazin se metabolizira putem različitih jetrenih enzima, stoga je podložan interakcijama s ostalim lijekovima i tvarima, tj. induciranjem ili inhibiranjem ovih enzima može doći do promjene koncentracije klopazina u serumu. Npr. koncentracija klopazina u serumu može se smanjiti i za 30% zbog aromatskih ugljikovodika nastalih tijekom konzumiranja cigareta što može

uzrokovati toksičnost lijeka. Također je zabilježeno da razne infekcije uzrokuju vrlo povišene razine klozapina u serumu, čak i do pet puta.

Iako prag toksičnosti klozapina nije jasno utvrđen, pokazalo se da su brojne nuspojave usko povezane s razinom klozapina u serumu te da su vrlo visoke razine uzrok većine smrtnih slučajeva. Zbog toga, provode se istraživanja u svrhu procjenjivanja omjera norklozapina, aktivnog metabolita, i klozapina kao pokazatelja nuspojava.<sup>[13]</sup>

### **3. TEHNIKE (METODE)**

### **3.1 KROMATOGRAFIJA**

Kromatografija je fizikalna metoda odjeljivanja komponenata smjese na temelju njihove različite raspodjele između dviju faza, pokretne (mobilne) i nepokretne (stacionarne).<sup>[14]</sup> Pri kromatografskim analizama pokretna faza (plinovita ili tekuća) nosi komponente uzorka kroz nepokretnu fazu, a odjeljivanje komponenti temelji se na njihovim različitim brzinama kretanja kroz nepokretnu fazu.<sup>[14]</sup> Osnovna podjela kromatografskih tehnika jest podjela prema kontaktu pokretne i nepokretne faze, stoga razlikujemo plošnu i kolonsku kromatografiju. Kod plošne kromatografije nepokretna faza je nanosena na ravnu plohu ili papir, dok se pokretna faza kreće kroz nepokretnu djelovanjem kapilarnih sila ili gravitacije.<sup>[15]</sup> Nepokretna faza u kolonskoj kromatografiji ispunjava usku cijev kroz koju se kreće pokretna faza pod utjecajem tlaka ili gravitacije.<sup>[15]</sup> Druga vrsta podjele jest s obzirom na agregacijsko stanje pokretne faze ( plinska, tekućinska i kromatografija sa superkritičnim fluidom). Kromatografske tehnike također možemo podijeliti prema ravnoteži između pokretne i nepokretne faze na: razdjelnu, afinitetnu, ionsko-izmjenjivaču kromatografiju te kromatografiju isključenjem. Kromatogram je grafički prikaz bilo koje funkcije koncentracije sastojka analiziranog uzorka u ovisnosti o vremenu ili volumenu elucije.<sup>[14]</sup>

#### **3.1.1 OSNOVNA PODJELA KROMATOGRFSKIH TEHNIKA**

##### **3.1.1.1 Plošna kromatografija**

Nepokretna faza u plošnoj kromatografiji je kromatografski papir ili sloj sorbensa nanosen na čvrst nosač ( pločicu od stakla, metala ili plastike).<sup>[14]</sup>

Plošnu kromatografiju dijelimo na:

- Papirnu kromatografiju- nepokretna faza je celuloza iz papira (mogu se koristiti papiri s ionskom smolom, silikagelom ili aluminijevim oksidom itd.)
- Tankoslojnu kromatografiju- nepokretna faza je tanki homogeni sloj sorbensa nanosen na inertnu podlogu ( staklo, aluminijska folija...)<sup>[14]</sup>

### 3.1.1.2 Kolonska kromatografija

Nepokretna faza mogu biti čvrste čestice ili sloj tekućine nanesen uz stijeku kolone ili čvrste čestice. Čvrsti ili tekući uzorak unosi se u vrh kolone, a komponente uzorka putuju različitim brzinama kroz kolonu na čemu se i temelji kromatografsko odjeljivanje. Ako se koristi čvrsti uzorak, on mora biti topljiv u pokretnoj fazi.<sup>[14]</sup>

Kolonsku kromatografiju dijelimo na:

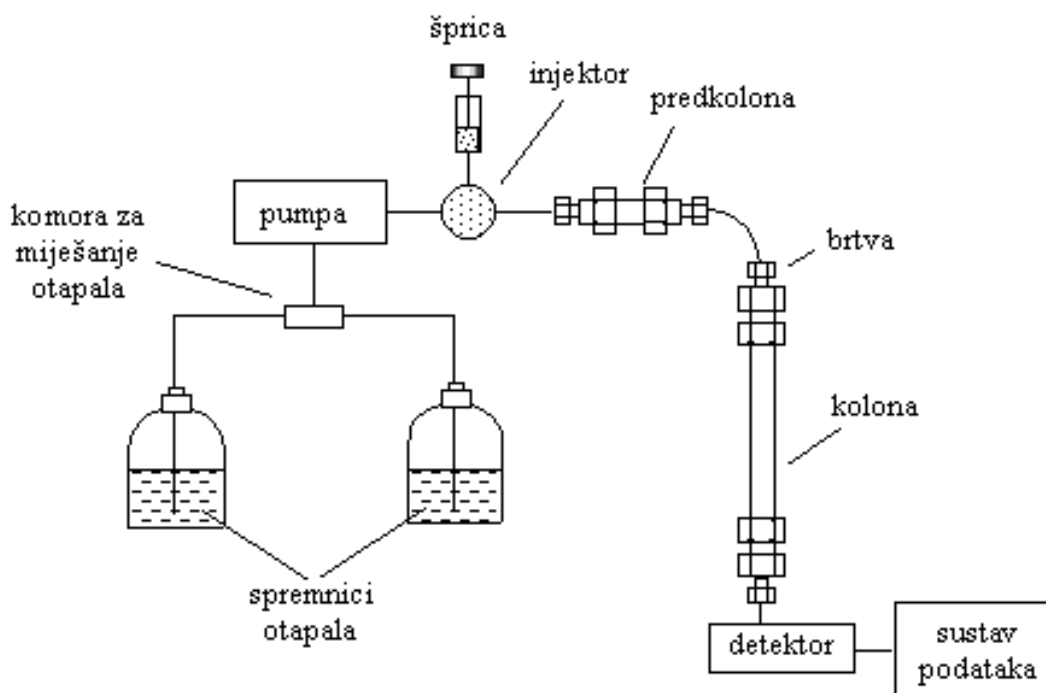
- Plinsku kromatografiju- pokretna faza je plin nosač, a nepokretna faza je čvrsta tvar
- Tekućinsku kromatografiju- pokretna faza je tekućina koja prolazi kroz kolonu punjenu nepokretnom fazom
- Kromatografiju sa superkritičnim fluidom- pokretna faza je fluid iznad ili blizu kritične temperature i tlaka.<sup>[14,15]</sup>

### 3.1.2 TEKUĆINSKA KROMATOGRFIJA

Tekućinska kromatografija (LC, engl. *Liquid Chromatography*) je bitna kromatografska tehnika kod koje je pokretna faza tekućina male viskoznosti. Kolone koje se koriste kod tekućinske kromatografije velikog su promjera i ispunjene su nepokretnom fazom. Pokretna faza putuje kroz kolonu djelovanjem tlaka ili gravitacije, a brzina kojom se komponente razdjeljuju između faza ovisi primarno o difuziji.<sup>[14]</sup> Prednost tekućinske kromatografije pred plinskom jest mogućnost analize velikog broja spojeva koje se ne može prevesti u plinoviti oblik. S druge strane, analiza ovom tehnikom je vremenski zahtjevna. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti napredna je vrsta tekućinske kromatografije u kojoj otapalo putuje djelovanjem visokog tlaka dobivenog pomoću crpke kako bi se prevladao pad tlaka u koloni.<sup>[16]</sup> Razvojem ove vrste kromatografije, vrijeme potrebno za analizu znatno je skraćeno.<sup>[14]</sup>

### 3.1.2.1 Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC, engl. *High Performance Liquid Chromatography*) veoma je selektivna i lako primjenjiva za kvantitativnu analizu. Koristi se i za analizu nehlapljivih i toplinski nestabilnih uzoraka koji se ne mogu analizirati plinskom kromatografijom. Kod HPLC-a stacionarna se faza sastoji od čvrstih čestica malog promjera koje su ravnomjerno raspodjeljene unutar kromatografske kolone. Mobilna faza je kapljevina kojom se otopljeni uzorak prenosi kroz kolonu. Razdvajanje komponenti uzoraka ovisi o fizikalno-kemijskim interakcijama uzorka s obe faze. Prema mehanizmu odjeljivanja razlikujemo adsorpcijsku, afinitetnu, ionsko-izmjenjivačku i kromatografiju isključenjem.<sup>[14,15]</sup>



Slika 4. HPLC uređaj <sup>[17]</sup>

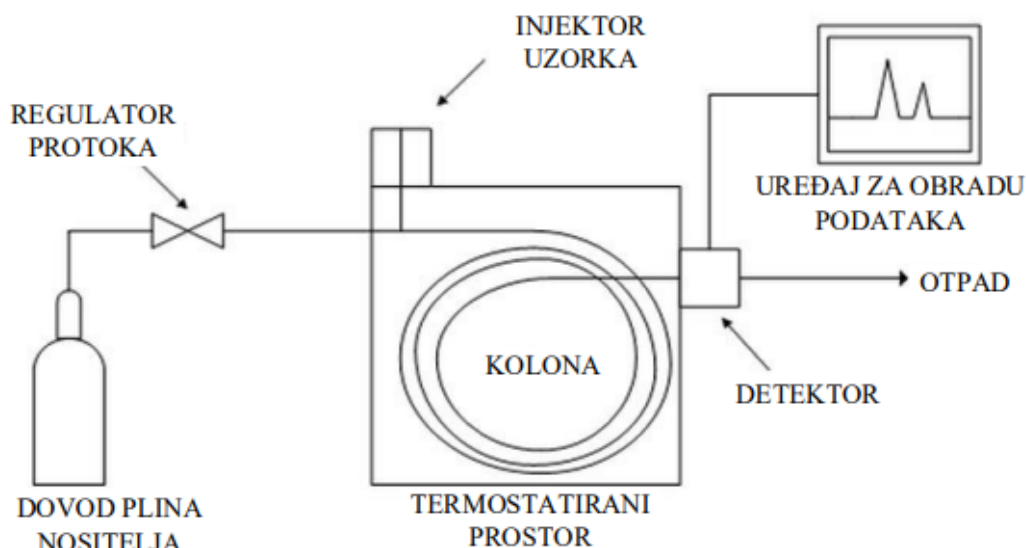
HPLC sustav sastoji se od četiri glavna dijela: sustava za opskrbu pokretnom fazom, kromatografske kolone u kojoj dolazi do razdvajanja komponenti, injektora za ubrizgavanje uzorka i detektora. Sustav za opskrbu pokretnom fazom sastoji se od crpke kojom se postižu

visoki tlakovi kako bi se podesile potrebne brzine protoka, tj. kako bi otapalo moglo proći kroz kolonu. Čelični ili stakleni spremnici ispunjeni su otapalom koje mora biti visoke čistoće i mjehurići plina moraju biti uklonjeni. Sustav za injektiranje omogućuje precizno injektiranje točno određenog volumena uzorka (0,5 µL do 50 mL). Kraća kolona (pretkolona) istog punila postavlja se u sustav prije kromatografske kolone kako bi se ona zaštitila. Suvremene HPLC kolone najčešće su izrađene od čeličnih cijevi, ali se uz niske tlakove upotrebljavaju i staklene cijevi debljih stijenki. Kolone punjene zrcima vrlo malih dimenzija imaju prednost zbog veće brzine procesa i manje potrošnje otapala. Kolone se izrađuju u različitim dimenzijama; duljina su 10-30 cm, a unutrašnji im promjer može biti 4-10 mm. Kolone su punjene poroznim punilima promjera 5-10 mikrometara. Kao punilo najčešće se koristi silikagel, ali mogu se upotrebljavati i punila koja sadrže glinicu, porozne polimere i ionske izmjenjivače.<sup>[14,15]</sup>

Detektori moraju pružati kvalitativan i kvantitativan signal. Za HPLC ne postoji univerzalni sustav detektora već se detektorski sustav odabire ovisno o prirodi uzorka. Najčešće se upotrebljavaju detektori temeljeni na apsorpciju ultraljubičastog (UV), infracrvenog (IR) ili vidljiva zračenja (VIS).<sup>[14,15]</sup>

### **3.1.3 PLINSKA KROMATOGRAFIJA**

Plinska kromatografija (GC, engl. *Gas Chromatography*) je tehnika odjeljivanja komponenata iz vrlo složenih smjesa pri kojoj se kao pokretna faza koristi inertni plin. Plin nosač eluira komponente analiziranog uzorka iz kolone ispunjene nepokretnom fazom. Nepokretna faza može biti čvrsta tvar velike specifične površine na kojoj se adsorbiraju komponente uzorka, kao što je to slučaj u plinskoj adsorpcijskoj kromatografiji, ili može biti nehlapljiva tekućina nanosena na površinu čvrstog nosača adsorpcijom ili kemijskim vezanjem. Za razliku od tekućinske, u plinskoj kromatografiji analit ne reagira s pokretnom fazom, stoga njegova brzina kretanja kroz kolonu ne ovisi o kemijskoj strukturi pokretne faze.<sup>[14,15]</sup>



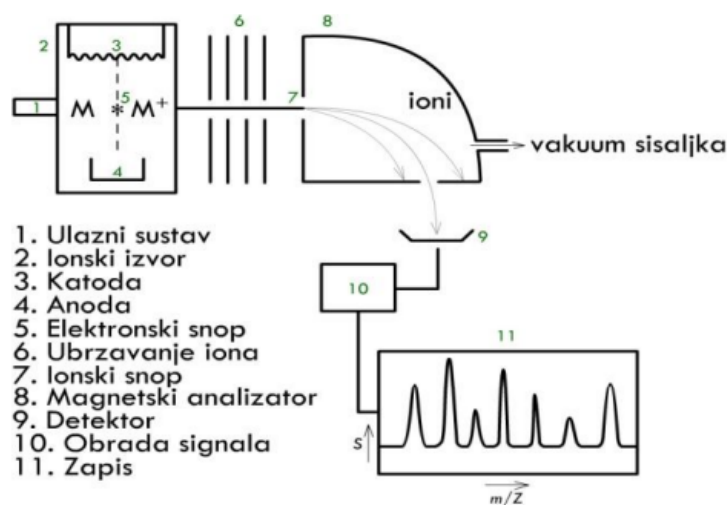
**Slika 5.** Plinski kromatograf <sup>[18]</sup>

