Full text English translation available in the on-line version (click here)

Chemické Listy

Referát

www.chemicke-listy.cz

VYUŽITIE ELEKTROCHEMICKÝCH ANALYTICKÝCH METÓD PRI STANOVENÍ LIEČIVA WARFARÍNU

Nové pohľady na analytickú chémiu*

Článok je venovaný prof. RNDr. Jiřímu Zimovi, CSc., pri príležitosti jeho nadchádzajúcich 70. narodenín.

VICTÓRIA ŽUŽIČOVÁ a VLASTIMIL VYSKOČIL

Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí, Hlavova 8, 128 00 Praha 2, Česká republika
victoria.zuzicova@natur.cuni.cz, vlastimil.vyskocil@natur.cuni.cz

Došlo 8.9.25, prijaté 3.11.25.

Warfarín je antikoagulačné liečivo s úzkym terapeutickým indexom. Jeho presné stanovenie je nevyhnutné na zabezpečenie účinnej a bezpečnej liečby, keďže aj malé odchýlky môžu viesť k vážnym nežiaducim účinkom. Na jeho stanovenie sa využíva široká škála analytických metód, vrátane spektrometrických a separačných techník. Elektrochemické metódy sa vyznačujú jednoduchým experimentálnym usporiadaním a nízkymi nákladmi, pričom umožňujú rýchlu analýzu s vysokou citlivosťou a dostatočnou selektivitou. Vďaka týmto výhodám predstavujú efektívnu alternatívu pri stanovení liečiv a nachádzajú uplatnenie v klinickej diagnostike, kontrole kvality liečiv či environmentálnych analýzach metabolitov liekov. Tento prehľad popisuje fyzikálno-chemické a biologické vlastnosti warfarínu a porovnáva rôzne analytické prístupy jeho stanovenia s dôrazom na elektrochemické metódy.

Kľúčové slová: elektrochémia, analýza liečiv, warfarín, antikoagulanciá, voltampérometria, ampérometria

Obsah

1. Úvod
2. Warfarín
   2.1. Fyzikálne a chemické vlastnosti
   2.2. Biologické vlastnosti
   2.3. Elektrochemické vlastnosti
3. Stanovenie warfarínu
   3.1. Neelektrochemické metódy stanovenia
   3.2. Elektrochemické metódy stanovenia
4. Záver

Mgr. Victória Žužičová *ukončila v roku 2023 bakalárske štúdium v odbore Medicinálna chémia na Prírodovedeckej fakulte Univerzity Karlovej v Prahe. Na rovnakej fakulte ukončila v roku 2025 nadväzujúce magisterské štúdium v odbore Analytická chémia. Už od bakalárskeho štúdia sa aktívne venuje elektroanalytickým metódam.* ***Výsledky svojej práce prezentovala na celoštátnej súťaži o najlepšiu študentskú vedeckú prácu v obore analytická chémia „O cenu Karla Štulíka 2025“.*** *V súčasnosti je študentkou 1. ročníka doktorského štúdia v odbore Analytická chémia na Katedre analytickej chémie Prírodovedeckej fakulty Univerzity Karlovej. Jej výskum sa zameriava na vývoj nových elektrochemických biosenzorov na báze DNA a elektrochemických prevodníkov s využitím netradičných elektródových materiálov (intermetalické fázy, nanoštruktúrované formy uhlíkových materiálov).*

1. Úvod

Warfarín sa prvýkrát objavil v 20. rokoch 20. storočia po sérii záhadných úmrtí hovädzieho dobytka v oblasti Severnej Dakoty a Kanady. Zistilo sa, že príčinou bola konzumácia skazeného sena, v ktorom sa pôsobením plesní premieňali prirodzene sa vyskytujúce kumaríny na dikumarol, ktorý má antikoagulačné účinky. Výskum bol

Metrohm Česká republika

* Tento příspěvek je součástí seriálu Nové pohledy na analytickou chemii sponzorovaného firmou Metrohm Česká republika s.r.o. (www.metrohm.cz) a zahrnujícího jak příspěvky mladých kolegů (**Rising Stars in Analytical Chemistry**), tak i kolegů na vrcholu jejich publikační aktivity (**Experienced Researchers**), případně i vítanou kombinaci obojího.

finančne podporený nadáciou WARF (Wisconsin Alumni Research Foundation), podľa ktorej dostala novo syntetizovaná látka svoje meno. Warfarín sa prvýkrát dostal na trh v roku 1948 ako rodenticíd. V roku 1954 bol, vo forme vo vode rozpustnej sodnej soli, schválený aj na humánne použitie ako antikoagulačné liečivo pod komerčným názvom Coumadin. Dnes sa ako rodenticídy využívajú jeho analógy nazývané superwarfaríny, zatiaľ čo warfarín sodný sa stále používa ako antikoagulant v klinickej praxi[1].

2. Warfarín

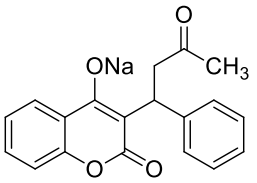
2.1. Fyzikálne a chemické vlastnosti

Warfarín, chemickým názvom 4-hydroxy-3-(3-oxo-1--fenylbutyl)kumarín (registračné číslo CAS (Chemical Abstract Service) je 81-81-2), je nepriame perorálne antikoagulans. Je to látka kyslej povahy s disociačnou konštantou $pK_a \approx 5{,}6$. Warfarín je prakticky nerozpustný vo vode, dobre rozpustný v alkoholoch a organických rozpúšťadlách. Jeho sodná soľ je nerozpustná v organických rozpúšťadlách, ale je dobre rozpustná vo vode a v etanole, preto sa ako liečivo využíva práve warfarín sodný (WAR). Štruktúra WAR je uvedená na obr. 1, sumárny vzorec je $C_{19}H_{15}NaO_4$ a registračné číslo CAS sodnej soli je 129-06-6. Molekulová hmotnosť sodnej soli je 330,3 g mol^{-1}. Štruktúru tvorí aromatické kumarínové jadro s hydroxylovou skupinou v polohe 4. V polohe 3 je substituovaný benzylidenacetónovým reťazcom, ktorý obsahuje chirálny uhlík. WAR má dve enantiomerné formy, *R*- a *S*-WAR, ale pre farmaceutické účely sa používa ich racemická zmes[2].

