

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Mr Katica M. Drljević-Đurić, dipl.hem.

**PROUČAVANJE ELEKTROHEMIJSKE
AKTIVNOSTI I TRANSFORMACIJA
MAKROLIDNIH ANTIBIOTIKA**

-Doktorska disertacija-

Beograd, 2011. godine

**UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET**

Mentor:

Dr Slobodan D. Petrović, redovni profesor
Tehnološko-metalurški fakultet u Beogradu

Članovi komisije:

Dr Milka Avramov Ivić, naučni savetnik IHTM

Dr Vlatka Vajs, redovan profesor, Hemijski fakultet u Beogradu

Dr Sote Vladimirov, redovan profesor, Farmaceutski fakultet u Beogradu

Dr Dušan Mijin, vanredni profesor, Tehnološko-metalurški fakultet u Beogradu

Datum odbrane: _____

Eksperimentalni deo ove disertacije urađjen je na IHTM-u, u Institutu za elektrohemiju i Centru za hemiju IHTM, na katedri za Organsku hemiju TMF Univerziteta u Beogradu, u laboratoriji za toksikologiju Vojno medicinske akademije, kao i u Agenciji za lekove i medicinska sredstva Republike Srbije.

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije finansirana su od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije (broj projekta I42063).

Temu za rad predložio je dr Slobodan Petrović redovni, profesor Tehnološko-metalurškog fakulteta koji je i rukovodio radom. Ovom prilikom mu se zahvaljujem za svu pruženu pomoć.

Zahvaljujem i Dr Milki Avramov Ivić, naučnom savetniku IHTM, komentoru ove disertacije koja je učestvovala u rukovodjenju i celokupnoj realizaciji ove disertacije.

Takodje zahvalnost dugujem i ostalim članovima komisije na savetima tokom pisanja ovog rada.

Posebnu zahvalnost dugujem mojoj porodici na velikoj moralnoj podršci.

PROUČAVANJE ELEKTROHEMIJSKE AKTIVNOSTI I TRANSFORMACIJA MAKROLIDNIH ANTIBIOTIKA

IZVOD

Cilj ove disertacije bio je da se ispitivanjem elektrohemijske aktivnosti makrolidnih antibiotika roksitromicina i midekamicina i poredjenjem dobijenih rezultata sa rezultatima ranije ispitanih azitromicina, klaritromicina i eritromicina izvede opšti zaključak o elektrohemijskom ponašanju ispitanih makrolidnih antibiotika, njihovim mogućim elektrohemijskim transformacijama kao i o mogućnosti njihovog kvalitativnog i kvantitativnog određivanja. Posebno je razmatrana mogućnost primene novih voltametrijskih metoda za određivanja makrolidnih antibiotika kao sastojaka komercijalnih i bioloških uzoraka.

Na osnovu detaljnog ispitivanja elektrohemijskog ponašanja roksitromicina metodama ciklične voltametrije i diferencijalne pulsne voltametrije i midekamicina metodom ciklične voltametrije na elektrodi od zlata, simultano praćeno HPLC i LC/MS metodama kvalitativno i kvantitativno analitički su određene farmaceutske supstance roksitromicin i midekamicin, a roksitromicin i kao sastojak komercijalnog roksitromicina (Runac[®] tablete) i biološke tečnosti (humani urin).

Poredjenjem sa ranije ispitivanim makrolidnim antibioticima pod istim uslovima, utvrđeno je da su azitromicin, roksitromicin i midekamicin kvalitativno i kvantitativno analitički određeni. Eritromicin i klaritromicin su određeni kvalitativno a transformacije kojima podležu, za razliku od azitromicina, roksitromicina i midekamicina su praćene FTIR i HPLC metodama.

Ključne reči: makrolidni antibiotici, elektrohemijsko ponašanje, roksitromicin, midekamicin, ciklična voltametrija, diferencijalna pulsna voltametrija, visoko efikasna tečna hromatografija, masena spektrometrija.