Plin nosač, koji mora biti kemijski inertan prema punilu i komponentama uzorka, nosi uzorak kroz kolonu. Najčešće se koriste helij, argon, dušik i vodik, a odabir pogodnog nosača često ovisi o primjenjenom detektoru. Mala količina uzorka brzo se injektira se kroz gumenu pregradu (engl. *Septum*). Mjesto za injektiranje uzorka, kolona i detektor zagrijavaju se na temperature koje omogućuju plinovito stanje uzorka. Odjeljivanje na GC koloni odvija se raspodjelom komponenata u plinovitom stanju između pokretne i nepokretne faze. Kolone razlikuju se po duljini i promjeru, a mogu biti punjene ili kapilarne. Komponente uzorka koje eluiraju s kolone određuju se na detektoru i na temelju zapisa detektora moguće ih je kvalitativno i kvantitativno odrediti. Vrijeme analize plinskom kromatografijom je kratko u usporedbi s ostalim kromatografskim tehnikama jer se plin kao mobilna faza brzo kreće kroz kolonu. Plinska kromatografija široko se primjenjuje za za ispitivanje čistoće uzoraka, za odjeljivanje komponenti iz smjese, u preparativne svrhe, kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi. Prednosti plinske kromatografije pred HPLC-om su jednostavnija oprema, brža analiza, visoka učinkovitost separacije korištenjem kapilarnih kolona i lako povezivanje sa spektroskopijom masa.<sup>[14,15]</sup>



### 3.1.3.1 Maseni spektrometar

Maseni spektrometar sastoji se od sustava za uvođenje uzorka, izvora ionizacije, masenog analizatora i detektora povezanog sa sustavom za obradu podataka. GC radi pri vrlo visokim tlakovima dok MS radi pri vakuumu. Maseni analizator mora biti u vakuumu kako bi se smanjila interakcija iona u plinovitoj fazi s česticama zraka. Prvi dio procesa je ionizacija uzorka nekom od ionizacijskih tehnika: ionizacijom elektroraspršenjem (ESI, *eng. Electrospray Ionization*), kemijskom ionizacijom (CI, *engl. Chemical Ionization*), ionizacijom termoraspršenjem (TSI, *engl. Thermospray Ionization*) ili ionizacijom elektronskim udarom (EI, *engl. Electron Impact ionization*). Ionizacija elektronima uglavnom se koristi u kombinaciji s GC. Prilikom ionizacije, snop elektrona visoke energije prolazi kroz plinoviti uzorak pri čemu dolazi do ionizacije molekula i njihovog razbijanja u fragmente. Ioni se ubrzavaju prema masenom analizatoru u kojem se primjenom električnog i magnetskog polja postiže njihovo odjeljivanje na temelju omjera njihove mase i naboja ( $m/z$ ). Najčešće korišteni analizatori su: kvadrupolni analizator, magnetski sektorski analizator, ionska zamka te ionsko-ciklotronske rezonancije s Fourierovim transformacijama. Ioni zatim dolaze do detektora koji pretvara ione određene vrste u električni signal. Spektar masa se dobiva kao ovisnost električnog signala o omjeru  $m/z$ . Različite molekule identificiraju se upravo prema njihovom karakterističnom masenom spektru <sup>[19,20]</sup>



Slika 6. Maseni spektrometar <sup>[21]</sup>

## 3.2 VOLTAMETRIJA

Voltametrijia je skup elektroanalitičkih postupaka u kojima električni napon predstavlja signal pobude. Signal odziva je struja ćelije koja se mjeri kao funkcija narinutog napona. Otuda i naziv voltametrijia kao skraćenica za volt- amper- metrijia.<sup>[22]</sup> Princip voltametrijskih tehnika koje se često koriste je praćenje struje koja teče kroz elektrokemijsku ćeliju za vrijeme primjene potencijala na elektrodu, što rezultira oksidacijom i/ili redukcijom elektroaktivnih vrsta na površini elektrode. Ove strujno-naponske tehnike pokazuju osjetljivost sa širokim linearnim rasponom koncentracija ( $10^{-1}$  do  $10^{-12}$  M).<sup>[23]</sup>

Osnovne komponente voltametrijskog sustava su elektrokemijski članak, potencioat i računalo. Elektrokemijski članak uključuje tri elektrode uronjene u otopinu analita i ionskog elektrolita: radnu elektrodu, referentnu elektrodu i protuelektrodu. Potencijal se mjeri između radne i referentne elektrode a struja se mjeri između radne i protuelektrode. Voltamogramom prikazujemo ovisnost struje o potencijalu.<sup>[15]</sup>

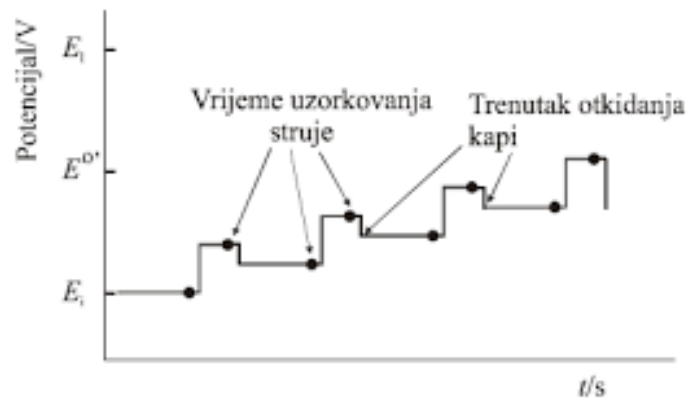
### 3.2.1 Primjena voltametrijskih metoda za analizu farmaceutski aktivnih tvari

Kvalitativna i kvantitativna analiza farmaceutski aktivnih tvari koja daje zadovoljavajuće rezultate ovisi o odabiru odgovarajuće tehnike. Matrica uzorka, fizikalno - kemijska svojstva, koncentracija analita, vrijeme analize i cijena najvažniji su čimbenici u određivanju najprikladnije tehnike. Sve veća upotreba antipsihotika potaknula je razvoj jednostavnih, osjetljivih, brzih i jeftinih metoda određivanja ovih lijekova u farmaceutskim oblicima i biološkim uzorcima. U posljednje vrijeme, sve se veća pozornost pridaje elektrokemijskim metodama koje pružaju visoku osjetljivost, selektivnost, točnost i preciznost kako bi se osiguralo učinkovito terapijsko praćenje antipsihotika u cilju smanjenja štetnih nuspojava. Glavno ograničenje ovih metoda jest činjenica da lijekovi koji se analiziraju moraju biti elektrokemijski aktivni. Ipak, ove se metode sve češće primjenjuju zbog jednostavnosti, mogućnosti analize obojenih i zamućenih otopina te relativno dostupne instrumentacije. Analiza fizikalnih i kemijskih svojstava farmaceutskih spojeva, kao i njihovo kvantitativno određivanje, može se lako provesti pomoću voltametrijskih tehnika kao što su voltametrijia linearne promjene potencijala (LSV, engl. *Linear Sweep Voltammetry*), diferencijalna pulsna

voltometrija (DPV, engl. *Differential Pulse Voltammetry*), ciklička voltometrija (CV, engl. *Cyclic Voltammetry*) i *stripping* voltometrija. Voltometrijske metode se također koriste za određivanje elektroaktivnih spojeva iz bioloških uzoraka (npr. urin, slina ili serum). Podaci o *in vivo* mehanizmima farmaceutski aktivnih tvari mogu se dobiti ispitivanjem elektrokemijskog ponašanja aktivnih tvari u lijekovima. Ciklička voltometrija korisna je voltometrijska metoda za dobivanje informacija o mehanizmu oksidacije/redukcije farmaceutskih spojeva. Rijetko se koristi za kvantitativno određivanje spojeva jer nije dovoljno osjetljiva metoda. S druge strane, DPV tehnika, zbog svoje osjetljivosti, široko se koristi za određivanje farmaceutskih spojeva bez potrebnog predtretiranja uzoraka. Primjerice, analiti u rasponu od  $10^{-3}$  do  $10^{-5}$  M mogu se odrediti pomoću cikličke voltetrije, dok tehnike diferencijalne pulsne i pravokutnovalne voltetrije daju granice dokazivanja oko  $10^{-8}$  M. *Stripping* voltetrija se općenito koristi kada DPV i SWV metode nisu dovoljno osjetljive za određivanje vrlo niskih koncentracija spojeva. *Stripping* tehnike uključuju korak predkoncentriranja neposredno prije analize. Ove tehnike osiguravaju visoku osjetljivost i niske granice dokazivanja (oko  $10^{-12}$  M i niže). Analiza lijekova *stripping* tehnikama ne utječe na pomoćne tvari u farmaceutskim oblicima doziranja niti na endogene tvari prisutne u biološkim tekućinama.<sup>[23]</sup> U radu ćemo se osvrnuti na najčešće korištene voltetrijske tehnike za analizu klozapina.

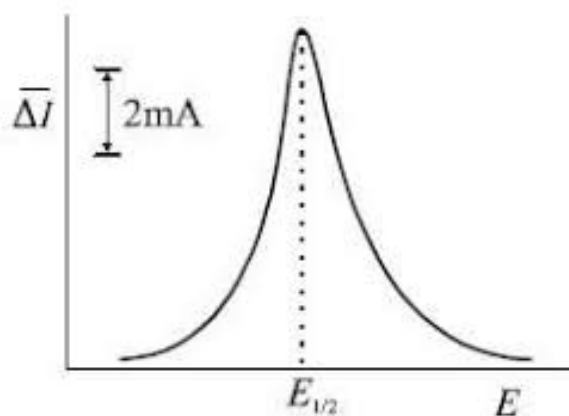
### 3.2.2 Diferencijalna pulsna voltetrija

Diferencijalna pulsna voltetrija pulsna je tehnika za određivanje vrlo niskih koncentracija elektroaktivnih komponenata u različitim uzorcima, a bitnu primjenu ima u određivanju spojeva u farmaceutskim pripravcima i biološkim tekućinama.<sup>[24]</sup> U diferencijalnoj pulsnoj voltetriji mali pravokutni naponski impuls (amplitude od 10 do 100 mV) superponira se na stubasto rastući napon pobude. Struja se mjeri prije primjene naponskog pulsa i na kraju pulsa i bilježi se razlika jakosti struja kao funkcija potencijala.<sup>[25]</sup> Na **Slici 7.** prikazan je signal pobude. Granica dokazivanja iznosi otprilike  $10^{-8}$  mol dm<sup>-3</sup> stoga je ova tehnika prikladna za analizu lijekova u biološkim tekućinama nakon terapijskih doza zbog dobre osjetljivosti.<sup>[24]</sup>



**Slika 7.** Signal pobude kod diferencijalne pulsne voltametrije<sup>[22]</sup>

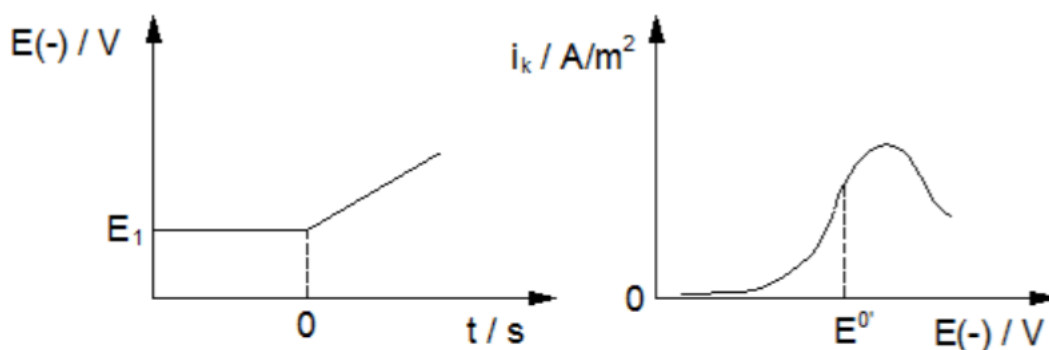
Potencijal radne elektrode tijekom mjerenja održava se na osnovnom potencijalu pri kojem je struja ćelije jednaka nuli. U određenom trenutku na osnovni napon se superponira pravokutni naponski impuls kojim se izaziva oksidacija ili redukcija. Struja se mjeri prije i poslije svakog naponskog impulsa, a signal odziva predstavlja razliku jakosti struje u ovisnosti o potencijalu elektrode.<sup>[24]</sup>



**Slika 8.** Diferencijalni pulsni voltamogram<sup>[22]</sup>

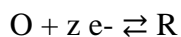
### 3.2.3 Voltometrija linearne promjene potencijala

Voltometrija s linearnom promijenom potencijala pripada skupini elektroanalitičkih tehnika u kojima je signal pobude električni napon. Signal odziva je struja koja se mjeri kao funkcija narinutog potencijala. U ovoj vrsti voltametrije, signal je linearno rastući napon. Struja se mjeri na radnoj elektrodi, dok potencijal između radne i referentne elektrode raste linearno s vremenom.