WAR sa bežne vyskytuje v dvoch formách, a to ako kryštalický, tvorený klatrátom s propan-2-olom, a amorfný. Kryštalický WAR je biely hygroskopický prášok bez zápachu. Má stabilnú a dobre definovanú štruktúru, preto sa využíva v tabletách. Naopak amorfný WAR je menej stabilný a citlivý na vlhkosť, ale má vyššiu rozpustnosť vo vode, a preto sa využíva ako účinná látka v suspenziách[3].

2.2. Biologické vlastnosti

Najčastejšou indikáciou WAR je liečba a prevencia fibrilácie predsiení, poruchy srdcového rytmu a s ňou spojených tromboembolických komplikácií. WAR sa ďalej používa pri prevencii a liečbe žilnej trombózy a pľúcnej embólie, pri komplikáciách spojených s náhradou srdcových chlopní a ako prevencia opätovného vzniku krvných zrazenín po infarkte myokardu[4].



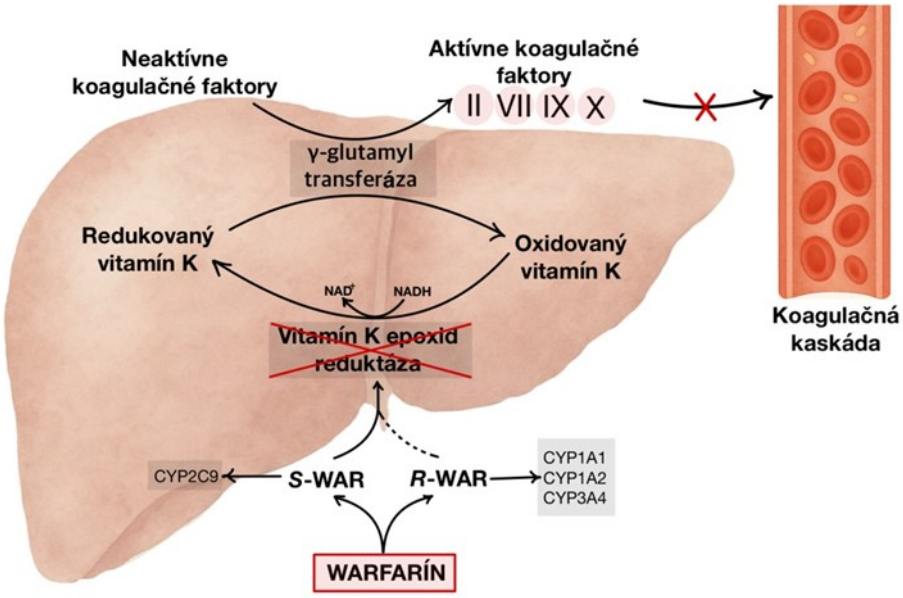
Obr. 1. **Štruktúrny vzorec WAR**

Mechanizmus účinku bol prvýkrát popísaný až v roku 1978, a teda vyše 20 rokov po jeho uvedení na trh. Antikoagulačný účinok WAR spočíva v inhibícii enzýmu vitamín K epoxid reduktázy (VKOR), enzýmu zodpovedného za regeneráciu vitamínu K v pečeni. VKOR katalyzuje premenu oxidovanej formy, vitamín K epoxidu, na redukovanú formu, vitamín K hydrochinón, čo je jeho aktívna forma. Aktívny vitamín K je dôležitým kofaktorom pre enzým γ-glutamylkarboxylázu, ktorý zabezpečuje posttranslačnú γ-karboxyláciu koagulačných faktorov II, VII, IX a X a antikoagulačných proteínov C a S. Karboxylácia umožňuje proteínom naviazať vápenaté ióny, čo je zásadné pre ich správnu funkciu. Nekarboxylované koagulačné faktory sú biologicky neaktívne a spôsobujú prerušenie koagulačnej kaskády. WAR sa ireverzibilne viaže na VKORC1, podjednotku 1 enzýmu VKOR, a tak dochádza k postupnému vyčerpaniu aktívnej formy vitamínu K. Keďže účinok nie je priamy, jeho účinok je oneskorený a antikoagulačný efekt nastupuje v priebehu piatich až siedmych dní. Na obr. 2 je schematicky znázornený mechanizmus účinku WAR[4–6].

WAR je podávaný prevažne perorálnou formou, má vysokú biologickú dostupnosť a je takmer úplne absorbovaný v gastrointestinálnom trakte. Maximálnu plazmatickú koncentráciu dosahuje v priebehu 1,5 až 4 hodín. V krvi je z 99 % viazaný na plazmatické bielkoviny, najmä albumín, vďaka čomu má malý distribučný objem 0,08–0,12 l kg^{-1}. WAR je racemická zmes *S*- a *R*-enantioméru, pričom *S*-WAR je tri- až päťkrát účinnejší, a má teda hlavný vplyv na antikoagulačný efekt[2,4].

Metabolizmus prebieha prevažne v hepatocytoch prostredníctvom enzýmov cytochrómov P450 (CYP), pričom každý z enantiomérov je metabolizovaný inou cestou. Hlavnou metabolickou dráhou je oxidácia na hydroxyderiváty. Hlavným enzýmom je CYP2C9, ktorý katalyzuje oxidáciu na 6- a 7-hydroxy-*S*-warfarín. Metabolizmus *R*-warfarínu je komplexnejší, prebieha najmä za účasti enzýmov CYP1A1, CYP1A2 a CYP3A4 za vzniku hydroxyderivátov *R*-WAR. Za účasti iných izoenzýmov CYP vznikajú aj ďalšie oxidačné produkty *S*- a *R*-WAR. V menšej miere môžu deriváty *R*-WAR podliehať konjugácii s glukoronidmi alebo sulfátmi, avšak táto dráha sa ukazuje u ľudí ako zanedbateľná. Minoritnou dráhou, nezávislou na enzýmoch CYP, je aj redukcia ketoskupiny na alkoholové metabolity[2].