**STUDY OF ELECTROCHEMICAL ACTIVITY AND TRANSFORMATIONS
MACROLIDES ANTIBIOTICS**

ABSTRACT

The aim of the present PhD thesis was to examine the electrochemical activity of macrolide antibiotics roxithromycin and midecamycin and to compare with the previously investigated azithromycin, clarithromycin and erythromycin in order to have general conclusion concerning electrochemical behavior of macrolide antibiotics. That means, their possible electrochemical transformations as well as the possibility of their quantitative and qualitative determination. Separately was analysed the possibility of the new voltammetric methods application for the determination of macrolide antibiotics and as a content of commercial and biological samples.

Taking into account the detailed investigation of the electrochemical behavior of roxithromycin by cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry and a midecamycin by cyclic voltammetry on gold electrode by simultaneous detection of antibiotics by HPLC and LC/MS methods. Their standards were quantitatively and qualitatively determined and roxithromycin was determined in the same manner and as a content of commercial tablets Runac[®] and as content of human urine.

The comparison with the previously investigated macrolide antibiotics under the identical experimental conditions, shown that azithromycin, roxithromycin and midecamycin are successfully quantitatively and qualitatively determined. Clarithromycin and erythromycin undergo to the electrochemical transformations during the qualitative determination and these transformations were simultaneously followed by HPLC and FTIR methods.

Key words: macrolide antibiotics, roxithromycin, midecamycin, electrochemical behaviour, cyclic voltammetry, differential pulse voltammetry, high performance liquid chromatography, mass spectrometry.

Skraćenice

HPLC- Visoko efikasna tečna hromatografija (High performance liquid chromatography)

TLC- Tankoslojna hromatografija (Thin layer chromatography)

HPTLC - Visoko efikasna tankoslojna hromatografija (High performance Thin layer chromatography)

GC- Gasna hromatografija (Gas chromatography)

LC-MS ili HPLC-MS - Tečna hromatografija sa masenim detektorom (Liquid chromatography/mass spectrometry)

LC-EC ili HPLC-EC- Tečna hromatografija sa elektrohemijskim detektorom (High Pressure Liquid Chromatography/Electrochemical Detection)

FTIR- Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (Fourier transform infrared spectroscopy)

ELISA-Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

UPLC- Ultra performance liquid chromatography

CV - Ciklična voltametrij

DPV-Diferencijalna pulsna voltametrij

THF- Tetrahidrofuran

TEA-Trietilamin

EtOAc-Etil-acetat

DEA-Dietilamin

SADRŽAJ

1. Uvod	1
2. Teorijski deo	3
2.1. Antibiotici	4
2.2. Makrolidni antibiotici	3
2.2.1. Eritromicin	7
2.2.2. Azitromicin	11
2.2.3. Klaritromicin	14
2.2.4. Roksitromicin	16
2.2.5. Midekamicin	19
2.2.6. Ostali značajni makrolidni antibiotici	22
2.3. Kvalitativno i kvantitativno određivanje makrolidnih antibiotika	25
2.3.1. Određivanje eritromicina	26
2.3.2. Određivanje azitromicina	27
2.3.3. Određivanje klaritromicina	28
2.3.4. Određivanje roksitromicina	29
2.3.5. Određivanje midekamicina	30
2.3.6. Određivanje ostalih značajnih makrolidnih antibiotika	31
2.3.7. Elektrohemijske metode	32
2.3.7.1. Voltometrija	34
2.3.7.2. Voltometrija sa linearnom promenom potencijala	37
2.3.7.3. Ciklična voltometrija	38
2.3.7.4. "Stripping" voltometrija (anodna , katodna i adsorpciona)	45
2.3.7.5. Pulsne metode	49
2.3.7.6. Voltometrija sa pravougaonim impulsima	50
2.3.7.7. Diferencijalna pulsna voltometrija i normalna pulsna voltometrija	51
2.3.8. Metode elektrohemijskog određivanja makrolidnih antibiotika opisane u literaturi	54