**Slika 9.** Signal pobude i odziva kod voltametrije s linearnom promijenom potencijala <sup>[25]</sup>

Pretpostavimo elektrodnu reakciju redukcije:

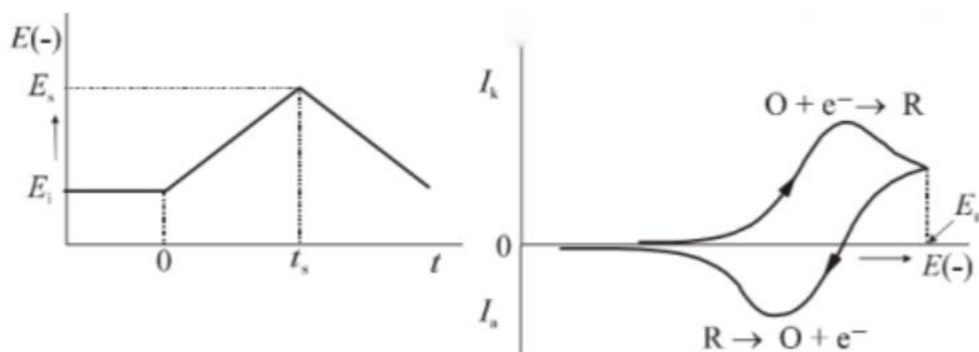


Pri potencijalu radne elektrode koji je znatno pozitivniji od formalnog potencijala redoks sustava elektroaktivne vrste ( $E^0$ ) kroz elektrokemijsku ćeliju prolazi samo osnovna struja. Brzina redukcije raste negativiranjem potencijala elektrode. Približavanjem vrijednosti formalnog potencijala elektroaktivne vrste, dolazi do značajnog povećanja brzine redukcije. Tada počinje teći mjerljiva struja ćelije i na voltamogramu nastaje uzlazni dio krivulje odziva. Koncentracija elektroreduktanda (O) se smanjuje zbog njegove redukcije uz površinu radne elektrode. Stoga se uz radnu elektrodu stvara određeni koncentracijski profil tvari O kao funkcija udaljenosti od površine radne elektrode. Zbog uspostavljene razlike u koncentraciji, dolazi do difuzije čestica O iz otopine prema površini elektrode. Istovremeno se na površini elektrode stvara reducirani oblik elektroaktivne tvari (R) zbog reakcije redukcije, koji zatim difundira s elektrode u otopinu. Time se uspostavlja koncentracijski profil reduciranog oblika elektroaktivne tvari (R) od površine elektrode prema unutrašnjosti

otopine. Kada potencijal dostigne dovoljno negativnu vrijednost, sve se čestice elektroreduktanda (O) na površini elektrode trenutačno reduciraju, a njihova koncentracija na elektrodama opada na nulu. Pri toj vrijednosti potencijala, dolazi do maksimalnog toka čestica elektroreduktanda iz otopine prema površini elektrode i postiže se maksimalna vrijednost struje odziva. Tijekom redukcije sve se više iscrpljuje tvar O iz otopine. Smanjuju se nagib koncentracijskog profila O i brzina difuzije. Postupno se kontinuirano smanjuje struja odziva zbog čega voltametrijski odziv ima oblik vrha.<sup>[25]</sup>

### **3.2.4 Ciklička voltametrija**

U cikličkoj voltametriji, potencijal radne elektrode mijenja se konstantnom brzinom i mjeri se protok struje u određenom vremenu. Kod CV signal pobude mijenja smjer. Napon signala pobude pri početku mjerenja se negativira, a zatim se kod određene vrijednosti potencijala započinje pozitivirati. Promjene potencijala (posmik) u oba smjera su linearne. Kod polaznog posmika potencijala struja ćelije je katodna struja redukcije i ima isti oblik kao i u LSV metodi. Pri početku promjene smjera signala pobude, nastavlja se redukcija tvari O u R jer je potencijal elektrode i dalje negativniji od formalnog potencijala. Daljnim pozitiviranjem, potencijal elektrode približava se vrijednosti formalnog elektrodnog potencijala redoks sustava elektroaktivne vrste. Tada započinje reakcija oksidacije reduciranog oblika R i pojavljuje se anodna, tj. struja oksidacije. Struja ćelije sada je razlika struje redukcije elektroreduktanda O (katodne struje) i struje oksidacije elektrooksidanda R (anodne struje). Struja ćelije predstavlja razliku katodne i anodne struje procesa na radnoj elektrodi. Pozitiviranjem, raste struja oksidacije a opada struja redukcije čime struja ćelije postaje anodna (negativna). Pri određenom potencijalu, anodna struja postiže maksimalnu vrijednost. Ako se pozitiviranje elektrode nastavi, struja oksidacije stalno pada jer se iscrpljuje otopina uz površinu elektrode na reduciranoj vrsti sustava (R), a nakon nekog vremena struja ćelije pada na vrijednost osnovne struje. Grafički prikaz odziva cikličke voltametrije nazivamo ciklički voltammogram koji ima karakteristični oblik s katodnim i anodnim pikom.<sup>[25]</sup>



Slika 10. Signal pobude i signal odziva kod cikličke voltametrije [25]

### 3.2.5 Metode otapanja - *Stripping* analiza

Metode otapanja obuhvaćaju različite elektrokemijske postupke kod kojih se analit najprije istaloži na mikroelektrodi, najčešće iz otopine koja se miješa. Nakon određenog vremena, elektroliza se zaustavlja, miješanje se prekida, a istaloženi analit se određuje pomoću jedne od prethodno opisanih voltametrijskih metoda. Drugi stupanj *stripping* analize obuhvaća ponovno otapanje analita ili njegovo skidanje (engl. *stripping*) s mikroelektrode.<sup>[15]</sup> Razlikujemo anodnu, katodnu i adsorpcijsku *stripping* analizu. Kod anodnog otapanja mikroelektroda se tijekom taloženja ponaša kao katoda, a tijekom otapanja analita kao anoda, pri čemu istodobno analit oksidira u prvotni oblik. Ponašanje mikroelektrode kod katodnog otapanja je obrnuto. Analit se taloženjem elektrokemijski pretkoncentrira zbog čega je njegova koncentracija mnogo veća nego u samoj otopini. Adsorpcijska *stripping* voltametrija slična je anodnoj i katodnoj metodi, osim što korak pretkoncentracije analita nije kontroliran elektrolizom već se postiže adsorpcijom na površini radne elektrode ili reakcijama s kemijski modificiranim elektrodama.<sup>[26]</sup> Postupci otapanja osobito su važni pri analizi tragova jer pretkoncentracija omogućuje određivanje vrlo malih količina analita. Ovi su postupci brzi i jednostavni, te se mogu koristiti za analiziranje otopina koncentracije  $10^{-6}$  do  $10^{-9}$  M. Tijekom elektrotaloženja samo se dio analita istaloži na elektrodi, stoga kvantitativni rezultati ovise o potencijalu i veličini elektrode, vremenu taloženja te brzini miješanja uzorka.<sup>[15]</sup>

### 3.2.6 Čvrste elektrode

Čvrste elektrode često se koriste kao radne elektrode. Njihove prednosti su: mehanička stabilnost, tvrdoća, jednostavna uporaba, mogućnost primjene u širokom rasponu potencijala, visoka električna vodljivost i niska toksičnost. Čvrste elektrode mogu biti metalne elektrode izrađene od metala kao što su Pt, Au i Pd, elektrode na bazi ugljika, ionsko-selektivne elektrode i modificirane elektrode. Postupci u elektroanalizi ovise o kemijskim i fizičkim svojstvima površina elektroda, djelovanju primjenjenog potencijala, adsorpciji i premazima nanesenih na površinu elektroda radi poboljšanja detekcije.<sup>[27]</sup> Elektrokatalitička svojstva čvrstih elektroda mogu se poboljšati promjenom kemijskih i elektrokemijskih svojstava njihovih površina. Modificiranjem elektroda postižu se svojstva koja omogućuju brži prijenos naboja. Za pripremu modificiranih elektroda može se koristiti nekoliko različitih tehnika, kao što su derivatizacija, oblaganje polimerom i elektrostatičko vezivanje.<sup>[23]</sup> Živine elektrode imaju prednost što se mogu koristiti u širokom rasponu katodnih potencijala. Međutim, kapacitet njihovog anodnog raspona ograničen je zbog osjetljivosti žive na oksidaciju. Ovaj je problem prevladan otkrićem drugih materijala elektroda, osobito na bazi ugljika, koje se mogu primjenjivati u širem anodnom rasponu.<sup>[27]</sup>

#### 3.2.5.1 Ugljikove elektrode

Elektrode na bazi ugljika mogu se podijeliti u dvije skupine, homogene i heterogene elektrode. Elektrode na bazi ugljika između ostalog koriste se za određivanje farmaceutskih spojeva u različitim oblicima doziranja ili u biološkim medijima primjenom različitih elektrokemijskih tehnika.<sup>[27]</sup>

Šesteročlani aromatski prsten i  $sp^2$  hibridizacija karakteristike su ugljikovih elektroda. U ovoj konfiguraciji, visok stupanj delokalizacije  $\pi$  elektrona zajedno sa slabim Van der Waalsovima osigurava dobru električnu provodljivost.<sup>[27,28]</sup> Učinkovitost analize ovisi o vrsti ugljika, ali i o metodi prethodne obrade površine korištene elektrode za povećanje brzine prijenosa elektrona.

Ugljikove elektrode imaju nekoliko prednosti pred ostalim čvrstim elektrodama. Ugljikovi materijali u obliku grafita, staklastog ugljika, dijamanta, fulerena, ugljikovih vlakana, nanocijevi i drugih, igraju važnu ulogu u razvoju čvrstih elektroda iz nekoliko razloga. Elektrode na bazi ugljika imaju širok raspon potencijala, osobito anodnog, kemijski bogatu



površinu, kemijski su inertne, pokazuju znatno niže pozadinske struje i prikladne su za različite modifikacije. S druge strane, prijenos elektrona brži je na elektrodama od plemenitih materijala nego na ugljikovim elektrodama.<sup>[27]</sup>

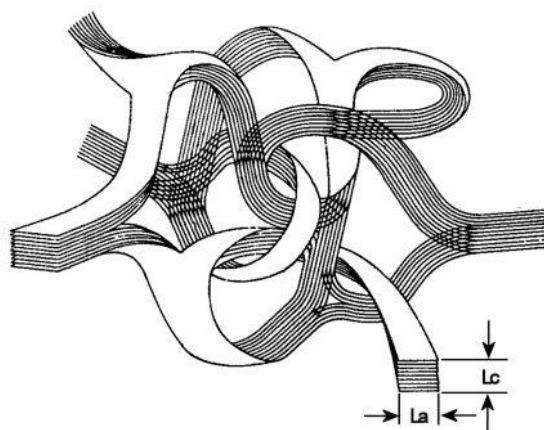
Elektroanalitičke tehnike koje koriste elektrode na bazi ugljika također se koriste za određivanje spojeva prisutnih u lijekovima.

Najpoznatije elektrode na bazi ugljika uključuju:

- Staklasti ugljik,
- Ugljиковu pastu,
- Ugljikova vlakna,
- Ugljikove nanocijevi,
- Dijamantne elektrode i
- Fuleren elektrode.

#### 3.2.5.1.1 Elektrode od staklastog ugljika

Staklasti ugljik je strukturni oblik ugljika koji sadrži staklena i keramička svojstva. Najvažnija svojstva su otpornost na visoke temperature, iznimna tvrdoća, niska gustoća, nizak električni otpor, malo trenje, niska toplinska otpornost i fluidna nepropusnost.<sup>[28]</sup> Staklasti ugljik široko se koristi kao elektrodni materijal u elektrokemiji.



Slika 11. Struktura staklastog ugljika <sup>[29]</sup>

Elektroda od staklastog ugljika (GCE, engl. *Glassy Carbon Electrode*) je jedna od najkorištenijih elektroda u elektroanalitičkim istraživanjima zbog fizikalnih i kemijskih svojstava kao što su širok raspon potencijala, kemijski inertna priroda, otpornost na kiselu koroziju, izuzetno niska poroznost i relativno reproducibilni rezultati. Priprema se kontroliranim nizom toplinskih obrada polimerne smole u inertoj atmosferi. Proces karbonizacije provodi se sporo, postepenim povećavanjem temperature od 300 do 1200 °C kako bi iz strukture uklonili kisik, dušik i vodik. Dobiveni materijal je velike gustoće i malih pora pa postupak impregnacije nije potreban. Mrežasti staklasti ugljik strukture saća, kemijski je sličan konvencionalnom staklenom ugljiku. Ima nisku gustoću, visoku otpornost na koroziju, veliku relativnu površinu, visoku toplinsku i električnu vodljivost. Karakterizira ga iznimna kemijska inertnost u velikom temperaturnom rasponu. Također je inertan prema velikom broju vrlo aktivnih reagensa kao što su kiseline, baze i organska otapala. Dobiva se polimerizacijom smole u kombinaciji s sredstvima za pjenjenje, nakon čega slijedi karbonizacija. Mrežaste staklaste ugljikove elektrode mogu se modificirati metalnim i vodljivim organskim premazima te impregnacijom organskih, anorganskih i biokemijskih vrsta. Gotovo sve staklaste ugljikove elektrode obično se poliraju manjim česticama aluminijevog oksida (glinice) na tankoj tkanini za poliranje. Poliranjem se postiže aktivacija, veća brzina prijenosa elektrona i uklanjanje površinskih onečišćenja. Učinkovitost staklaste ugljikove elektrode ovisi o materijalu za poliranje i postupku koji se koristi. Površinu elektrode moguće je obraditi i toplinskom obradom za povećanje brzine prijenosa elektrona i adsorpcije, elektrokemijski i laserski.<sup>[27]</sup>

U posljednjih nekoliko godina pojavile su se različite vrste elektroda na bazi ugljika, koje su značajno promijenile opseg i osjetljivost elektroanalitičkih metoda. Pokazalo se da ove elektrode posjeduju jedinstvene kemijske i strukturne značajke koje ih čine vrlo korisnima za elektrokemijska istraživanja i elektroanalitičku primjenu. Elektrode na bazi ugljika mogu se primijeniti i dati rezultate usporedive s onima dobivenim skupljim, vremenski zahtjevnijim laboratorijskim tehnikama.