WAR je takmer úplne metabolizovaný a len minimálne množstvo je vylúčené v nezmenenej podobe. Vylučovaný je prevažne močom (80 %) a menej stolicou (20 %). Eliminačný polčas je veľmi variabilný a vplýva naň veľa individuálnych parametrov. Pre *S*-WAR sa pohybuje v rozpätí 24–33 hodín a pre *R*-WAR 35–58 hodín. Keďže *R*-WAR má dlhší polčas eliminácie, prispieva k udržiavaniu ustálenej plazmatickej koncentrácie medzi jednotlivými dávkami. WAR prechádza cez placentárnu bariéru, a preto sa počas tehotenstva, najmä 1. a 3. trimestra, jeho užívanie



Obr. 2. **Mechanizmus účinku WAR v organizme**

neodporúča, vzhľadom na riziko teratogenity. Naopak do materského mlieka v klinicky významnom množstve neprechádza, a preto je počas dojčenia považovaný za bezpečný[2,5].

Keďže ide o liečivo, ktoré má úzky terapeutický index a veľkú interindividuálnu variabilitu, nastavenie dávkovania je veľmi náročné. Najmä počas počiatočnej fázy liečby môže dochádzať ku komplikáciám spôsobeným nedostatočnou koaguláciou alebo naopak nadmerným zriedením krvi s rizikom vykrvácania. Na monitorovanie dávkovania WAR sa používa medzinárodný normalizovaný pomer (INR, z angl. international normalized ratio). Počíta sa ako pomer protrombínového času, doby vytvorenia zrazeniny vo vzorke krvi po pridaní činidla, pacienta k referenčnému času. Nižšia hodnota naznačuje zvýšenú zrážanlivosť krvi. Fyziologická hodnota INR má hodnotu okolo 1,0 a pri warfarínovej terapii je približne v rozsahu 2,0–3,0, prípadne vyššia[7].

Z genetického hľadiska má na tieto rozdiely najväčší vplyv polymorfizmus v dvoch génoch, a to pre už spomínané enzýmy VKORC1 a CYP2C9. Tie ovplyvňujú rýchlosť metabolizmu a citlivosť organizmu na WAR. Medzi klinické faktory patrí hlavne vek, pohlavie, telesná hmotnosť, prípadné ďalšie ochorenia a súbežne užívané lieky. Rovnako dôležité sú aj environmentálne podmienky a stravovacie návyky pacienta. Jedným z hlavných faktorov je príjem vitamínu K v potrave, ktorý priamo ovplyvňuje účinok WAR. Medzi ďalšie faktory patrí fajčenie, konzumácia alkoholu a črevný mikrobióm[5].

Potreba neustáleho monitorovania INR a nebezpečné vedľajšie účinky viedli k vývoju novej generácie perorálnych antikoagulačných liečiv (DOAC, z angl. direct oral anticoagulants). DOAC majú menej potravinových a liekových interakcií, jednoduchšie nastavenie dávkovania a menšie riziko vnútorného krvácania. Napriek týmto výhodám je pre určité skupiny pacientov a indikácie, napríklad v prípade mechanických srdcových chlopní alebo pri renálnej insuficiencii, warfarín stále jedinou schválenou možnosťou perorálnej antikoagulačnej liečby. Okrem toho je liečba DOAC násobne drahšia, čo v klinickej praxi predstavuje veľké obmedzenie[8].

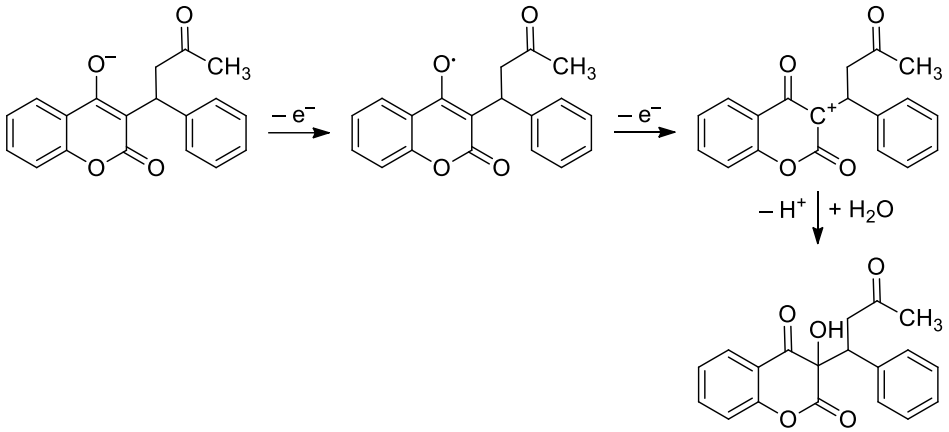
2.3. Elektrochemické vlastnosti

Elektrochemická oxidácia WAR predstavuje ireverzibilný proces, v ktorom je kľúčová hydroxylová skupina na kumarínovom jadre. Tá je významná aj z hľadiska biologického účinku WAR, pretože interaguje s enzýmom VKORC1. Elektrochemické metódy môžu do určitej miery slúžiť na simuláciu dejov prebiehajúcich v organizme.

Schéma mechanizmu popísaného v práci[9] je uvedená na obr. 3. Oxidácia je realizovaná ako dvojkrokový proces, pri ktorom sú spotrebované dva elektróny. V prvom kroku dochádza k oxidácii hydroxylovej skupiny na veľmi reaktívny radikál. Ten v druhom kroku rýchlo podlieha ďalšej oxidácii a vzniká chinónová štruktúra, ktorá je stabilná vďaka konjugácii π-elektrónov.

3. Stanovenie warfarínu

Vzhľadom na riziko závažných vedľajších účinkov a úzky terapeutický index má spoľahlivé stanovenie WAR veľký význam. V posledných rokoch narastá záujem zapo-



Obr. 3. **Schéma elektrochemickej oxidácie WAR**

jiť pacientov do kontroly ich zdravotného stavu, čo podporuje rozvoj zariadení typu point-of-care (POC), ktoré umožňujú rýchle a jednoduché monitorovanie hladiny WAR v krvi. Zásadné je aj presné a spoľahlivé stanovenie WAR vo farmaceutických vzorkách s cieľom zabezpečiť ich kvalitu a stabilitu. Preto má vývoj rýchlych, cenovo dostupných a citlivých metód veľký význam.