2.3.8.1. Elektrohemijsko određivanje eritromicina	54
2.3.8.2. Elektrohemijsko određivanje azitromicina	55
2.3.8.3. Elektrohemijsko određivanje klaritromicina	56
2.3.8.4. Elektrohemijsko određivanje roksitromicina	57
2.3.8.5. Elektrohemijsko određivanje midekamicina	58
2.3.9. Oficinalne metode određivanja makrolidnih antibiotika	58
3. Eksperimentalni deo	64
3.1. Materijali	64
3.1.1. Pripremanje standardnih rastvora i uzoraka roksitromicina	64
3.1.2. Pripremanje standardnih rastvora i uzoraka midekamicina	66
3.2. Aparati i uređaji	67
3.3. Metode	68
3.3.1. Ciklična voltometrija	68
3.3.2. Diferencijalna pulsna voltometrija	68
3.3.3. Tečna hromatografija	69
3.3.4. Masena spektrometrija	70
4. Rezultati i diskusija	71
4.1 Elektrohemijsko ponašanje roksitromicina	71
4.1.2 Proučavanje elektrohemijske aktivnosti roksitromicina pomoću ciklične voltometrije	71
4.1.3 Proučavanje elektrohemijske aktivnosti roksitromicina pomoću diferencijalne pulsne voltetrije	74
4.1.4. Proučavanje elektrohemijske aktivnosti roksitromicina kod komercijalnih tableta	78
4.1.5. Proučavanje elektrohemijske aktivnosti roksitromicina kod uzoraka urina	82
4.1.6. Preciznost kvantitativnog određivanja roksitromicina	85
4.2. Elektrohemijsko ponašanje midekamicina	85
4.3. Poređenje elektrohemijskog ponašanja eritromicina, azitromicina, klaritromicina, roksitromicina i midekamicina	93
5. Zaključak	97

6. Literatura

Biografija

Spisak objavljenih radova

1.UVOD

Makrolidni antibiotici su grupa makrocikličnih laktona, koji se najčešće sastoje od četrnaest, petnaest i šesnaest atoma za koji su vezani šećeri glikozidnom vezom. Makrociklični prsten se sastoji od atoma ugljenika i heteroatoma. Prisustvo amino grupe daje makrolidima karakter slabih baza. Makrolidni antibiotici deluju na gram pozitivne, a u nešto manjoj meri na gram negativne mikroorganizme. Eritromicin je najviše upotrebljavani makrolidni antibiotik. Efikasan je prema onim mikroorganizmima koji su otporni na dejstvo penicilina, streptomicina, tetraciklina i drugih antibiotika. Radi pronalaženja novih preparata poboljšanih antimikrobnih i farmakokinetičkih svojstava, sintetizovana je serija novih polusintetskih makrolidnih antibiotika pri čemu se posebno ističu azitromicin, klaritromicin, roksitromicin i midekamicin. Makrolidni antibiotici su dugi niz godina predmet analitičkih, spektroskopskih i elektrohemijskih ispitivanja u cilju proširenja saznanja o njihovom dejstvu, a time i poboljšanja njihovih antimikrobnih i farmakokinetičkih svojstava kao i razvijanja metoda za njihovo kvalitativno i kvantitativno određivanje.

Na osnovu rezultata ranijih ispitivanja elektrohemijske aktivnosti i transformacija azitromicina, klaritromicina i eritromicina, predmet ovog rada je ispitivanje elektrohemijske aktivnosti kao i razvoj novih elektroanalitičkih metoda za kvalitativno i kvantitativno određivanje roksitromicina i midekamicina u čistom obliku, kao i u različitim komercijalnim farmaceutskim oblicima (kapsule, tablete i sl), a roksitromicina i u uzorcima humanih tečnosti (urina).

U toku ispitivanja elektrohemijske aktivnosti makrolidnih antibiotika u ovom radu korišćene su ciklična voltometrija i diferencijalna pulsna voltometrija uz upotrebu radne elektrode od zlata, u neutralnom elektrolitu, a analiza elektrolita posle odvijanja elektrohemijskih reakcija uradjena je visoko efikasnom tečnom hromatografijom (HPLC) i masenom spektrometrijom (LC/MS).

U svetu se poslednjih desetak godina radilo na razvoju elektrohemijskih metoda za kvalitativno i kvantitativno određivanje različitih lekova, kao i makrolidnih antibiotika

na elektrodama od različitog materijala (staklasti ugljenik, platina, zlato) i u različitim tipovima elektrolita. [1]

Elektrohemijske metode su brže, jednostavnije, efikasnije i jeftinije od nekih rutinski primenjivanih metoda i izvanredna su dopuna postojećim klasičnim hromatografskim metodama u kompanijama koje proizvode antibiotike kao i u kliničkim centrima u kojima se rade rutinska farmakokinetička određivanja makrolidnih antibiotika u telesnim tečnostima (krv, urin, plazma).