### 3.3 IMUNOLOŠKI TEST - BUDUĆNOST DIJAGNOSTIKE

Imunološki testovi (engl. *Immunoassay*) su bioanalitičke metode u kojima određivanje analita ovisi o reakciji antigena (analita) i antitijela. Te se metode uglavnom temelje na kompetitivnoj reakciji vezanja između stalne količine obilježenog oblika analita i promjenjive količine neoznačenog uzorka analita za ograničenu količinu vezivnih mjesta na visokospecifičnom protu-analitnom antitijelu. Kad se ti imunoanalitički reagensi pomiješaju i inkubiraju, analit se veže na antitijelo tvoreći imunološki kompleks. Ovaj kompleks je odvojen od nevezane frakcije reagensa tehnikom fizikalnog ili kemijskog odjeljivanja.<sup>[30]</sup>

Imunološki testovi koriste različite oznake za omogućavanje otkrivanja antitijela i antigena. Oznake su tipično kemijski povezane ili konjugirane sa željenim antitijelom ili antigenom. Ovisno koja oznaka se koristi postoje različiti tipovi imunoloških testova, a među njima se ističu enzimski povezani imunosorbentni test i radioimunološki test.<sup>[31]</sup>

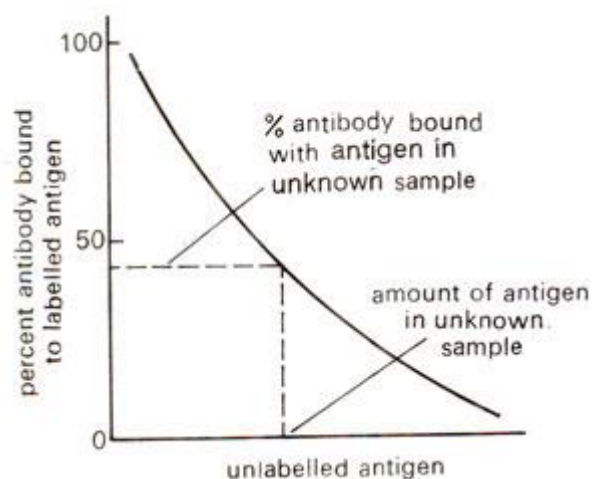
#### 3.3.1 Enzimski povezani imunosorbentni test

Enzimski povezani imunosorbentni test, (ELISA engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), tip je imunološkog testa koji upotrebljava enzime kao oznake željenih antigena. U prvom koraku protutijelo se veže za čvrstu fazu. Zatim se dodaju uzorci koji sadrže antigen nepoznate koncentracije koji će se vezati za protutijela. Nakon ispiranja ponovno se dodaju protutijela specifična za antigen koja su ovaj put konjugirana s enzimom. Dodatkom supstrata u otopinu nastaje obojani produkt. Naime, kada se enzim konjugiran antitijelom veže za antigen, njegova se aktivnost smanjuje. Mjerenjem apsorbancije mjeri se količina obojanog produkta čija je koncentracija obrnuto proporcionalna koncentraciji antigena uzorka.<sup>[32]</sup>

#### 3.3.2 Radioimunološki test

Radioimunološki test, (RIA, engl. *Radioimmunoassay*), tip je imunološkog testa koji upotrebljava radioizotope kao oznake željenih antigena. U prvom koraku radioimunološkog testa inkubiramo antitijelo i radioizotopom označen antigen što dovodi do stvaranja antigen - antitijelo imunokompleksa, a višak nevezanog antigena odstranjuje se ispiranjem. U sljedećem koraku dodaje se neoznačeni antigen poznate koncentracije koji se zatim natječe sa označenim antigenom za vezna mjesta na protutijelima, te se ponavlja ispiranje kako bi se odstranili sada slobodni radioizotopom označeni antigeni. Izmjerena radioaktivnost obrnuto

je proporcionalna količini neoznačenog antigena. Mjerenjem radioaktivnosti prije i nakon dodavanja neoznačenog antigena može se napraviti standardna krivulja ovisnosti radioaktivnosti o koncentraciji neoznačenog antigena. U zadnjem koraku proces se ponavlja s uzorkom koji sadržava neoznačen antigen nepoznate koncentracije. Uz pomoć izmjerene radioaktivnosti može se iz grafa očitati koncentracija antigena uzorka.<sup>[33]</sup>



**Slika 12.** Standardna krivulja koja se koristi u radioimunološkom testu za kvantitativnu procjenu antigena u nepoznatom uzorku <sup>[34]</sup>

Imunološke metode široko su korištene u mnogim važnim područjima farmaceutske analize, poput dijagnosticiranja bolesti, terapijskog praćenja lijekova, kliničkih farmakokinetičkih studija za određivanje lijekova i farmaceutskoj industriji. Analiza u tim područjima obično uključuje mjerenje vrlo niskih koncentracija lijekova male molekulske mase, makromolekularnih biomolekula od farmaceutskog interesa, metabolita i/ili biomarkera koji ukazuju na dijagnozu bolesti ili prognozu. Važnost i raširenost metoda imunološkog ispitivanja u farmaceutskim analizama pripisuju se njihovoj specifičnosti, velikoj propusnosti i visokoj osjetljivosti za analizu širokog raspona analita u biološkim uzorcima. Sustav detekcije u imunotestovima ovisi o lako uočljivim oznakama (npr. radioizotopima ili enzimima) povezanim s jednim od imunoanalitičkih reagensa (tj. analitom ili antitijelom). Korištenje ovih oznaka u imunotestovima rezultira metodama ispitivanja s iznimno visokom osjetljivošću i niskim granicama određivanja. Analiza složenih bioloških matrica (npr. krvi

ili urina) imunološkim metodama, temeljena na specifičnoj reakciji vezanja, može se postići bez prethodne obrade uzorka. Iako razvoj nove metode imunološkog testa za analit može potrajati mjesecima (zbog vremena potrebnog za stvaranje željenog antitijela), nakon što odgovarajući imunoanalitički reagensi postanu dostupni, metoda imunološkog testa može vremenski konkurirati kromatografskim metodama. Unatoč brojnim prednostima imunoloških testova, oni i dalje imaju svoja ograničenja. Imunološki testovi uglavnom ovise o reakciji između analita i biološkog antitijela, mogu imati inherentniju nepreciznost od drugih metoda korištenih u farmaceutskoj analizi (npr. kromatografija). Specifičnost imunotestova uglavnom ovisi o protutijelu usmjerenom na analit, međutim neki imunološki testovi nisu visoko selektivni i mogu reagirati na skupinu spojeva (npr. aminoglikozide, pesticide, itd.), a ne na pojedinačne spojeve. Štoviše, može se uočiti nedostatak specifičnosti zbog nespecifičnog vezanja antitijela na komponentu matrice. U tim okolnostima mora se voditi računa o tome da se u uzorku i/ili matrici analita osigura da nema ometajuće tvari.<sup>[30]</sup>

#### **4. PREGLED PRIMJENE ODABRANIH METODA ZA ANALIZU KLOZAPINA**

#### 4.1 GC-MS METODA ZA ISTOVREMENO ODREĐIVANJE KLOZAPINA I NORKLOZAPINA U LJUDSKOJ PLAZMI

Vardakou i sur.<sup>[35]</sup> razvili su i optimizirali osjetljivu i specifičnu GC-MS metodu za određivanje klopazina i njegovog glavnog metabolita norklopazina u ljudskoj plazmi koja pokriva sve terapijske i toksične razine. Objavljena su brojna istraživanja o korištenju LC-MS metoda za određivanje klopazina. U usporedbi s njima, GC-MS metoda pruža veće prednosti u pogledu identifikacije i osjetljivosti unatoč tome što je ova metoda vremenski zahtjevnija.

Vardakou je koristio GC-MS metodu za analizu klopazina i norklopazina u uzorcima plazme. Analiza ekstrakata provodila se na Hewlett Packard plinskom kromatografskom sustavu opremljenim HP-5MS kolonom s detektorom HP 5970 MSD. Kao mobilna faza korišten je helij. Ubrizgavanje je provedeno u „*splittles mode*“ pomoću HP AOC sustava za automatsko uzorkovanje. Detektor je bio maseni spektrometar s EI ionizacijom. Korišteni digitalni pH-metar bio je 691 digitalni pH-metar sa staklenom kombiniranom elektrodom. Temperaturni program kolone, brzina protoka plina nosača i temperature injektora optimizirani su, kako bi se povećao intenzitet signala odabranih iona, postigao dovoljan faktor asimetrije i razlučivost između analita, te kako bi se smanjio efekt matrice.

Priprema uzoraka uključuje ekstrakciju čvrsto-tekuće obaju analita pomoću Bond-Elut Certify kolona i daljnu derivatizaciju s trifluoroocetenim anhidridom (TFAA, engl. *Trifluoroacetic anhydride*). Kao unutarnji standard korišten je klopazin-d8. Tijekom optimizacije postupka ekstrakcije ispitana je djelotvornost različitih kolona sa sličnim afinitetom za oba analita (BondElut Certify, Nexus, HCX, C18 i MCX) od kojih su najbolji rezultati dobiveni BondElut Certify kolonama. Iako su postignuti zadovoljavajući rezultati ekstrakcije, dodatni postupak precipitacije proteina ispitan je prije ekstrakcije korištenjem različitih organskih otapala kao što su acetonitril, metanol i aceton u uzorcima plazme s dodanim standardom.

Postupak derivatizacije, prije kromatografske analize, može se koristiti za dobivanje hlapljivih derivata nehlapljivih tvari pogodnih za separaciju plinskom kromatografijom. Zbog polarnih N-H skupina klopazina i njegovog metabolita norklopazina, prije GC-MS

analize bilo je potrebno provesti postupak derivatizacije kako bi se proizvele manje polarne, a time i hlapljivije molekule pogodne za odjeljivanje plinskim kromatografskim sustavom. Polarne N-H skupine klopazina i njegovog metabolita norklopazina rezultiraju nehlapljivim spojevima. U usporedbi s ostalim reagensima za derivatizaciju, TFAA se pokazao kao najprikladniji zbog manje veličine, a time i manje sterokemijske blokade, veće stabilnosti i manje osjetljivosti na vlagu.

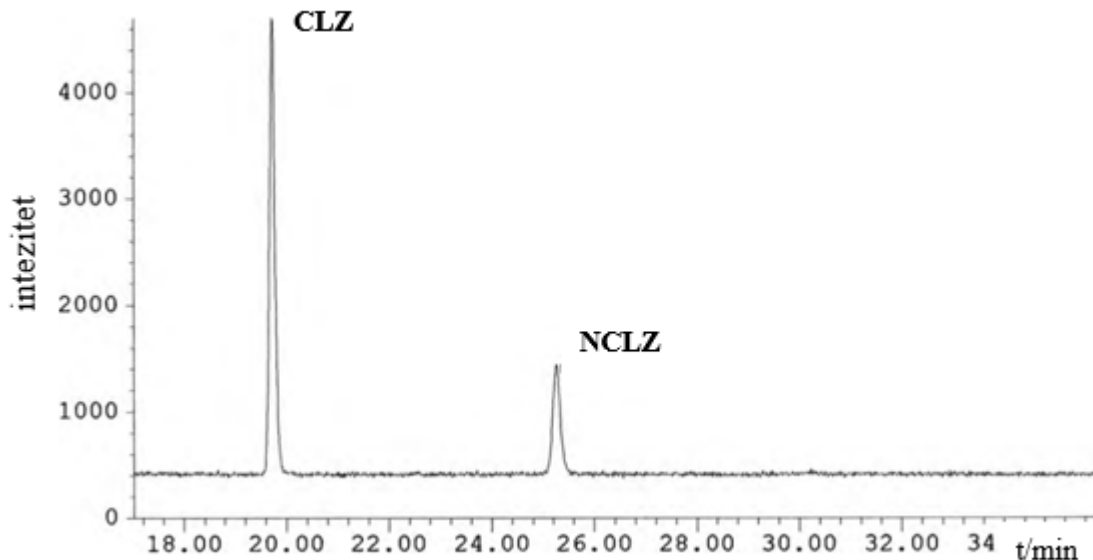
Granice dokazivanja bile su 0,45 ng/mL za CLZ i 1,59 ng/mL za NCLZ, dok su granice određivanja bile 1,37 ng/mL za CLZ i 4,8 ng/mL za NCLZ, kako je bilo izračunato krivuljama umjeravanja. Krivulje su bile linearne do 600 ng/mL za CLZ i NCLZ. Apsolutni oporavak kretao se od 82,22% do 95,35% za oba analita. Razdjeljivanje analita i unutarnjeg standarda postiglo se unutar 26 minuta, a ukupno vrijeme kromatografske analize bilo je oko 35 minuta. Ukupno vrijeme zadržavanja klopazina i norklopazina iznosili su 19,5 i 25,4 minute.

#### **4.1.1 Primjena opisane metode u analizi uzoraka plazme psihijatrijskih pacijenata**

Predložena metoda primijenjena je na uzorcima plazme psihijatrijskih pacijenata. Prije ove metode, doza za pacijente prilagođena je s obzirom na njihov klinički ishod.

Uzorci plazme sedam psihijatrijskih pacijenata nakon centrifugiranja krvi analizirani su prema opisanoj metodi. Svi su bolesnici bili na dugotrajnom liječenju klopazinom, pa su se očekivale stabilne (ravnotežne) razine klopazina i norklopazina u plazmi. Pet pacijenata je doista bilo u rasponu koncentracija između 400 i 600 ng/mL. Rezultati jednog pacijenta pokazivali su koncentraciju klopazina od 691,5 ng/mL stoga je bila potrebna prilagodba doze kako bi se spriječile nuspojave. S druge strane, rezultati drugog pacijenta pokazivali su koncentraciju klopazina ispod dopuštenog terapijskog raspona (169,68 ng/mL) čime su došli do zaključka da je pacijent bio tretiran preniskom dozom što je dovelo do neuspješnog liječenja. Uzorci svih pacijenata pohranjeni su na -20° C i analizirani drugi put nakon tri mjeseca. Dobiveni rezultati bili su vrlo slični prvim mjerenjima koja su ukazivala na stabilnost uzoraka. Reprezentativni kromatogram dobiven iz kliničkog uzorka plazme psihijatrijskog pacijenta prikazan je na **Slici 13**.





**Slika 13.** SIM kromatogram uzorka plazme pacijenta s stabilnom koncentracijom klozapina [35]

Dobiveni podaci omogućuju dovoljnu kvantifikaciju klozapina i norklozapina u svih pacijenata koji su podvrgnuti terapiji klozapinom na dulji period kako bi se prevenirale neželjene reakcije i neuspjeh liječenja.

Usporedbom prethodno istraživanih i primjenjivanih HPLC-UV/Vis metoda, LC-MS ili LC-MS/MS metoda i GC-MS metoda, ovo je prva validirana GC/MS metoda koju karakterizira uporaba cjenovno dostupnih instrumenata u usporedbi s LC-MS/MS. GC u kombinaciji s MS -om najčešća je analitička tehnika koju koriste toksikološki laboratoriji i dostupna je u cijelom svijetu. Osim toga, kromatografsko odvajanje omogućuje analizu obaju analita u relativno kratkom vremenu što je važno za rutinsku analizu. Rezultati dobiveni ovom metodom pokazuju očekivani raspon koncentracija analiziranog antipsihotika.

## **4.2 OPTIMIZACIJA I VREDNOVANJE HPLC-UV METODE ZA ANALIZU KLOZAPINA I NJEGOVIH METABOLITA U LJUDSKOJ PLAZMI**

Tekuće kromatografske metode značajno se ističu među ostalim metodama za određivanje i praćenje klozapina i njegovih metabolita. Prijavljena su brojna istraživanja o HPLC-UV metodama. Ova se metoda pokazala vrlo učinkovitom za izvođenje istovremene separacije, određivanja i kliničkog praćenja klozapina i njegovih metabolita.

Dural i sur.<sup>[36]</sup> razvili su jednostavnu i pouzdanu HPLC metodu za analizu klozapina. Cilj rada bio je optimizirati analitičke uvijete modificiranjem parametara korištenih u prethodno predloženim metodama te razviti i vrednovati precizniju i točniju metodu za određivanje klozapina i njegova dva glavna metabolita u ljudskoj plazmi.