3.1. Neelektrochemické metódy stanovenia

Medzi najčastejšie používané metódy patria chromatografické a spektrofotometrické techniky. Z hľadiska citlivosti, selektivity a možnosti separácie enantiomérov dominuje vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) kombinovaná s UV-Vis spektrofotometriou, fluorimetriou alebo hmotnostnou spektrometriou ako detekčnou technikou. Príkladom je metóda na simultánne stanovenie 18 látok vrátane WAR pomocou kvapalinovej chromatografie s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (LC-MS/MS). V práci bola skúmaná plná krv, plazma, ale aj menej časté vzorky, ako je sklovec a žlč. Bola dosiahnutá medza detekcie 19,7 nmol l^{-1} (hodnota bola vypočítaná na základe uvedenej medze stanoviteľnosti 20 ng ml^{-1}). Výhodou metódy je malá spotreba vzorky a jej jednoduchá predúprava. Za veľmi krátku dobu je možné stanoviť viacero látok podobnej povahy naraz, preto je vhodná pre forenznú toxikológiu[10].

Chromatografickými metódami je možné rozlíšiť a stanoviť jednotlivé enantioméry. Príkladom je práca, kde bola využitá HPLC s fluorescenčnou detekciou. Boli dosiahnuté medze detekcie 0,067 ppm (0,22 μmol l^{-1}) pre *R*-WAR a 0,090 ppm (0,29 μmol l^{-1}) pre *S*-WAR. Metóda je spoľahlivá, vhodná pre rutinné monitorovanie a bola aplikovaná na stanovenie v krvnej plazme pacientov na warfarínovej terapii[11].

Ďalším využitím týchto metód je sledovanie vzájomnej interakcie liečiv vo farmakokinetických štúdiách. Za použitia RP-HPLC s UV-detekciou bola vyvinutá metóda na simultánne stanovenie warfarínu, aspirínu a klopidogrelu, ktoré bývajú užívané v kombinácii pri takzvanej trojitej antitrombotickej liečbe. Metóda vykazovala dobrú linearitu v koncentračnom rozsahu 5–200 μg ml^{-1} (16–650 μmol l^{-1}). Bola dosiahnutá medza detekcie 4,9 nmol l^{-1} (hodnota bola vypočítaná na základe uvedenej medze stanoviteľnosti 5 ng ml^{-1}). Metóda bola taktiež hodnotená z pohľadu zelenej analytickej chémie, kde dosiahla uspokojivé výsledky[12].

Používané sú aj iné chromatografické metódy. Plynová chromatografia s elektrónovou ionizáciou a tandemovou hmotnostnou spektrometriou (GC-EI-MS/MS) bola použitá na stanovenie WAR a jeho piatich hydroxyderivátov s využitím Fentonovej reakcie. Bola dosiahnutá linearita v koncentračnom rozsahu 26–1543 ng ml^{-1} (84–5005 nmol l^{-1})a medze detekcie pre jednotlivé analyty v rozsahu 18,7–67,0 ng ml^{-1} (60,7–217 nmol l^{-1}). Keďže umožňuje stanoviť WAR aj jeho degradačné produkty, je vhodná na monitorovanie životného prostredia, napríklad vo vzorkách odpadových vôd[13].

Zaujímavú a novú alternatívu stanovenia WAR predstavuje práca, v ktorej bol použitý fluorescenčný senzor založený na uhlíkových kvantových bodkách dopovaných dusíkom (NCD). Tie boli syntetizované jednoduchou a rýchlou mikrovlnnou metódou z biomasy a metóda je vhodná aj z pohľadu zelenej chémie. Senzor bol za účelom zlepšenia selektivity kombinovaný so zariadením, ktoré využíva algoritmus strojového učenia, čo umožňuje stanovenie aj v zložitých a neznámych vzorkách. Medza detekcie WAR dosahovala hodnotu 0,039 μmol l^{-1}. Senzor bol aplikovaný na stanovenie WAR a jeho metabolitov vo vzorkách krvnej plazmy a stojatej vody[14].

Spektrofotometrické metódy sú vhodné predovšetkým na stanovenie WAR vo farmaceutických vzorkách, napríklad na kontrolu kvality počas výroby. Zároveň je to metóda uvádzaná v liekopisoch, vrátane Českého liekopisu[15], ako metóda stanovenia obsahu účinnej látky. Vďaka dobrej absorbancii WAR je metóda dostatočne citlivá, reprodukovateľná, a preto často používaná. Naopak spektrofotometrické metódy nie sú vhodné pre komplexné

biologické matrice alebo v prípadoch, kedy je nutné rozlíšiť jednotlivé enantioméry WAR.

3.2. Elektrochemické metódy stanovenia

Elektrochemické metódy predstavujú vhodnú alternatívu chromatografických a spektrofotometrických metód a získavajú si stále väčšiu pozornosť. K hlavným výhodám patrí jednoduché experimentálne usporiadanie, nenáročná manipulácia a ekonomická nenáročnosť, vďaka čomu sú vhodné aj pre menšie laboratória. Spravidla nie je potrebná zložitá predúprava vzorky. Sú menej náročné na spotrebu chemikálií, čo súvisí s nižšou tvorbou odpadu a zvyšuje udržateľnosť v súlade s princípmi zelenej chémie. Dôležitou analytickou prednosťou je rýchla analýza a vysoká citlivosť a selektivita. Veľkou výhodou je možnosť miniaturizácie, čo umožňuje ich využitie v prenosných zariadeniach vhodných pre merania v teréne. Vďaka týmto vlastnostiam majú uplatnenie v širokej škále oblastí analytickej chémie, hlavne vo farmaceutickej a environmentálnej analýze, potravinárstve či klinickej diagnostike.

Elektródový materiál zohráva dôležitú úlohu pri vývoji elektroanalytickej metódy. Nemodifikované elektródy sú častokrát voľbou vďaka ich jednoduchosti, cenovej dostupnosti a ich citlivosť je pre veľa aplikácií dostačujúca. Príkladom je práca Hasmemi a spol.[16], v ktorej bol vyvinutý jednoduchý, lacný a citlivý senzor založený na uhlíkovej pastovej elektróde (CPE). Za optimálnych podmienok bol získaný lineárny rozsah koncentrácií 30–3000 μmol l^{-1} a medza detekcie 0,315 μmol l^{-1}. Senzor vykazoval vysokú selektivitu k WAR aj v prítomnosti interferujúcich látok, napr. sodných a chloridových iónov či glukózy. Pri stanovení v tabletách bola dosiahnutá relatívna smerodajná odchýlka koncentrácie WAR 2,50 %, čo poukazuje na dobrú spoľahlivosť a reprodukovateľnosť senzora.