U ovom radu je sistematski ispitano elektrohemijско ponašanje navedenih antibiotika i upoređeno sa ranije proučavanim makrolidnim antibioticima, što će dati jasniju sliku o značaju elektrohemije u analitici lekova.

2. TEORIJSKI DEO

2.1. Antibiotici

Antibiotici su organska jedinjenja različitih struktura i svojstava koja se koriste kod bakterijskih infekcija. Ova jedinjenja deluju na bakterije samo kada su u stanju deobe. Čestom i neadekvatnom upotrebom istih antibiotika na iste sojeve bakterija, te bakterije postaju rezistentne na upotrebene antibiotike pa ih zbog toga treba obazrivo koristiti. Antibiotici ne deluju na viruse, gljivične infekcije i ostale nebakterijske infekcije.

Prema načinu dejstva na bakterije antibiotici se dele na:

I-Baktericidne – oni koji deluju na ćelijski zid čime izazivaju liziranje bakterijske ćelije i

II-Bakteriostatske – oni koji se vezuju za 50S ribozomalnu subjedinicu

Prema hemijskoj strukturi dele se u sledeće grupe:

- derivate aminokiselina (jednostavne peptide),
- β -laktam antibiotike,
- aminoglikozide,
- tetracikline,
- antracikline,
- makrolide,
- piranozide,
- polienske makrolide,
- ansamicine,
- polipeptidne i ciklične peptide,
- glikopeptidne, lipopeptidne i druge antibiotike,
- ostali ^[2]

2.2. Makrolidni antibiotici

Makrolidni antibiotici su grupa makrocikličnih laktona, pri čemu se veličina makrocikličnog prstena kreće od 12 – 22 atoma, koji su glikozidnim vezama vezani za šećere. Najčešće upotrebljavani makrolidni antibiotici sastoje se od četrnaestočlanog, petnaestočlanog i šesnaestočlanog prstena.

Jedinjenja iz ove grupe prema načinu delovanja spadaju u bakteriostatske antibiotike, mada u određenim slučajevima pokazuju i baktericidno dejstvo što zavisi od koncentracije i osetljivosti bakterije. [3-5]

Ova jedinjenja su uglavnom proizvodi roda *Streptomyces*, izuzev semisintetskih proizvoda eritromicina (roksitromicin, klaritromicin, azitromicin) i rosarimicina i mirosamicina koji su proizvodi roda *Micromonospora*. Pri izolovanju makrolidnih antibiotika iz jedinjenja koja ih proizvode dobija se smeša homologih komponenti. [4]

Ova jedinjenja odlikuju se širokim spektrom dejstva na Gramm pozitivne bakterije i *Mycoplasme*, kao i na određene Gramm negativne organizme iz roda *Mucobacteria*, *Chlamydia*, *Legionella* i *Spirochaete novyi*. [5]

Hemijska struktura makrolidnih antibiotika

Hemijska struktura makrolidnih antibiotika sastoji se od makrocikličnog laktorskog prstena i šećera vezanih za njih. Makrociklični prsten formiraju atomi ugljenika i heteroatoma.

Makrolidni antibiotici su kristalne supstance (bele ili blede žute boje), slabo rastvorne u vodi, slabe baze nereaktivne u srednje jakim kiselinama pa se zbog toga često u terapiji koriste soli ili estri ovih jedinjenja. [7]

Na osnovu broju atoma koji formiraju prsten najčešće upotrebljavani makrolidni antibiotici se mogu podeliti na sledeći način: [6]

- makrolidni antibiotici sa četrnaestočlanim prstenom – eritromicin (sl.1,str.8), roksitromicin (sl.4, str.17), klaritromicin (sl.3, str.14),
- makrolidni antibiotici sa petnaestočlanim prstenom - azitromicin (sl.2, str.11),
- makrolidni antibiotici sa šesnaestočlanim prstenom - midekamicin (sl.5, str.19), i
- makrolidni antibiotici sa više od 16 C atoma (poliensi makrolidi)

Polusintetski makrolidni antibiotici na osnovu tipa hemijske modifikacije makrocikličnog laktona dele se na one koji nastaju:

- strukturnim promenama eritromicina A u položajima C6 (klaritromicin), C9 (roksitromicin) i C11(diritromicin, sl.7, str.23),
- modifikacijom *eritronolidnog* aglikona (u makrocikličnom prstenu se nalazi metilovani azot u položaju 9a-azitromicin), i
- modifikacijom na, C-3 α -L-kladinoze^[7] – ketolidi (telitromicin), sl.10, str.25

Šećeri koji su vezani za makrociklični prsten su važni za dejstvo i farmakokinetičke osobine makrolidnih antibiotika. Prvi šećer sadrži amino grupu koja se može protonovati, utiče na katjonski karakter svih makrolida i određuje farmakokinetiku. Drugi šećer je veoma važan za kliničku aktivnost jer se njegovim uklanjanjem aktivnost smanjuje.^[5]

Modifikovanje makrolidnih antibiotika utiče na njihovu aktivnost i na promenu farmakokinetike.^[6]

Mehanizam i mesto delovanja

Makrolidi su antibakterijske supstance koje sprečavaju sintezu proteina. Deluju na bakteriju kad je u stanju deobe i to tako što se vezuju za 50S ribozomalnu podjedinicu sprečavajući translokaciju peptidnog lanca od akceptora do donora.^[5-7] Sprečavanje translokacije na 50S podjedinici je povezano aktivnošću peptidil transferaze. Poliribozomi

funkcionišu normalno, ali je njihova distribucija na mRNK ometena. Zaključak je da se inhibicija dešava pri translaciji između inhibicije i elongacije. ^[9]

Bakterijski ribozom (70S) se sastoji od dve podjedinice nazvane 30S i 50S koje se sastoje od ribozomalne RNK (rRNK) i ribozomalnih proteina. 30S podjedinica vezuje informacionu RNK (mRNK) i započinje sintezu proteina. Prepoznavanje kodona između informacione i transportne RNK dešava se na 50S podjedinici pri čemu se vezuje tRNK i kontroliše elongacija peptida. ^[9-11]

Pretpostavlja se da se makrolidi vezuju za dva mesta na izlazu 50S ribozomalne podjedinice čime sprečavaju da peptidni lanac izađe iz ribozoma do centralnog mesta sinteze, odnosno ometaju elongaciju peptidnog lanca pomoću sterne smetnje. ^[5-7]

Pravi mehanizam delovanja makrolidnih antibiotika na sprečavanje širenja bakterija je još uvek nepoznat. Može se reći da se makrolidi vezuju na dva mesta 50S ribozomalne podjedinice i sprečavaju transpeptidizacioni i translokacioni proces uzrokujući prerano odvajanje ne završenog peptidnog lanca i smrt ćelije. ^[7, 9-11]

Razlog za veliku efikasnost makrolidnih antibiotika prema Gram pozitivnim bakterijama najverovatnije leži u vezivanju za dva izlazna mesta 50S ribozomalne podjedinice. ^[9]

Farmakokinetika i farmakodinamika

Za procenu mikrobiološke aktivnosti i mogućnosti primene makrolidnih antibiotika potrebno je znati i njihova farmakokinetička i farmakodinamička svojstva. ^[12] Novi savremeni polusintetski antibiotici imaju poboljšane farmakokinetičke osobine. Najveći deo unetog antibiotika se apsorbuje u tankom crevu odakle prodire i difunduje u svim pravcima izuzev u ćelije CNS. Najupadljivije farmakokinetičko svojstvo se ogleda u velikoj difuzionoj zapremini što je u vezi sa njihovim svojstvom da se akumuliraju u eukariotskim ćelijama. Mehanizam ove akumulacije se sastoji od difuzije neprotonovanog oblika kroz membranu i zadržavanja protonovanog oblika u kiselim delovima ćelije. Ovaj mehanizam objašnjava zašto se dibazni molekuli (npr. azitromicin) akumuliraju u velikom višku. ^[5]