Odvajanje i određivanje izvedeni su HP Agilent 1100 HPLC sustavom opremljenim s UV detektorom. Optimalni analitički uvijeti postavljeni su nakon odabira najpogodnije kolone, mobilne faze i valne duljine. Analiza je provedena sustavom koji se sastoji od izokratne crpke, ručnog injektora volumena 20  $\mu\text{L}$  i C18 kolone promjera 3,5  $\mu\text{m}$ . UV detektor podešen je na 220 nm. Mobilna faza, sastavljena od acetonitrila i fosfatnog pufera pri pH=4,5, koja sadrži 0,3 % trietilamin, filtrirana je kroz membranu i otplinjena u ultrazvučnoj kupelji 30 minuta. Izokratna elucija izvedena je pri protoku od 1,0 mL/min i na sobnoj temperaturi.

Uzorci krvi podvrgnuti su centrifugiranju (3000 o/min) kako bi se odvojila plazma. Prije provođenja analize, svi uzorci plazme i radnih otopina bili su pohranjeni na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Svaka je otopina ispitivana na stupanj čistoće i stabilnost prije i nakon injektiranja u kromatografski sustav. Radni standardi CLZ, NCLZ i CLZNO pripremali su se svaki tjedan i korišteni su kao dodatak slijepim probama plazme.

Korištena je metoda ekstrakcije tekuće-tekuće. Ekstrakcija je izvedena dvaput, smjesom etilacetata, n-heksana i izopropilalkohola. Prije otapanja u mobilnoj fazi i injektiranja u sustav, analite se osušilo korištenjem dušika.

### 4.2.1 Optimizacija metode

Optimizacija HPLC-UV metode provodila se na razini triju parametara: kolone, mobilne faze i valne duljine. Kako bi se poboljšalo odvajanje, razlučivost i postiglo smanjeno ukupno vrijeme zadržavanja, ispitivane su razne kolone. Najučinkovitijom se pokazala C18 kolona obrnute faze duljine 150 mm. Također su ispitivane mobilne faze različitog omjera acetonitrila, metanola i fosfatnog pufera.

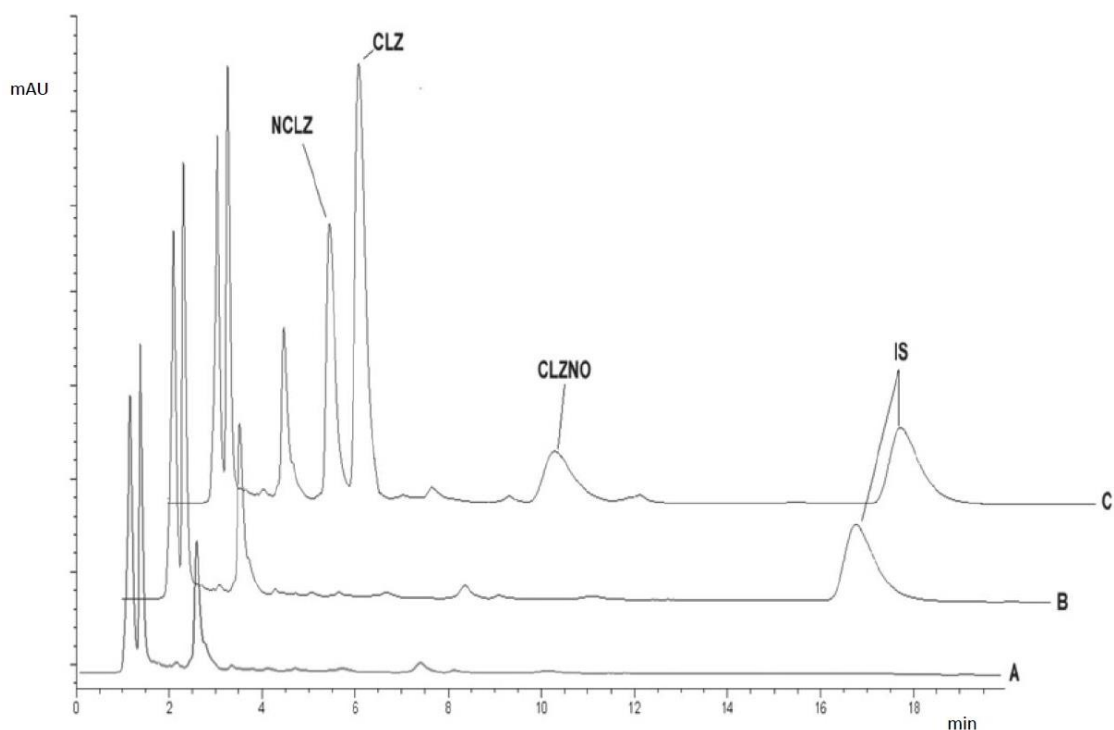
Analit u izokratnoj eluciji kontrolira se promjenjivim sastavom mobilne faze. Jakost otapala (postotak sadržaja organskog otapala) u mobilnoj fazi kontrolira vrijeme zadržavanja analita, a organsko otapalo može imati značajan učinak na selektivnost. Pozornost su usmjerili na utjecaj omjera acetonitrila i metanola te na organsko otapalo. Optimalni kromatografski uvjeti, manje ukupno vrijeme zadržavanja i veća površina vrha (pika), postignuti su mobilnom fazom koja sadrži najveći postotak acetonitrila kao jakog organskog otapala u eluiranju ispitivanog analita. Kod korištenja UV-detektora idealno je da spoj apsorbira svjetlost na jedinstvenoj valnoj duljini koja je poznata kao lambda maksimum ( $\lambda_{max}$ ). Međutim,  $\lambda_{max}$  može varirati ovisno o otapanju analita na što može utjecati vrsta, sadržaj ili pH vrijednost korištenog otapala. Stoga se određivanje izvodilo pri različitim valnim duljinama u rasponu od 220 nm do 280 nm. UV određivanje pri 220 nm pokazuje najbolji odziv na klopazin i njegova dva metabolita. Odgovarajući parametri odvajanja i određivanja postavljeni su prema podacima dobivenim postupkom optimizacije.

### 4.2.2 Vrednovanje metode

Vrednovanje analitičke metode prvi je korak nakon razvijanja metode. Vrednovanje metode jest postupak utvrđivanja da je metoda prikladna za korištenje u određenu svrhu.<sup>[37]</sup> Analitička metoda je vrednovana kako bi se utvrdila selektivnost, specifičnost, linearnost, granica dokazivanja (LLOD, engl. *Lower Limit Of Detection*) i granica određivanja (LOQ, engl. *Limit Of Quantitation*). Granica dokazivanja je najmanja količina analita u uzorku koju je moguće dokazati primjenjenom metodom, ali ne nužno i kvantitativno odrediti. Granica određivanja je najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantitativno odrediti uz zadovoljavajuću preciznost i točnost.<sup>[37]</sup>

Selektivnom metodom možemo odrediti i razlikovati željeni analit od ostalih komponenti prisutnih u smjesi ili matrici.

UV određivanje izvedeno je pri valnoj duljini od 220 nm s optimalnom osjetljivošću. Metoda je pokazala izvrsnu specifičnost bez endogenih smetnji u vrijeme zadržavanja CLZ, NCLZ, CLZNO i internog standarda (4,1, 3,5, 8,3 i 15,8 min.). **Slika 14** prikazuje kromatograme slijepe probe i obogaćenih uzoraka: kromatogram slijepe probe plazme (A), kromatogram plazme obogaćene internim standardom, klorpromazinom (B), kromatogram plazme obogaćene s 3 mg/L internog standarda, 600 µg/L NCLZ, 1000 µg/L CLZ i 750 µg/L CLZNO.



**Slika 14.** Prikaz preklapljenih kromatograma slijepe probe i obogaćenih uzoraka <sup>[36]</sup>

Metoda je bila specifična i osjetljiva s granicom dokazivanja od 23,6 µg/L, 19,3 µg/L i 23,6 µg/L za klozapin, norklozapin i klozapin N-oksidi. Analitički povrat (engl. *Recovery*) ekstrakcije iznosio je više od 80% za klozapin i njegove metabolite.

|       | Extraction<br>Recovery<br>(%) | LLOD<br>(µg/L) | LOQ<br>(µg/L) |
|-------|-------------------------------|----------------|---------------|
| CLZ   | 82.77                         | 23.6           | 71.52         |
| NCLZ  | 80.75                         | 19.3           | 58.51         |
| CLZNO | 80.19                         | 23.57          | 71.43         |

**Slika 15.** Prikaz tablice rezultata ekstrakcijskog povrata, donjih granica dokazivanja (LLOD) i granica određivanja za klozapin i njegove metabolite <sup>[36]</sup>

Postupak sljedne HPLC metode i jednostavne ekstrakcije pokazao je selektivno kromatografsko odvajanje, dobro iskorištenje te UV određivanje s povećanom osjetljivošću i točnošću određivanja klozapina i njegovih metabolita. Za postizanje kvalitetnog razdjeljivanja analita u kratkom vremenu analize, prilagođeni su različiti kromatografski parametri: optimiziran je sastav mobilne faze i pH vrijednost. Kao mobilna faza korišten je fosfatni pufer podešen na niski pH i koji je sadržavao acetonitril kao organski modifikator. Razdvajanje triju analita i internog standarda postignuto je za manje od 20 minuta. Metoda je vrednovana u smislu reproducibilnosti, osjetljivosti, točnosti i preciznosti čime je utvrđeno da je predložena HPLC-UV metoda vrlo učinkovita i prikladna za terapijsko praćenje shizofrenih bolesnika tretiranih klozapinom, ali i za rutinsko praćenje u toksikološke i analitičke svrhe u klinikama za psihijatriju i drugdje.

### 4.3 USPOREDBA IMUNOTESTA I LC-MS/MS METODE ZA TERAPEUTSKO PRAĆENJE KLOZAPINA

Određivanje razine klopapina često se provodi tekućinskom kromatografijom spregnute s masenom spektrometrijom ili visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom spregnutom s ultraljubičastim detektorom. S obzirom da se uzorci krvi prvo moraju odnijeti do laboratorija za analizu, ona se provodi u “*off-line modu*”. S druge strane imunološki test se može provoditi na licu mjesta. Američka uprava za hranu i lijekove odobrila je imunološki test koji se koristi za mjerenje razine klopapina u serumu. Ovaj imunološki test homogen je test aglutinacije nanočestica s 2 reagensa koji može odrediti razinu klopapina u ljudskom serumu. Mjerenja provode klinički analitičari koji spektrofotometrijski detektiraju promjene apsorbancije, koje odražavaju stvaranje koncentracijski ovisnog agregata putem lijeka i konjugata lijeka koji se vežu na antitijela specifična za taj lijek a koja su kovalentno vezana za nanočestice.<sup>[13]</sup>

Sudionici u dobi od 18 do 65 godina, svih rasa, spolova i nacionalnosti bili su odabrani za sudjelovanje u istraživanju. Podjeljeni su u tri grupe: sudionici sa dijagnosticiranom shizofrenijom koji se liječe klopapinom (N=45), sudionici sa dijagnosticiranom shizofrenijom koji se ne liječe klopapinom (N=24) i zdravi sudionici kojima nije dijagnosticirana shizofrenija (N=45). Svi sudionici su bili podvrgnuti vađenju krvi te su svi uzorci bili centrifugirani. Dobiveni serumi su podjeljeni u tri jednaka dijela i uskladišteni u tubama za zamrzavanje. Jedan od tri alikvota je poslan u laboratorij gdje se vršila analiza klopapina i norklopapina pomoću LC-LC/MS. Drugi alikvot je poslan u laboratorij gdje se koristio imunološki test za određivanje razine klopapina u serumu. Tri godine nakon, treći smrznuti alikvot je poslan u isti laboratorij na analizu uz pomoću LC-MS/MS. Smatra se da smrzavanje seruma ne utječe na određivanje razine klopapina jer je ranijim istraživanjima ustanovljeno da su razine klopapina u serumu stabilne i nakon smrzavanja.

U laboratoriju za analizu ispitivana je selektivnost LC-MS/MS uređaja za klopapin naspram 100 različitih spojeva uključujući različite vitamine, lijekove i endogene spojeve. Za vrednovanje imunološkog testa, ispitivano je 191 spojeva uključujući antipsihotike prve i druge generacije, lijekove koji se često primjenjuju zajedno, lijekove koji se često koriste

propisani i bez recepta na križnu reaktivnost u imunološkom testu. Niti jedan od njih nije pokazao značajnu križnu reaktivnost.

| Variable                                  | Overall Group<br>(n = 117) | Patients With Schizophrenia<br>Treated With Clozapine<br>(n = 48) | Patients With Schizophrenia Not<br>Treated With Clozapine<br>(n = 24) | Healthy Controls<br>(n = 45) |
|---|----------------------------|---|---|------------------------------|
| Age, yr, mean $\pm$ SD, range             | 40.26 $\pm$ 13.24 (19–64)  | 41.55 $\pm$ 13.17 (19–61)   | 44.63 $\pm$ 10.87 (23–63)   | 36.24 $\pm$ 13.59 (20–64)    |
| Male, n (%)                               | 72 (61.54%)                | 33 (68.75%)   | 14 (58.33%)   | 25 (55.56%)                  |
| Female, n (%)                             | 45 (38.46%)                | 15 (31.25%)   | 10 (41.67%)   | 20 (44.44%)                  |
| African American, n (%)                   | 55 (47.00%)                | 17 (35.42%)   | 18 (75.00%)   | 20 (44.44%)                  |
| Caucasian, n (%)                          | 49 (41.88%)                | 28 (58.33%)   | 4 (16.67%)  | 17 (37.78%)                  |
| Other races, n (%)                        | 13 (11.11%)                | 3 (6.25%)   | 2 (8.33%)   | 8 (17.78%)                   |
| Smokers, n (%)                            | 48 (41.03%)                | 24 (50.00%)   | 17 (70.83%)   | 7 (15.50%)                   |
| Non-clozapine antipsychotic, n (%)        | 42 (36.21%)                | 18 (38.30%)   | 24 (100%)   | 0 (0%)                       |
| Total protein, g/mL, mean $\pm$ SD, range | 7.01 $\pm$ 0.47 (5.9–8.3)  | 6.84 $\pm$ 0.37 (6.0–7.5)   | 6.91 $\pm$ 0.49 (6.2–8.2)   | 7.25 $\pm$ 0.47 (5.9–8.3)    |
| Albumin, g/dL, mean $\pm$ SD, range       | 4.46 $\pm$ 0.30 (3.7–5.3)  | 4.45 $\pm$ 0.28 (3.8–4.9)   | 4.36 $\pm$ 0.29 (3.8–5)   | 4.53 $\pm$ 0.32 (3.7–5.2)    |
| Globulin, g/dL, mean $\pm$ SD, range      | 2.55 $\pm$ 0.42 (1.6–4)    | 2.39 $\pm$ 0.33 (1.6–3.1)   | 2.55 $\pm$ 0.45 (1.8–3.9)   | 2.72 $\pm$ 0.43 (2–4)        |