Nemodifikovaná elektróda bola využitá aj v práci de Jesus Guedes a spol.[17]. Bola vyvinutá metóda na stanovenie WAR technikami vsádzkovej injekčnej analýzy (BIA) a prietokovej injekčnej analýzy (FIA) pomocou multipulznej ampérometrie (MPA) na bórom dopovanej diamantovej elektróde (BDDE) s katodickou predúpravou. V prostredí fosfátového tlmivého roztoku o pH 7,0 s 10% obsahom etanolu bol určený lineárny rozsah koncentrácií 2–400 μmol l^{-1} pre BIA-MPA a 4–400 μmol l^{-1} pre FIA-MPA. Medze detekcie boli určené na 0,36 μmol l^{-1} pre BIA-MPA a 0,51 μmol l^{-1} pre FIA-MPA. Výhodami vyvinutých metód sú jednoduchá manipulácia, rýchlosť analýzy a vysoká frekvencia stanovení – 94 analýz za hodinu pre FIA-MPA a 130 analýz za hodinu pre BIA-MPA.

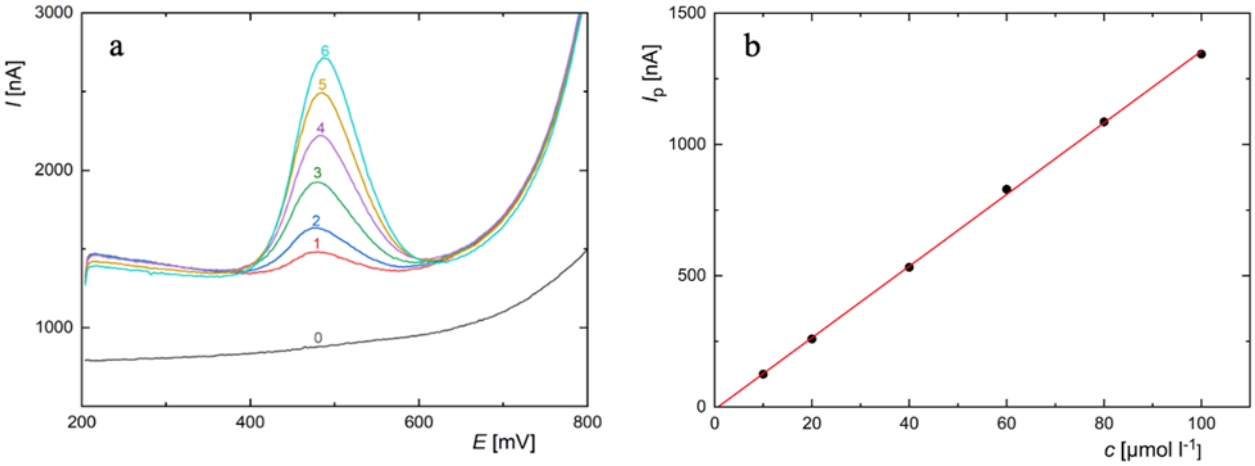
V ďalšej práci de Jesus Guedes a spol.[18] bol vyvinutý jednoduchý elektrochemický kit pre stanovenie desiatich liečiv s úzkym terapeutickým indexom, vrátane WAR. Využitá bola zostava BIA-MPA a sieťotlačová uhlíková elektróda (SPCE). Prostredím bol fosfátový tlmivý roztok o pH 7,0 s 10% obsahom etanolu. Pre WAR bola určená linearita v koncentračnom rozsahu 2–100 μmol l^{-1} a medza detekcie 0,07 μmol l^{-1}. Vyvinutá metóda umožňuje spoľahlivé stanovenie vo farmaceutických vzorkách s možnosťou miniaturizácie do prenosného zariadenia.

Modifikácia elektródy dokáže zabezpečiť väčší aktívny povrch, vyššiu elektrokatalytickú aktivitu a efektívnejší prechod elektrónov. Vďaka tomu poskytujú modifikované elektródy zlepšenie analytických vlastností, ako je zvýšenie citlivosti a zníženie medzí detekcie a stanoviteľnosti, rozšírenie lineárneho rozsahu stanovenia či zlepšenie opakovateľnosti. Častokrát sú vzorkami zložitejšie matrice, napr. moč alebo krv, kde dochádza k problémom s interferentami, ktorým sa dá predísť vhodnou modifikáciou elektródy, čím sa zvýši selektivita k cieľovému analytu. Príkladom je práca Taei a spol.[19], v ktorej bol vyvinutý senzor založený na CPE modifikovanej viacstennými uhlíkovými nanorúrkami a nanočasticami $ZnCrFeO_4$. V prostredí fosfátového tlmivého roztoku o pH 4,5 s obsahom chloridu sodného bol získaný širší lineárny koncentračný rozsah 0,02–920 μmol l^{-1}. Modifikáciou bola dosiahnutá vyššia vodivosť, lepšia citlivosť a nízka medza detekcie 0,003 μmol l^{-1}. Senzor bol aplikovaný na stanovenie v reálnych vzorkách komerčných tabliet, krvného séra a moču.

Keďže WAR je racemická zmes, niektoré štúdie sa zameriavajú na vývoj senzora na stanovenie enantiomérov. Na ich rozlíšenie bola CPE modifikovaná 3,4,9,10-perylénetetrakarboxylovou kyselinou, ktorá špecificky interaguje s enantiomérmi WAR. Lineárna závislosť koncentrácie bola získaná v rozsahu 5–160 μmol l^{-1} a medze detekcie boli 3,09 μmol l^{-1} pre *R*-WAR a 4,02 μmol l^{-1} pre *S*-WAR. Metóda bola aplikovaná na stanovenie v krvnej plazme a v moči s výťažnosťou 97,1–102,9 % (cit.[20]).