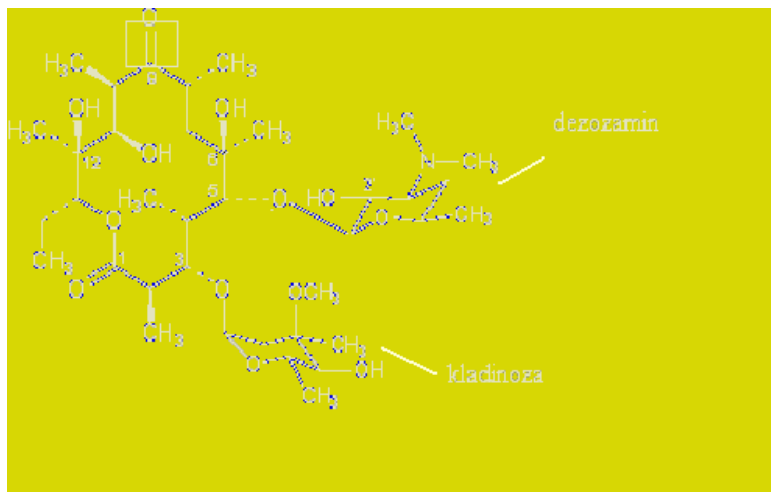
Makrolidni antibiotici se koncentrišu u jetri i izlučuju preko žuči. Metabolizam biotransformacije je preko citohroma P450 koga inhibiraju u jetri i crevima.^[5,7,13] Od ispitivanih antibiotika sporo izlučivanje ima azitromicin jer se duže zadržava u ćeliji zbog čvrstog vezivanja za fosfolipide.

Farmakodinamika proučava delovanje leka na organizam i njegove funkcionalne sisteme, a farmakokinetika delovanje organizma na lek, njegove hemijske promene i sudbinu u organizmu. Naime, postoje koncentraciono i vremenski zavisni lekovi, a makrolidi spadaju u vremenski zavisne što se i vidi iz njihovog mehanizma delovanja. Bakteriostatski lekovi održavaju svoju aktivnost dokle god se vezuju za ribosome.^[12]

Važnost farmakokinetike i farmakodinamike lekova se ogleda u tome što se pomoću njih može odabrati odgovarajući lek, odrediti način doziranja, klinička primena, antimikrobni spektar, ispoljavanje naželjenih reakcija i mogućnost razvijanja rezistentnosti.

2.2.1. Eritromicini

Eritromicin je prvi otkriveni makrolidni antibiotik. Proizvodi su metabolizma aktinomiceta iz roda *Streptomyces erythreus* pri čemu se dobija smeša proizvoda.^[4] Kad se kaže eritromicin misli se na eritromicin A (glavni proizvod), a smeša sadrži i primese B i C. Osnovu molekula čini aglikon *eritronolid* (makrociklični lakton od 14 atoma u ciklusu, od kojih 13C-atoma i 1 kiseonikov atom, slika 1), pri čemu je aminošećer dezozamin vezan α -glikozidnom vezom za C-5 na prstenu, a L-kladinoza (*3-O-metilmikaroz*) α -glikozidnom vezom na C-3 na prstenu (slika 1). Tercijarna amino grupa u dezozaminu uslovljava da se eritromicin ponaša kao baza.^[14]



Slika 1. Strukturna formula eritromicina [8]

Eritromicini A i B sadrže identične specifične šećere, a međusobno se razlikuju u položaju C12, eritronolid A sadrži još jednu hidroksilnu grupu za razliku od eritronolida B. Eritromicin C sadrži *deozamin* i aglikon eritronolid A koji ulazi u sastav eritromicina A, a razlikuje se po prisustvu specifičnog šećera *mikaroze*, umesto *kladinoze*. [14]

Eritromicin u čvrstom stanju je svetlo-žuti prašak, odnosno bezbojni ili žuti kristala, slabo rastvorni u vodi, slabo higroskopni, lako rastvorljivi u alkoholu, umereno rastvorni u metanolu, a rastvorni u hlorovodoničnoj kiselini. Molekulska formula ovog jedinjenja je $C_{37}H_{67}NO_{13}$. [15]

Eritromicin A kristališe iz smeše aceton-voda kao hidrat promenljivog sastava. Soli eritromicina A su: eritromicin-glukoheptanoat, eritromicin-laktobionat, eritromicin-stearat (eritromicin-oktadekanoat), eritromicin-etilsukcinat (so i estar).