**Slika 16.** Prikaz tablice demografskih i osnovnih kliničkih informacija svih sudionika <sup>[13]</sup>

#### 4.3.1 Određivanje razine klopapina u serumu

Srednja razina klopapina mjerena LC-MS/MS u sudionika koji su se liječili klopapinom bila je 16,2 % niža od srednje razine određene imunološkim testom. Mjerenje razine klopapina uz pomoć LC-MS/MS je bilo pozitivno u 3 od 24 sudionika koji nisu bili liječeni klopapinom, ali jesu dijagnosticirani, dok imunološki test nije pokazivao lažne pozitivne rezultate. Također, 15 od 45 lažnih pozitivnih rezultata dobiveno je korištenjem LC-MS/MS metode za zdrave kontrole, dok to nije uočeno korištenjem imunološkog testa. Na rezultate imunološkog testa i analize LC-MS/MS-om nisu utjecali ni dob ni spol. Međutim rezultati su se razlikovali u sudionika različite etničke pripadnosti i sudionika sa različitim razinama ukupnih serumskih proteina. Ovim radom su ukazali na važnost rutinskog praćenja koncentracije ukupnih serumskih proteina kao bitnog faktora koji utječe na razine klopapina u serumu. Kao što je već navedeno, razine klopapina razlikovale su se u sudionika različitih razina ukupnih serumskih proteina. Također, poznato je da se prilikom akutne upale

povećava razina klozapina. Uzrok tome može biti smanjenje aktivnosti CYP enzima, ali i povećana koncentracija ukupnih serumskih proteina što je vrlo bitno za doziranje i određivanje razina klozapina u krvi. Ipak, potrebno je obaviti dodatna istraživanja kako bi se podaci o ukupnim serumskim proteinima mogli iskoristiti za točno doziranje i determiniranje klozapina u krvi. Što se tiče omjera CLZ:NOR, njegova uporaba još uvijek nije određena. Omjer nije potrebna mjera za rutinski nadzor pacijenata, niti je prikladna mjera odgovora pacijenta na klozapin. Međutim, imunološki test ne mjeri razine norklozapina što može biti ograničenje u situacijama kada kliničar smatra da taj omjer može pomoći u provođenju terapije, primjerice prilikom predviđanja kardiometaboličkih ishoda.

Rezultati rada potvrdili su da rutinska LC/MS-MS analiza razine klozapina može biti otežana, ponajprije zbog niske ponovljivosti vrijednosti razina i zbog mogućnosti dobivanja lažnih pozitivnih rezultata, jer se uspostavilo da je rezultat bio lažno pozitivan za 26% od svih sudionika koji nisu bili liječeni klozapinom. S druge strane, rezultati dobiveni imunološkim testom nisu u niti jednom slučaju bili lažno pozitivni, što upućuje na veću selektivnost imunološkog testa za klozapin. Iako se LC-MS/MS smatra zlatnim standardom određivanja razina klozapina u serumu, još uvijek postoji mogućnost pogrešaka prilikom mjerenja. Uzrok tome mogu biti loše izvedena analiza u laboratoriju gdje su uzorci poslani ili kontaminacija uzoraka. Imunološki test se može koristiti za „point of care“ testiranje (testiranje na licu mjesta), što bi bilo revolucionarno u liječenju shizofrenije. Ipak, kako bi se ta metoda mogla koristiti, trebala bi se napraviti istraživanja u kojima bi usporedili koncentracije klozapina u serumu i u kapilarnoj krvi, s tim da „point of care“ metoda testiranja koristi perifernu kapilarnu krv uzetu iz prsta.



#### **4.4 USPOREDBA LC I LSV METODA ZA ODREĐIVANJE KLOZAPINA U TABLETAMA**

Raggi i sur.<sup>[38]</sup> razvili su i usporedili dvije različite analitičke metode za kontrolu kvalitete klozapina u tabletama: metodu tekućinske kromatografije s UV detektorom i voltametriju linearne promjene potencijala. Postupak izokratske LC provodili su C18 kolonom obrnute faze, dok su za analizu klozapina LSV metodom koristili kiseli fosfatni pufer kao elektrolit. Obje su metode dale vrlo slične i zadovoljavajuće rezultate.

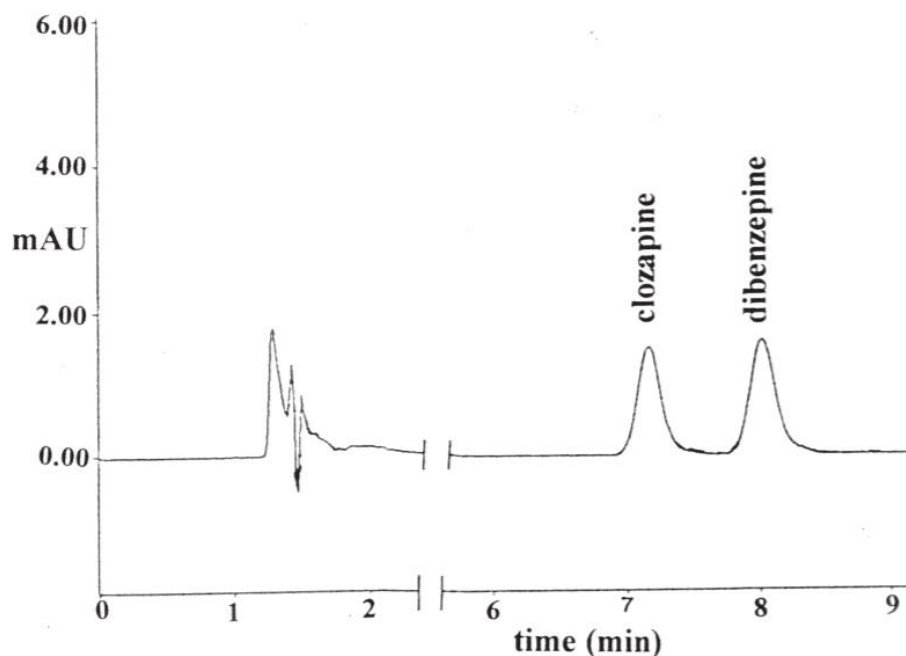
Analizirane tablete sadržavale su 100 mg klozapina kao aktivnog sastojka, te magnezijev stearat, silicijev dioksid, talk, polivinilpirolidon, kukuruzni škrob i laktozu kao pomoćne tvari. Osnovne otopine klozapina i dibenzepina pripravljene su u metanolu. Standardne radne otopine pripravljene su razrjeđivanjem otapalom metanolom za LC metodu te fosfatnim puferom (10 mM, pH=2,5) za LSV metodu. Dvadeset Leponex tableta je fino samljeveno, zatim je odgovarajuća količina prenesena u epruvetu s etanolom. Miješanje se provodilo u ultrazvučnoj kupelji 10 minuta, a dobivenim otopinama dodana je otopina internog standarda.

##### **4.4.1 LC metoda**

LC analiza provedena je korištenjem Beckman Instrument kromatografske crpke i UV detektora. Brzina protoka podešena je na 1,5 mL/min, dok je određivanje postavljeno na 230 nm. Kao stacionarna faza korištena je Beckman Ultrapshere C18 kolona obrnute faze. Mobilna faza je sastavljena od metanola, acetonitrila i vodene otopine koja sadrži 10,4 mM fosfatnog pufera. Puferu je dodan 0,4% trietilamin i pH je fosfornom kiselinom smanjen na vrijednost 1,9. Za određivanje klozapina korištena je izokratna elucija. Prije upotrebe, eluent je filtriran kroz membranu i degaziran (otplinjen) sonifikacijom. Dibenzepin je korišten kao interni standard.

Ispitivano je nekoliko lijekova kao moguće interferencije; paroksetin, karbamazepin, amitriptilin, loksapin, haloperidol, imipramin, koji nisu bili detektirani unutar 15 minuta od početka injektiranja. Samo je dibenzepin detektiran kao kromatografski vrh s ukupnim vremenom zadržavanja od 9,1 min, što je nažalost bilo vrlo blizu vrha klozapina. Kako bi se

povećala razlučivost između klozapina i dibenzepina, promjenjen je omjer komponenti mobilne faze. Brzina protoka povećana je s 1 na 1,5 mL/min kako bi se skratilo vrijeme analize. Optimizacijom uvjeta LC metode, postiglo se potpuno razlučivanje klozapina i dibenzepina. **Slika 17** prikazuje kromatogram 0,5 µg/mL standardne otopine klozapina koja sadrži 0,5 µg/mL dibenzepina. Vrijeme zadržavanja iznosi 7,1 minuta za klozapin odnosno 8,0 minuta za dibenzepin. Dobra linearnost postignuta je u rasponu od 0,125 do 1,000 µg/mL.



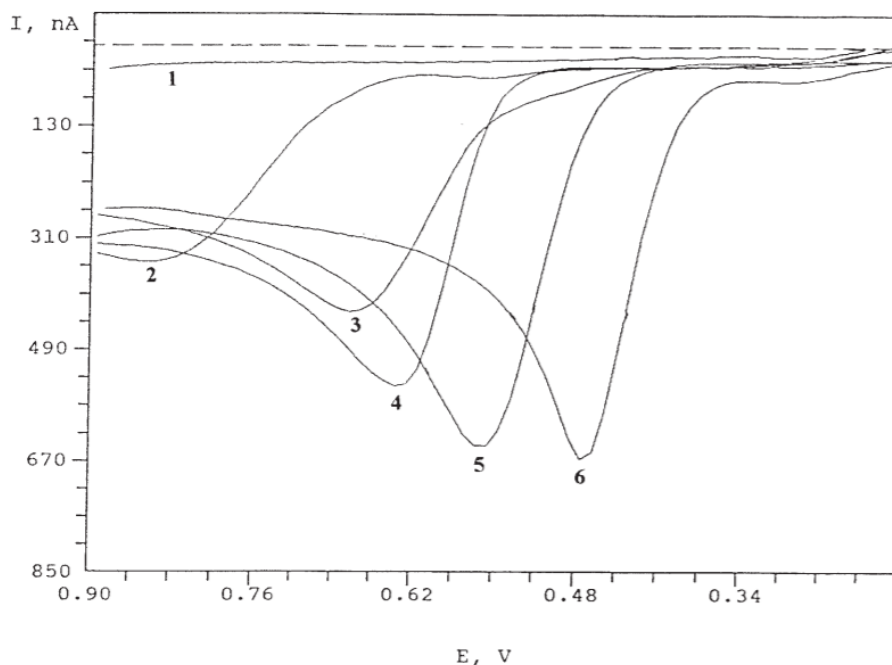
**Slika 17.** Kromatogram 0,5 mg/mL standardne otopine klozapina koja sadrži 0,5 mg/mL dibenzepina <sup>[38]</sup>

#### 4.4.2 LSV metoda

Klozapin je elektroaktivna tvar koja lako oksidira i stoga je prikladan za analizu elektrokemijskim tehnikama. Analiza LSV metodom provedena je AMEL 433 voltametrom. Radna elektroda je čvrsta grafitna elektroda. Fosfatni pufer (10 mM, pH=2,5) korišten je kao elektrolit. LSV metoda provodila se oksidacijom pri potencijalu od +700 mV.

Kako bi se postigli optimizirani uvjeti za voltametrijsku analizu klozapina, ispitivane su različite pH vrijednosti elektrolita. **Slika 18** prikazuje voltamograme standardne otopine

klozapina (0,25  $\mu\text{g/mL}$ ) pri različitim pH vrijednostima i slijepu probu fosfatnog pufera (10 mM, pH= 2,5). Najveći intezitet voltametrijskog pika postignut je u rasponu pH 5-7. Iz voltamograma je vidljivo da se oksidacijski pik pomaknuo prema nižim vrijednostima potencijala s povećanjem pH vrijednosti. Prema tome, klozapin se lakše oksidira pri višim pH vrijednostima i stoga je nestabilniji. Zapravo, pri tim pH vrijednostima određivanje klozapina je teško, jer je ponovljivost prilično loša. Stoga je za postizanje zadovoljavajućih rezultata potrebna upotreba pufera pri pH<4. Linearnost je određena u rasponu 10–50  $\mu\text{g/mL}$ .



**Slika 18.** Voltamogrami (1) elektrolita (10 mM fosfatni pufer, pH=2,5) i standardne otopine klozapina u fosfatnom puferu pri različitim pH vrijednostima: (2) 1,0; (3) 2,5; (4) 3,0; (5) 5,0; (6) 7,0 <sup>[38]</sup>

Količine klozapina određene navedenim metodama bile su u skladu s vrijednostima koje je proizvođač naveo u deklaraciji proizvoda. LC i LSV metode pokazale su se prikladnima za brzo i pouzdano određivanje klozapina u tabletama. Obrada uzorka sastojala se od jednostavne i brze ekstrakcije, filtriranja i razrjeđivanja metanolom. S obzirom na ponovljivost, srednju preciznost i točnost, obje metode su dale slične i zadovoljavajuće rezultate. LC metoda je selektivnija i osjetljivija, dok je LSV metoda jeftinija i puno brža.

## 4.5 VOLTAMETRIJSKO ODREĐIVANJE KLOZAPINA U TABLETAMA

Rad Ekera i suradnika<sup>[39]</sup> fokusirao se na određivanje elektrokemijskih svojstava klozapina na temelju njegovog oksidacijskog ponašanja i razvoj voltametrijske metode za brzo i precizno određivanje količine klozapina u tabletama korištenjem elektrode od staklastog ugljika. Elektrokemijsku analizu klozapina provodili su na elektrodama od staklastog ugljika primjenom DPV.