Príkladom potenciometrického stanovenia WAR je práca Saeedi a spol.[21], ktorá sa zaoberá vývojom elektrochemického senzora založeného na iónovo-selektívnej elektróde (ISE) pre priame stanovenie warfarínu v krvi. Cieľom štúdie bolo vyvinúť senzor vhodný pre POC zariadenie umožňujúce rýchle a citlivé stanovenie bez nutnosti predúpravy vzorky. Vyvinutý senzor obsahoval membránu z polyvinylchloridu s tetradodecylammonium chloridom ako aniónovým meničom. Merania prebiehali vo fosfátovom tlmivom roztoku o pH 7,4 a vo vzorkách celkovej krvi. Vyvinutý senzor preukázal vysokú citlivosť s medzou detekcie 0,125 μmol l^{-1} vo fosfátovom tlmivom roztoku, resp. 14,1 μmol l^{-1} v krvi. Senzor vykazoval rýchlu odozvu, dobrú opakovateľnosť a vysokú selektivitu voči interferujúcim iónom, chloridom a salicylátom.

V rámci prác[22,23] bolo študované elektrochemické chovanie WAR na SPCE a kompozitnej elektróde z ultračistého grafitu (UTGE). Na SPCE bola vyvinutá metóda pre stanovenie WAR pomocou techník DC voltampérometrie (DCV) a diferenčnej pulznej voltampérometrie (DPV). V prostredí Brittonovho-Robinsonovho (BR) tlmivého roztoku o pH 7,0 bola pre obe techniky získaná lineárna závislosť v rozsahu koncentrácií 4–10 a 10–100 μmol l^{-1}. Vyššia citlivosť sa potvrdila pre pulznú techniku DPV, pre ktorú bola medza detekcie 0,26 μmol l^{-1}, zatiaľ čo pre DCV bola 1,1 μmol l^{-1}. Ako príklad je na obr. 4 uvedený záznam voltampérogramov a príslušnej koncentračnej závis-

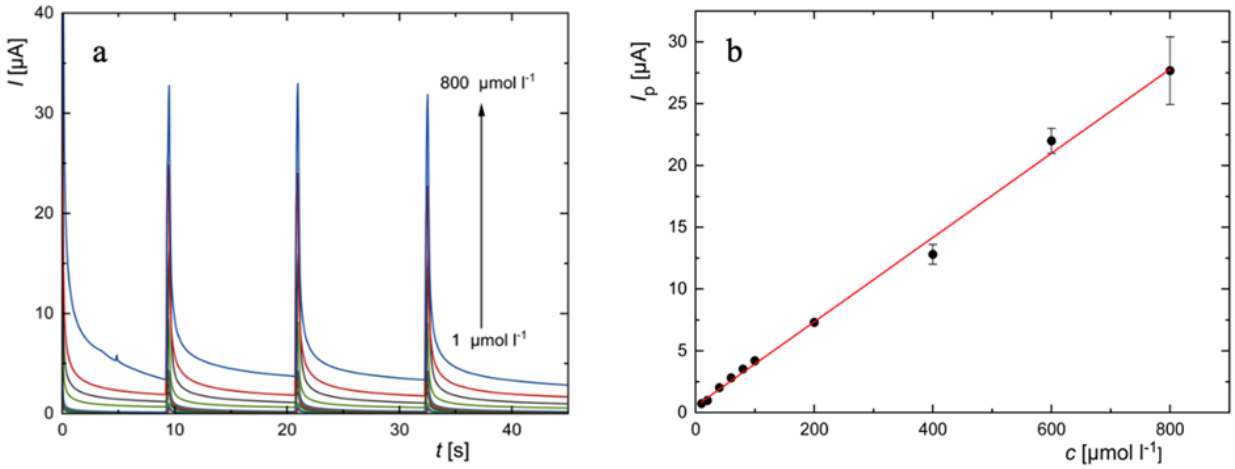


Obr. 4. **(a) DP voltampérogramy WAR o koncentráciách 0 (0), 10 (1), 20 (2), 40 (3), 60 (4), 80 (5) a 100 (6) μmol l^{-1} na SPCE v prostredí BR tlmivého roztoku o pH 7,0. (b) Kalibračná závislosť výšky píku (I_p) na koncentrácii WAR.** Parametre DPV: rýchlosť nárastu potenciálu 20 mV s^{-1}, výška pulzu 50 mV, šírka pulzu 100 ms (prúd vzorkovaný posledných 20 ms), perióda pulzu 150 ms (cit.[22])

losti na SPCE pomocou techniky DPV (cit.[22]). V ďalšej metóde bola využitá UTGE spolu s technikou DPV. V prostredí BR tlmivého roztoku o pH 8,0 bola získaná lineárna koncentračná závislosť v rozsahu 8–200 μmol l^{-1}. Medza detekcie bola určená na 0,84 μmol l^{-1} (cit.[23]).

V rámci ďalšieho vývoja bola SPCE využitá v kombinácii so vsádzkovou injekčnou analýzou s ampérometrickou detekciou (BIA-AD). Za optimálnych podmienok bola získaná lineárna koncentračná závislosť v rozsahu 1–800 μmol l^{-1} a bola určená medza detekcie 2,0 μmol l^{-1}. Na obr. 5 sú uvedené ampérogramy koncentračnej závislosti. Kľúčovou výhodou tejto metódy je rýchla odpoveď a jednoduchá manipulácia, čo ju robí mimoriadne vhodnou pre aplikáciu v praxi. Všetky vyvinuté metódy boli úspešne aplikované na stanovenie obsahu účinnej látky WAR v tabletách, čo potvrdilo ich využiteľnosť pre farmaceutickú analýzu[23].

Prehľad elektrochemických metód stanovenia WAR je uvedený v tab. I. Výsledky ukazujú, že elektrochemické metódy poskytujú rýchle a citlivé možnosti stanovenia WAR v rozličných typoch vzoriek. Kombinácia s rôznymi materiálmi a detekčnými technikami umožňuje ich ďalší rozvoj a širšie uplatnenie v oblasti analytickej chémie.



Obr. 5. **(a) Ampérogramy zaznamenané technikou BIA-AD na SPCE v prostredí BR tlmivého roztoku o pH 7,0 pre rozsah koncentrácií roztoku WAR 1–800 μmol l^{-1}. (b) Kalibračná závislosť výšky píku (I_p) na koncentrácii WAR;** chybové úsečky pre n = 3. Parametre BIA-AD: detekčný potenciál +1,0 V, dávkovaný objem 60 μl, rýchlosť dávkovania 286,3 μl s^{-1} (cit.[23])

Tabuľka I
Prehľad elektrochemických metód stanovenia WAR

Pracovná elektróda	Technika	Prostredie	Lineárny rozsah [μmol l^{-1}]	*LOD* [μmol l^{-1}]	Reálne vzorky	Lit.
CPE	DPV	FP (pH 4,5)	30–3000	0,315	tablety	16
HMDE	SWAdCSV	BRP (pH 5,0)	0,005–0,4	0,00065	tablety, sérum, moč	24
Fe_3O_4/CPE	SWAdASV	FP (pH 6,0)	0,5–1000	0,21	tablety, sérum, moč	9
$MnFe_2O_4$/MWCNT/CPE	DPV	FP (pH 4,0)	0,1–440,0	0,08	tablety, injekčný roztok, sérum, moč	25
$ZnCrFeO_4$/MWCNT/CPE	DPV	FP (pH 4,0)	0,02–920,0	0,003	tablety, sérum, moč	19
β-CD/MWCNT/Co_3O_4NP/CPE	DPV	FP (pH 5,0)	0,05–150	0,02	moč, sérum	26
CdS-QD/CS/MWCNT/GCE	DPSV	FP (pH 2,0)	0,05–80	0,0085	moč, sérum, materské mlieko	27
Co_xO_y-NP/MWCNT/GCE	DPAdSV	FP (pH 6,0)	0,008–50 50–800	0,0033	moč, plazma	28
PTCA/CBPE	DPV	BRP (pH 7,0)	5–160	3,09 (*R*-WAR) 4,02 (*S*-WAR)	moč, plazma	20
Ni_3C/CPE	DPV	FP (pH 6,0)	0,008–1,5	0,0021	–	29
NiPILNF/GCE	SWV	FP (pH 7,0)	1–100	0,15	tablety	30
MIP/NPGL/GE	CV	FP (pH 7,5)	0,0001–0,08	0,00041	krv	31
$PrAlO_3$-NP/GCE	CV	FP (pH 7,2)	19,5–5000	19,5	voda	32
ISE	potenciometria	FP (pH 7,4)	0,316–1000	0,125	krv	21
BDDE	BIA-MPA	FP (pH 7,0)	2–400	0,36	tablety	17
BDDE	FIA-MPA	FP (pH 7,0)	4–400	0,51	tablety	17
SPCE	BIA-MPA	FP (pH 7,0)	2–100	0,07	tablety	18
SPCE	DCV	BRP (pH 7,0)	4–100	1,05	tablety	22
SPCE	DPV	BRP (pH 7,0)	4–100	0,26	tablety	22
UTGE	DPV	BRP (pH 8,0)	8–200	0,84	tablety	23
SPCE	BIA-AD	BRP (pH 7,0)	1–800	2,0	tablety	23

Skratky nedefinované v predchádzajúcom texte: *LOD* – medza detekcie; FP – fosfátový tlmivý roztok (pufor); HMDE – visiaca ortuťová kvapková elektróda; SWAdCSV – square wave adsorpčná katodická rozpúšťacia voltampérometria; BRP – Brittonov-Robinsonov tlmivý roztok (pufor); Fe_3O_4/CPE – uhlíková pastová elektróda modifikovaná nanočasticami Fe_3O_4; SWAdASV – square wave adsorpčná anodická rozpúšťacia voltampérometria; $MnFe_2O_4$/MWCNT/CPE – uhlíková pastová elektróda modifikovaná viacstennými uhlíkovými nanorúrkami a $MnFe_2O_4$; $ZnCrFeO_4$/MWCNT/CPE – uhlíková pastová elektróda modifikovaná viacstennými uhlíkovými nanorúrkami a $ZnCrFeO_4$; β-CD/MWCNT/Co_3O_4-NP/CPE – uhlíková pastová elektróda modifikovaná β-cyklodextrínom, viacstennými uhlíkovými nanorúrkami a nanočasticami Co_3O_4; CdS-QD/CS/MWCNT/GCE – sklovitá uhlíková elektróda modifikovaná chitosanovým filmom a viacstennými uhlíkovými nanorúrkami s kovalentne imobilizovanými kvantovými bodkami; DPAdSV – diferenčná pulzná adsorpčná rozpúšťacia voltampérometria; Co_xO_y-NP/MWCNT/GCE – sklovitá uhlíková elektróda modifikovaná nanočasticami oxidu kobaltu a viacstennými uhlíkovými nanorúrkami; PTCA/CBPE – pastová elektróda z uhlíkovej černe modifikovaná 3,4,9,10-perylén-tetrakarboxylovou kyselinou; Ni_3C/CPE – uhlíková pastová elektróda modifikovaná karbidom niklu; NiPILNF/GCE – sklovitá uhlíková elektróda modifikovaná nanokompozitom poly(MImEO8BS)-Ni a Nafionu; MIP/NPGL/GE – zlatá elektróda s molekulárne imprintovaným polymérom na nanoporéznom zlatom filme; CV – cyklická voltampérometria; $PrAlO_3$-NP/GCE – sklovitá uhlíková elektróda modifikovaná perovskitovými nanočasticami.

4. Záver

Warfarín má aj po zavedení nových generácií perorálnych antikoagulancií kľúčový význam v antikoagulačnej terapii. Jeho úzky terapeutický index si však vyžaduje presné sledovanie koncentrácie v krvi, pretože bez spoľahlivej kontroly dávky hrozí riziko závažného krvácania alebo naopak nedostatočná účinnosť terapie. Stanovenie warfarínu v biologických a farmaceutických vzorkách je kľúčové pre zabezpečenie bezpečnej a účinnej liečby.