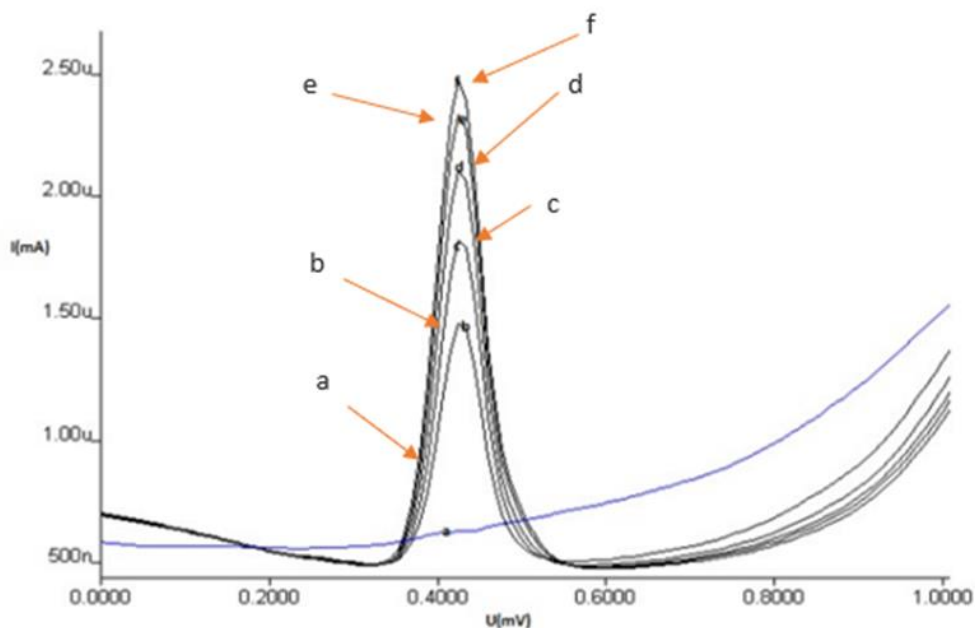
Voltametrijska mjerenja provedena su sustavom od triju elektroda: elektrodom od staklastog ugljika kao radnom elektrodom, pomoćnom elektrodom od platinske žice i referentnom Ag/AgCl elektrodom. Prije svake uporabe, površina radne elektrode očišćena je poliranjem s prahom aluminijske oksida (glinicom), a zatim isprana ultračistom deioniziranom vodom i etanolom. Postupak deoksigenacije osnovnog elektrolita proveden je argonom u trajanju od 5 minuta.

Deset Leponex (klozapin kao aktivna tvar) tableta je izvagano i samljeveno u fini prah, te je dio praha, koji odgovara koncentraciji osnovne otopine, prenesen u odmjernu tikvicu od 10 mL i razrijeđen etanolom. Sadržaj tikvice centrifugiran je 20 minuta kako bi se postiglo potpuno otapanje, a zatim razrijeđen etanolom do oznake. Otopine za voltametrijska mjerenja pripremljene su razrjeđivanjem odgovarajućih alikvota osnovne otopine s osnovnim elektrolitom. Sve otopine su zaštićene od svjetlosti i korištene su u roku od 24 sata kako bi se izbjeglo njihovo raspadanje.

### 4.5.1 Određivanje klozapina

Za voltametrijska mjerenja korištena je DPV, te je praćena ovisnost vršne struje o promjeni pH. Vršna jakost struje DPV-a mijenjala se s povećanjem pH vrijednosti. Maksimalna struja opažena je u 0,2 M acetatnom pufer (pH= 5,5). Stoga su ova pH vrijednost i ovaj elektrolit odabrani za elektroanalitičko određivanje klozapina.

U optimiziranim eksperimentalnim uvjetima, linearni odnos između vršne oksidacijske struje klozapina i koncentracije postigao se u rasponu od  $3 \times 10^{-6}$  do  $1 \times 10^{-5}$  M (**Slika 19**).



**Slika 19.** Voltamogrami pri različitim koncentracijama klozapina u 0,2 M acetatnom puferu (pH=5,50) na GCE pomoću DPV: a) pomoćni elektrolit, b)  $3 \times 10^{-6}$  c)  $5 \times 10^{-6}$  d)  $7 \times 10^{-6}$  e)  $9 \times 10^{-5}$  f)  $1 \times 10^{-5}$  M <sup>[39]</sup>

Vrednovanje metode za kvantitativno određivanje klozapina provodilo se procjenom granice dokazivanja (LOD), granice određivanja (LOQ), preciznosti, točnosti i rezultata oporavka. Vrijednosti LOD i LOQ izračunati su pri vršnoj oksidacijskoj struji: LOD iznosi  $4,082 \times 10^{-7}$  M, LOQ iznosi  $1,361 \times 10^{-6}$  M.

Količina klozapina u Leponex tabletama izračunata je pomoću krivulja umjeravanja. Za procjenu točnosti primjenjene metode provodili su se testovi oporavka nakon dodatka određene količine čistog lijeka u prethodno analizirane formulacije klozapina. Rezultati (Slika 20) nisu pokazali smetnju pomoćnih i endogenih tvari pri analizi.

| Parameter   | Results |
|---|---------|
| Labeled clozapine (mg)                            | 25.00   |
| Amount Found (mg)                                 | 25.50   |
| Relative Standard deviation, R.S.D.%              | 0.98    |
| Bias %  | 2.00    |
| clozapine (mg)                                    | 5.00    |
| Found(mg)   | 4.92    |
| Number of measurement, n                          | 5.00    |
| recovery (%)                                      | 98.30   |
| Relative standard deviation of recovery, R.S.D. % | 0.20    |
| Bias %  | 0.02    |

**Slika 20.** Prikaz tablice o primjeni DPV tehnike za ispitivanje klozapina u Leponex tabletama i srednji oporavak na GC elektrodama <sup>[39]</sup>

DPV tehnika za kvantitativno određivanje klozapina u tabletama na temelju njegove elektrokemijske oksidacije na elektrodi od staklastog ugljika pokazala se vrlo osjetljivom, selektivnom i jednostavnom. Rezultati mjerenja pokazali su da su reakcije na elektrodama ireverzibilne i ovisne o pH. DPV tehnika uključuje otapanje, razrjeđivanje, taloženje, centrifugiranje i prenošenje alikvota odgovarajućim elektrolitom. S druge strane, prednost DPV-a je mogućnost analize klozapina u farmaceutskim oblicima doziranja bez složene pripreme uzorka.

## **4.6 ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE I ODREĐIVANJE KLOZAPINA NA ELEKTRODI OD STAKLASTOG UGLJIKA MODIFICIRANOJ ELEKTROKEMIJSKOM OKSIDACIJOM**

Farhadij i Karimpour<sup>[40]</sup> proučavali su elektrokemijsko ponašanje klozapina na elektrodi od staklastog ugljika prethodno modificiranoj elektrokemijskom oksidacijom. Cilj rada je bio razvoj *stripping* voltometrije za određivanje klozapina s većom osjetljivošću i ponovljivošću u usporedbi s drugim, već objavljenim istraživanjima o ovoj voltometriji.

Adsorpcijska svojstva elektrode od staklastog ugljika mogu se promijeniti postupkom elektrokemijske predobrade. Modifikacije površine elektroda i njihova prethodna obrada koriste se za poboljšanje elektrokemijskih odaziva bioloških spojeva. Utvrđeno je da se klozapin može adsorbirati na elektrokemijski prethodno obrađenoj elektrodi od staklastog ugljika (EPGCE). Korištenjem modificiranih elektroda i akumulacijom klozapina na površini elektrode prije diferencijalne pulsne voltometrije i voltometrije linearne promijene potencijala, postignuta je veća osjetljivost. Voltometrijska metoda izvodila se sustavom od triju elektroda: radne elektrode (čvrsta elektroda od staklastog ugljika), referentne elektrode (Ag/AgCl), i protuelektrode ( žica od staklastog ugljika).

### **4.6.1 Predtretiranje radne elektrode i priprema uzoraka**

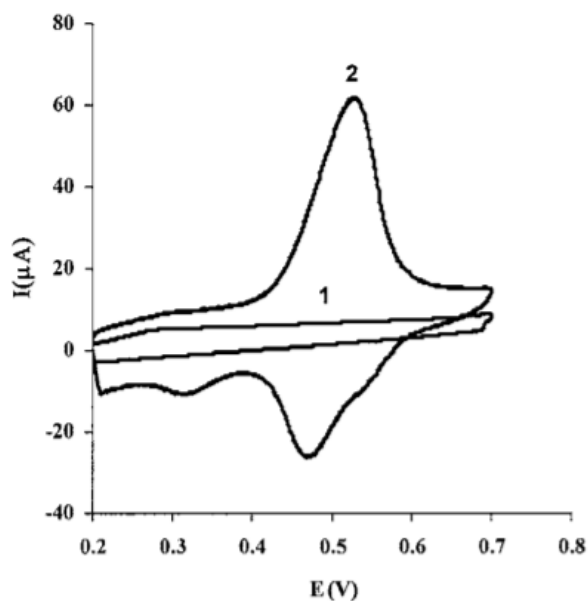
Prije upotrebe, površina elektrode od staklastog ugljika očišćena je poliranjem s prahom aluminijeva oksida (glinica), a zatim isprana dvostruko destiliranom vodom; elektrokemijska predobrada ove elektrode izvedena je anodnom oksidacijom na 1,8 V u fosfatnom puferu (pH=6). Elektroda se ciklirala u području potencijala od -0,8 V do 1,0 V sve dok se nije postigao stabilan strujno-naponski profil. Tri su elektrode uronjene u otopinu koja sadrži klozapin i fosfatni pufer. Dok se otopina miješala, klozapin se u određenom vremenu akumulirao na površinu elektrokemijski predobrađene elektrode od staklastog ugljika. Nakon svakog eksperimenta bilo je potrebno očistiti elektrodu.

Uzorci tableta klozapina u prahu preneseni su u čašu koja sadrži 0,1 M HNO<sub>3</sub>. Otopina je filtrirana u odmjernu tikvicu, zatim isprana i razrijeđena do oznake s 0,1 M HNO<sub>3</sub>. Mali volumen ove otopine (mikrolitarski volumen) odpipetiran je u odmjernu tikvicu i razrijeđen

do oznake s 0,2 M otopinom fosfatnog pufera, nakon čega se otopinu prenijelo u elektrokemijsku ćeliju. Akumulacija klozapina na površini elektrokemijski prethodno obrađene elektrode postignuta je miješanjem u trajanju od jedne minute. Voltamogrami su snimljeni su između 0,3 i 0,7 V.

#### 4.6.2 Voltametrijsko ponašanje klozapina na modificiranoj elektrodi

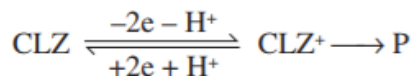
**Slika 21** prikazuje ciklički voltamogram klozapina u fosfatnom puferu (pH=6) pri brzini skeniranja  $100 \text{ mVs}^{-1}$ . Na slici se mogu uočiti dva glavna vrha i manji vrhovi koji su vjerojatno povezani s kemijskim produktima nastalim elektrooksidacijom klozapina na površini aktivirane GC elektrode. Ciklički voltamogrami snimljeni su tri puta: rezultati su pokazali da se nakon prvog skeniranja visina glavnog anodnog i katodnog vrha smanjila kao posljedica onečišćenja elektrode, dok su se visine ostalih vrhova povećale. Stoga se može reći da se pri ovim uvjetima na površini aktivirane GC elektrode oksidirani oblik klozapina degradira.



**Slika 21.** Ciklički voltamogrami (1) čistog fosfatnog pufera i (2) fosfatnog pufera s dodatkom  $40 \mu\text{M}$  CLZ na aktiviranoj GC elektrodi ; akumulacija-60 s, brzina skeniranja- $100 \text{ mV s}^{-1}$  [40]

Nakon dodatnih mjerenja pomoću diferencijalnog pulsnoeg voltamograma došli su do mogućeg mehanizma oksidacije klozapina:





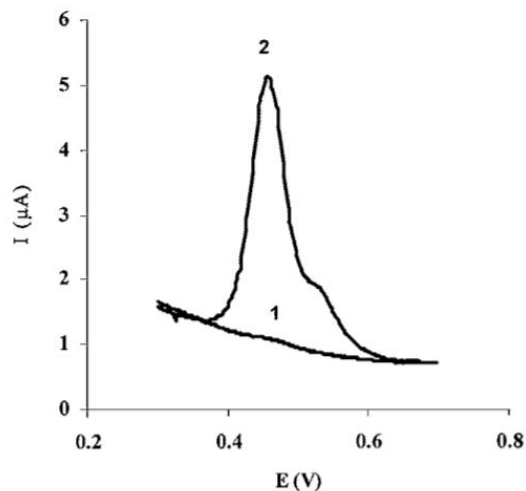
Reakcija prikazuje oksidaciju klozapina i degradaciju oksidiranog oblika u produkt P na aktiviranoj GC elektrodi. Produkti P nalikuju metabolitima cijepanja oksidiranog oblika klozapina, a degradacija piperazinskog prstena uključena je u već otkrivene puteve metabolizma klozapina.

#### 4.6.3 Optimizacija uvjeta za predobradu radne elektrode

Anodizacija elektrode od staklastog ugljika pri visokom pozitivnom potencijalu rezultirala je stabilnim vršnim strujama. Elektrokemijskom aktivacijom površine elektrode stvorio se oksidirani sloj koji sadrži funkcionalne skupine, prvenstveno C-O skupine. Ove su skupine povećale gustoću aktivnih mjesta na površini elektrode i ubrzale prijenos elektrona. Stoga se, u svrhu poboljšanja elektrokemijskog odaziva klozapina, elektroda predobradila u fosfatnom puferu (pH=6) anodnom oksidacijom i stalnim cikliziranjem sve dok se nije postigao stabilan voltamogram. Elektrooksidacija klozapina ispitivala se na nemodificiranim Pt, Au i GC elektrodama i na aktiviranoj GC elektrodi u fosfatnom puferu. Aktivirana GC elektroda je pokazala visoku osjetljivost i preciznost s izvrsnom ponovljivošću, stoga je odabrana za elektrokemijsko određivanje klozapina.

#### 4.6.4 Adsorpcijsko ponašanje klozapina

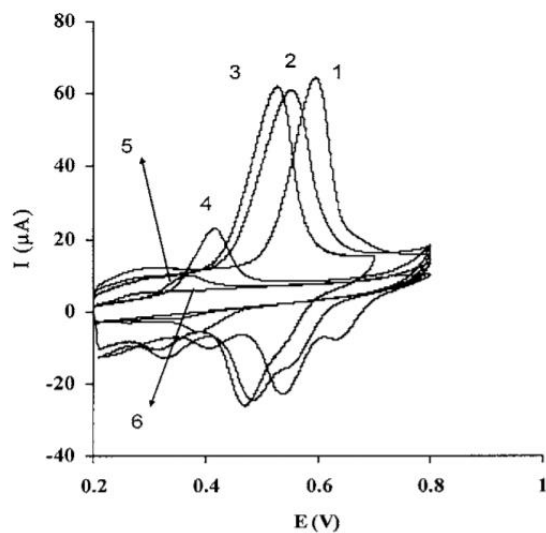
**Slika 22** prikazuje diferencijalno pulsne voltamograme otopine klozapina bez akumulacije i nakon akumulacije u trajanju od 1 minute. Vidljivo je da se vršna struja naglo povećala nakon akumulacije čime su zaključili da se primjenom adsorpcijske *stripping* voltametrije za određivanje klozapina značajno može povećati osjetljivost. Optimalni uvjeti za maksimalnu adsorpciju trebali bi se koristiti tijekom akumulacije klozapina na površini elektrode kako bi se postigla maksimalna osjetljivost *stripping* metode.