Tento referát poskytuje prehľad vyvinutých elektrochemických metód a ich aplikácií pre stanovenie warfarí-

nu. Elektrochemické metódy sa vyznačujú vysokou citlivosťou, jednoduchou manipuláciou, nízkymi prevádzkovými nákladmi a rýchlou analýzou, vďaka čomu sa ukazujú pre stanovenie warfarínu ako ideálny nástroj. Vďaka moderným elektródovým materiálom a využitiu pokročilých detekčných techník umožňujú tieto metódy selektívne a presné stanovenie warfarínu aj v komplexných biologických matriciach. Možnosť miniaturizácie elektrochemických systémov navyše umožňuje ich využitie v point-of-care (POC) zariadeniach pre rýchlu analýzu warfarínu *in situ*. Tieto metódy tak nachádzajú široké uplatnenie v klinickej praxi pri monitorovaní liečby, ale aj pri kontrole kvality farmaceutických preparátov.

Táto práca bola vypracovaná v rámci Špecifického vysokoškolského výskumu (projekt SVV 260793).

LITERATÚRA

1. Pirmohamed M.: Brit. J. Clin. Pharmacol. *62*, 509 (2006).
2. Ufer M.: Clin. Pharmacokinet. *44*, 1227 (2005).
3. Dimitrokalli E., Fertaki S., Lykouras M., Kokkinos P., Orkoula M., Kontoyannis C.: Molecules *26*, 6631 (2021).
4. Tadros R., Shakib S.: Aust. Fam. Physician *39*, 476 (2010).
5. Soyata A., Nur Hasanah A., Rusdiana T.: Indones. J. Pharm. *2*, 69 (2020).
6. Elango K., Javaid A., Khetarpal B. K., Ramalingam S., Kolandaivel K. P., Gunasekaran K., Ahsan C.: Cells *10*, 773 (2021).
7. Mathur A., Sharma A.: Asian J. Pharm. Clin. Res. *17*, 80 (2024).
8. Vinogradova Y., Coupland C., Hill T., Hippisley-Cox J.: Br. Med. J. *362*, k2505 (2018).
9. Gholivand M. B., Torkashvand M., Yavari E.: Mater. Sci. Eng. C *48*, 235 (2015).
10. Drague A., Escal J., Bidat C., Dellinger S., Hodin S., Duband S., Feliu C., Delavenne X.: J. Pharm. Biomed. Anal. *257*, 116709 (2025).
11. Putriana N. A., Rusdiana T., Rostinawati T., Nurfuadah I.: J. Pharm. Bioall. Sci. *16*, 44 (2024).
12. AlSawy N. S., ElKady E. F., Mostafa E. A.: J. Chromatogr. Sci. *62*, 380 (2024).
13. von Törne W. J., Klyk-Seitz U.-A., Piechotta C.: Environ. Sci. Pollut. Res. *31*, 16986 (2024).
14. Li J., Wu S., Shi X., Cao Y., Hao H., Wang J., Han Q.: Langmuir *41*, 1694 (2025).
15. *Warfarinum natricum*, *Český lékopis*. Státní ústav pro kontrolu léčiv, Praha 2023.
16. Hashemi M., Rahimnejad M., Ezoji H.: Monatsch. Chem. *155*, 29 (2024).
17. de Jesus Guedes T., Antônio Reis Andrade G., Barbosa Lima A.: Electroanalysis *29*, 2340 (2017).
18. de Jesus Guedes T., Pio dos Santos W. T.: Electroanalysis *30*, 1740 (2018).
19. Taei M., Abedi F.: Chin. J. Catal. *37*, 436 (2016).
20. Zilberg R. A., Maistrenko V. N., Zagitova L. R., Guskov V. Y., Dubrovsky D. I.: J. Electroanal. Chem. *861*, 113986 (2020).
21. Saeedi I., Ahmadi S., Thompson M., Hashemi P., Ramezani Z.: Chemosensors *10*, 44 (2022).
22. Žužičová V.: *Voltampérometrické stanovenie warfarínu na sieťotlačovej uhlíkovej elektróde*. *Bakalárska práca*. Univerzita Karlova, Praha 2023.
23. Žužičová V.: *Využitie voltampérometrie a ampérometrie pri stanovení warfarínu*. *Diplomová práca*. Univerzita Karlova, Praha 2025.
24. Ghoneim M. M., Tawfik A.: Anal. Chim. Acta *511*, 63 (2004).
25. Taei M., Hasanpour F., Basiri F., Tavakkoli N., Rasouli N.: Microchem. J. *129*, 166 (2016).
26. Gholivand M.-B., Solgi M.: Anal. Chim. Acta *1034*, 46 (2018).
27. Gholivand M. B., Mohammadi-Behzad L.: Mater. Sci. Eng. C *57*, 77 (2015).
28. Gholivand M. B., Solgi M.: Electrochim. Acta *246*, 689 (2017).
29. Torkashvand M., Gholivand M. B., Taherpour A., Boochani A., Akhtar A.: J. Pharm. Biomed. Anal. *139*, 156 (2017).
30. Molaakbari E., Mostafavi A., Beitollahi H., Tohidiyan Z.: Talanta *171*, 25 (2017).
31. Li Y., Zhang L., Liu J., Zhou S.-F., Al-Ghanim K. A., Mahboob S., Ye B.-C., Zhang X.: RSC Adv. *6*, 43724 (2016).
32. Ansari A. A., Alam M.: Biosensors *12*, 92 (2022).

V. Žužičová and V. Vyskočil *(Charles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Prague, Czech Republic):* **Application of Electrochemical Analytical Methods in the Determination of the Drug Warfarin**

Warfarin is an anticoagulant drug with a narrow therapeutic index. Its accurate determination is essential to ensure effective and safe treatment, as even small deviations can lead to serious adverse effects. A wide range of analytical methods have been developed for its determination, including spectrometric and separation techniques. Electrochemical methods are characterized by simple experimental setups and low costs, while enabling rapid analysis with high sensitivity and acceptable selectivity. Owing to these advantages, they represent an effective alternative for determining drugs and are used in clinical diagnostics, drug quality control, and environmental analyses of drug metabolites. This review discusses the physicochemical and biological properties of warfarin and compares various analytical approaches to its determination, with an emphasis on electrochemical methods.

Full text English translation is available in the on-line version.

Keywords: electrochemistry, drug analysis, warfarin, anticoagulants, voltammetry, amperometry

Acknowledgements
This research was carried out within the framework of the Specific Charles University Research (SVV 260793).

Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.