**Slika 22.** Diferencijalno pulsni voltamogrami 4  $\mu\text{M}$  otopine klozapina: (1) bez akumulacije, (2) nakon akumulacije u trajanju od 1 minute <sup>[40]</sup>

#### 4.6.5 Utjecaj pH vrijednosti, vremena akumulacije i akumulacijskog potencijala na voltametrijski odziv

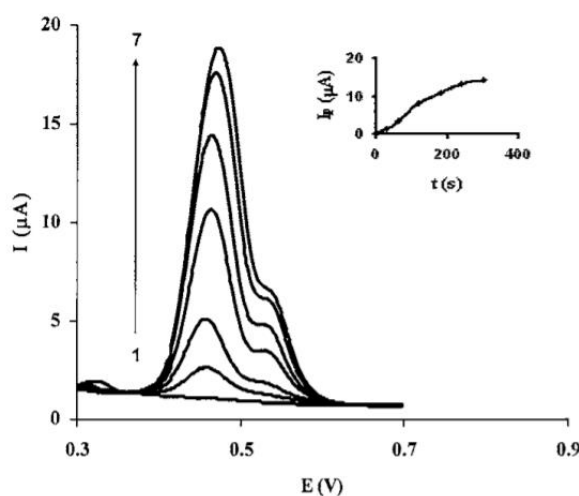
Utjecaj pH na voltametrijski odziv ispitan je između pH 4 i 10 (**Slika 23**). Utvrđeno je da se vrijednost vršne struje povećala u rasponu pH od 4 - 6, a zatim smanjila u alkalnim uvjetima. Najbolja se akumulacija postigla u fosfatnom puferu pri pH=6, stoga je ova pH vrijednost odabrana za provođenje akumulacije.



**Slika 23.** Utjecaj pH vrijednosti na voltametrijski odziv klozapina: (1) 4; (2) 5; (3) 6; (4) 7; (5) 8; (6) 10 <sup>[40]</sup>

Ispitivao se utjecaj akumulacijskog potencijala na intezitet vršne struje za 40  $\mu\text{M}$  otopinu klopapina nakon akumulacije od 60 s u rasponu od 0,2 do 0,4 V. Nikakvo poboljšanje osjetljivosti predložene metode nije primjećeno.

Optimizacija procesa akumulacije provodila se i ispitivanjem vremena akumulacije klopapina na površini elektrode *stripping* voltametrijom. **Slika 24** prikazuje ovisnost adsorpcijskih vršnih struja o vremenima akumulacije klopapina. Rezultati pokazuju da se povećanjem vremena akumulacije povećava i koncentracija klopapina na površini elektrode. Opažen je linearni raspon između količine akumuliranog spoja i vremena akumulacije pri niskim koncentracijama, što ukazuje na stalnu adsorpciju. Povećanjem koncentracije klopapina smanjuje se vrijeme potrebno za postizanje ravnoteže spoja u otopini i na površini elektrode.



**Slika 24.** Diferencijalno pulsni voltamogrami 4  $\mu\text{M}$  otopine klopapina pri različitim vremenima akumulacije (od 0 do 300 s) <sup>[40]</sup>

#### 4.6.6 Određivanje klopapina u farmaceutskim pripravcima

Određivanje sadržaja klopapina u farmaceutskim pripravcima provedeno je pomoću predložene *stripping* voltametrije. Sadržaj klopapina u tabletama određen je metodom standardnog dodatka. Prosječna određena koncentracija bila je  $104,73 \pm 1,85$  mg po tableti s relativnom standardnom devijacijom od 1,8 %, što ukazuje na odgovarajuću preciznost i točnost predložene metode.

Razvijena analiza klozapina *stripping* voltametrijom na elektrokemijski obrađenoj elektrodi od staklastog ugljika značajno je poboljšala osjetljivost metode. Osim toga, postignuta je niža granica dokazivanja. Metoda je korištena za određivanje klozapina u farmaceutskim proizvodima bez ikakvih smetnji. Zbog niske cijene instrumentacije i relativno brze analize, predložena metoda se pokazala vrlo prikladnom za određivanje klozapina u farmaceutskim pripravcima.

## **5. ZAKLJUČAK**

Prikazane su odabrane kromatografske i voltametrijske metode za određivanje klozapina u različitim farmaceutskim i biološkim uzorcima:

- GC-MS metoda<sup>[35]</sup> se pokazala vrlo osjetljivom i specifičnom za određivanje klozapina i njegovog glavnog metabolita norklozapina, u ljudskoj plazmi. Kromatografsko odvajanje obaju analita postignuto je u kratkom vremenu, a rezultati dobiveni ovom metodom su bili zadovoljavajući.
- HPLC-UV metoda<sup>[36]</sup> omogućila je brzo i selektivno odvajanje klozapina i njegova dva metabolita u uzorku krvi, dobro iskorištenje, osjetljivo UV određivanje te je vrednovana u smislu osjetljivosti i preciznosti. Pokazala se vrlo učinkovitom i prikladnom za terapijsko praćenje klozapina.
- Rezultati imunotesta i LC-MS/MS metode<sup>[13]</sup> za određivanje klozapina u serumu ukazali su na prednost korištenja imunotesta koji se pokazao vrlo selektivnim i jednostavnim. LC-MS/MS metoda nije se pokazala pouzdanom za određivanje klozapina zbog niske reproducibilnosti što je vjerojatno bilo povezano s progreskama prilikom analize u laboratoriju ili kontaminacijom uzoraka.
- Količine klozapina u tabletama određene LC i LSV metodama<sup>[38]</sup> odgovarale su vrijednostima navedenima na ambalaži. LC metoda se pokazala osjetljivijom, dok je LSV bila puno brža. Obje su metode dale zadovoljavajuće rezultate u pogledu ponovljivosti, srednje preciznosti i točnosti.
- DPV tehnika<sup>[39]</sup> je vrlo osjetljiva, selektivna i jednostavna. Analiza klozapina provodila se bez potrebe za predobradom uzoraka a rezultati su pokazali da je DPV vrlo učinkovita za kvantitativno određivanje klozapina u tabletama.
- Analiza klozapina *stripping* voltametrijom na modificiranoj elektrodi od staklastog ugljika<sup>[40]</sup> dala je zadovoljavajuće rezultate. Postignuta je niža granica detekcije, a modifikacija elektrode uvelike je povećala osjetljivost i selektivnost u odnosu na prethodno objavljena istraživanja o istoj metodi.

## **6. LITERATURA**

- [1] B.G. Katzung, *Basic and Clinical Pharmacology* (14th ed.), McGraw-Hill Education, **2018.**, str. 511 – 524
- [2] <https://en.wikipedia.org/wiki/Clozapine> (preuzeto: 5.6.2021.)
- [3] <https://gpatindia.com/clozapine-synthesis-sar-mcqstructurechemical-properties-and-therapeutic-uses/> (preuzeto: 7.6. 2021.)
- [4] E. Fakra, JM. Azorin, *Clozapine for the treatment of schizophrenia*, Expert Opinion on Pharmacotherapy, Vol. 13, No. 13, **2012.**, str. 1923–1935
- [5] S. Gee, T. Dixon, M. Docherty, S.S. Shergill, *Optimising plasma levels of clozapine during metabolic interactions: a review and case report with adjunct rifampicin treatment*, BMC Psychiatry, Vol. 15, No. 1, **2015.**, str. 195
- [6] [https://en.wikipedia.org/wiki/Clozapine\\_N-oxide](https://en.wikipedia.org/wiki/Clozapine_N-oxide) (preuzeto: 10.6.2021.)
- [7] <https://en.wikipedia.org/wiki/Desmethylclozapine> (preuzeto: 10.6.2021.)
- [8] A.J. Wagstaff, H.M. Bryson, *Clozapine*, CNS Drugs, Vol.4, **1995.**, str. 370–400
- [9] FC Jr. Nucifora, M. Mihaljević, BJ Lee, A. Saw, *Clozapine as a Model for Antipsychotic Development*, Neurotherapeutics, Vol. 14, No. 3, **2017.**, str. 750-761
- [10] The European Agency for the Evaluation of Medical Products, Pre-authorisation Evaluation of Medicines for Human Use, *Committee for proprietary medicinal product (CPMP) summary information on referral opinion following arbitration pursuant to article 30 of council directive 2001 /83/EC for Leponex and associated names*, London, **2002.**
- [11] Clozaril - [Accessdata.fda.gov](https://accessdata.fda.gov) (preuzeto 17.6.2021.)
- [12] D. Ostojić, A. Silić, M. Šagud, A. Savić, D. Karlović, M.R. Kuzman, V. Peitl, A. Sabljarić, A. Pavlović *Hrvatske smjernice za liječenje shizofrenije i drugih psihotičnih poremećaja*, Hrvatsko psihijatrijsko društvo, **2019.**, str. 39
- [13] T. Buckley, C. Kitchen, G. Vyas, N.A. Siegfried, E. Tefera, S. Chen, B.A. DiPaula, D.L. Kelly, *Comparison of Novel Immunoassay With Liquid Chromatography/Tandem Mass*



*Spectrometry (LC-MS/MS) for Therapeutic Drug Monitoring of Clozapine*, Therapeutic Drug Monitoring, Vol. 42, No. 5, **2020**. str. 771-777

[14] Nj. Radić, L. Kukoč Modun, *Uvod u analitičku kemiju*, Školska Knjiga, Zagreb, **2016.**, str. 630-632, 637, 654-657

[15] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, *Osnove analitičke kemije*, Školska Knjiga, Zagreb, **1999.**, str. 645-646, 674-678, 693-697, 707-708

[16] <https://www.chemyx.com/support/knowledge-base/applications/basic-principles-hplc-ms-lc-ms/> (preuzeto: 5.7.2021.)

[17] [http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana\\_Luterotti/09/091/09131.htm](http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/09131.htm) (preuzeto: 16.7.2021.)

[18] Viktorija Prevarić, *Kromatografska analiza psihoaktivnih supstanci*, Završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, **2017.** str. 17

[19] F.W. Karasek and R.E. Clement, *Basic Gas Chromatography – Mass Spectrometry Principles and Techniques*, Elsevier Science, **1988.**

[20] [https://en.wikipedia.org/wiki/Mass\\_spectrometry](https://en.wikipedia.org/wiki/Mass_spectrometry) (preuzeto: 27.7.2021.)

[21] F. Burčul (2018.) *Instrumentne metode analize II dio*, [Powerpoint dijapozitiv]. Preuzeto s: <https://www.ktf.unist.hr/index.php/nastavni-materijali-zak/nastavni-materijali/file/5327-instrumentalne-metode-analize-fb-ii-dio>

[22] I. Piljac, *Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode*, RMC Zagreb, Media print, Tiskara Hrastić, **2010.**, str. 391, 430-431

[23] D. Kul, *Voltammetric Analysis of Atypical Antipsychotic Drugs with Solid Electrodes*, Current Analytical Chemistry, Vol. 15., 2019., str. 240 -248

[24] B. Nigović, S. Behetić, *Elektroanalitika u farmaciji*, Farmaceutski glasnik, Vol.63, **2007.**, str. 163-175

[25]. I. Piljac, *Elektroanalitičke metode*, RMC Zagreb, Media Print, Tiskara Hrastić **1995.**, str 255-264

[26] [https://en.wikipedia.org/wiki/Electrochemical\\_stripping\\_analysis](https://en.wikipedia.org/wiki/Electrochemical_stripping_analysis) (preuzeto:10.8.2021)

- [27] B. Uslu, S.A. Ozkan, *Electroanalytical Application of Carbon Based Electrodes to the Pharmaceuticals*, Vol. 40, No. 5, 2007., str. 817-853
- [28] [https://hr2.wiki/wiki/Glassy\\_carbon](https://hr2.wiki/wiki/Glassy_carbon) (preuzeto: 13.8.2021.)
- [29] <http://www.ijcambria.com/Glassy%20Carbon.htm> (preuzeto: 13.8. 2021.)
- [30] I. A. Darwish, *Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances*, International Journal of Biomedical Science, Vol. 2, No. 3, **2006.**, str. 217-235
- [31] <https://en.wikipedia.org/wiki/Immunoassay> (preuzeto: 15.8.2021.)
- [32] Maciej J. Bogusz, *Handbook of Analytical Separations (Vol. 2)*, Elsevier Science B.V., **2000.**, str. 67-106
- [33]<https://microbenotes.com/radioimmunoassay-principle-uses-and-limitations/>  
(preuzeto:16.8.2021.)
- [34][https://biocyclopedia.com/index/genetics/genetic\\_engineering\\_and\\_biotechnology\\_hybridoma\\_and\\_monoclonal\\_antibodies/uses\\_of\\_monoclonal\\_antibodies.php](https://biocyclopedia.com/index/genetics/genetic_engineering_and_biotechnology_hybridoma_and_monoclonal_antibodies/uses_of_monoclonal_antibodies.php)  
(preuzeto:17.8.2021.)
- [35] I. Vardakou, A. Dona, C. Pistos, G. Alevisopoulos, S. Athanaselis, C. Maravelias, C. Spiliopoulou, *Validated GC/MS method for the simultaneous determination of clozapine and norclozapine in human plasma. Application in psychiatric patients under clozapine treatment*, Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, vol. 878, No.25, **2010.**, str. 2327-2332
- [36] E. Dural, G. Mergen, T. Söylemezoğlu, *Optimization and Validation of an HPLC-UV Method for Analysis of Clozapine and Its Major Metabolites in Human Plasma*, Turkish Journal Of Pharmaceutical Sciences, Vol. 12, No. 2, **2015.**, str. 177-186
- [37] *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, **2005.**

[38] M.A. Raggi, V. Pucci, F. Bugamelli; V. Volterra *Comparison of Three Analytical Methods for Quality Control of Clozapine Tablets*, Journal of AOAC INTERNATIONAL, Vol. 84, Iss.2, **2001.**, str. 361–367

[39] R. Eker, S. Yilmaz, S. Yağmura, O. Tonguc Yayintasb, *Voltammetric Determination of Clozapine from its Drug Form*, Journal of Scientific Perspectives, Vol. 1, No. 2, **2017.** str. 19-30

[40] K. Farhadi, A. Karimpour, *Electrochemical Behavior and Determination of Clozapine on a Glassy Carbon Electrode Modified by Electrochemical Oxidation*, Analytical Sciences, Vol. 23, Iss. 4, **2007.**, str. 479–483