Estri (2'-acil derivati) i njihove soli: eritromicin-propionat, eritromicin-acistrat (eritromicin-2'-acetat-oktadekanoat), eritromicin-estolat (eritromicin-2'-propanoat-dodecil-sulfat) stabilniji su u kiseloj sredini, imaju veću lipofilnost, pa samim tim i višu bioraspoloživost pri per-os primeni. Estri u plazmi hidrolizuju i time se veoma brzo postiže terapijska koncentracija eritromicina A. [14]

So eritromicin-etilsukcinat je prodrag jedinjenje koje je stabilnije u kiseloj sredini, gradi stabilnu suspenziju koja nema neprijatan ukus, pa je pogodna za pripremanje sirupa u pedijatrijskoj praksi.

Nastaje esterifikacijom hidroksilne grupe u položaju 2' kod dezozamina. Eritromicin-etilsukcinat je beo kristalan prašak, higroskopan, gotovo nerastvoran u vodi, a lako rastvoran u acetonu, etanolu i metanolu. Javlja se u kristalnom i amorfnom stanju. Amorfno stanje pokazuje bolju bioraspoloživost i manja neželjena dejstva u digestivnom traktu. [16]

Apsorbuje se nepromenjen i hidrolizuje u krvi, želucu i crevima gde i postiže aktivni oblik leka. [17, 18] Pokazuje povoljniju bioraspoloživost u odnosu na eritromicin zbog boljeg prodiranja u tkivo. [19,20]

Eritromicin-etilsukcinat se metaboliše u eritromicin.

Farmakodinamički podaci

Eritromicin deluje bakteriostatski na veliki broj mikroorganizama. Kod manjeg broja osetljivih mikroorganizama, koji se brzo dele i u umerenoj alkalnoj sredini koja povećava aktivnost eritromicina (pH 5,5- 8,8), eritromicin može da ispolji i baktericidno dejstvo.

Antibakterijski spektar eritromicina obuhvata: gram pozitivne i gram negativne bakterije, mikoplazme, spirohete, hlamidije i rikecije. Najveći stepen osetljivosti prema eritromicinu pokazuju gram pozitivne koke, kao što su *Str. pyogenes* i *Str. pneumoniae*, kod kojih se vrednost MIC (minimalna inhibitorna koncentracija) kreće između 0,001 i 0,2 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Mnogi sojevi *Staph. aureusa* (MIC 0,005 $\mu\text{g ml}^{-1}$) i *Staph. epidermidisa* (MIC 0,2-100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) su osetljivi na eritromicin. [12]

Prema eritromicinu su osetljive i druge gram pozitivne bakterije kao *Bacillus antracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Erysipelotrix rhusiopathiae*, *Listeria monocitogenes*, *Propionibacterium acnes*, sa vrednošću MIC od 0,01 do 3,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Od gram negativnih mikroorganizama visoku osetljivost prema eritromicinu pokazuje većina sojeva *N. gonorrhoeae*, a umerenu *N. meningitis*, *H. influenzae*, *Moraxella catharalis*, sojevi *Bordetella*, *Bruceella*, *Legionella*, *Pasteurella* i *H. ducreyi*. [12]

Eritromicin je visoko efikasan prema *M. pneumoniae* (MIC 0,001-0,002 $\mu\text{g ml}^{-1}$) i *Legionella pneumophili* (MIC 0,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Od gram negativnih anaeroba na eritromicin su osetljivi *Helicobacter pylori* i mnogi sojevi *Campylobacter jejuni*. [12] Eritromicin se često koristi kao zamena za penicilin kod osoba koje su alergične na ovaj antibiotik. [4]

Takođe iskazuje i indirektnu antitumornu aktivnost.^[21]

Farmakokinetički podaci

Kao što je spomenuto eritromicin baza je nestabilna u gastričnoj sredini, resorpcija je varijabilna, tako da se u terapiji koristi u obliku stabilnijih estara i soli. Takvi stabilni oblici karakterišu se bržom i boljom resorpcijom iz gastrontestinalnog trakta. Eritromicin primenjen oralno u dozi od 250 mg maksimalnu koncentraciju u plazmi postiže za 1-2 h (t_{max}) i ona iznosi 0,3-0,5 µg/ml (c_{max}).^[12]

Posle peroralne primene eritromicina od 500 mg, maksimalne koncentracije ovog antibiotika su veće i kreću se u rasponu od 0,4-0,9 µg ml⁻¹. Eritromicin dobro penetrira u tkiva i telesne tečnosti. Visoke koncentracije eritromicina su utvrđene u jetri, slezini, prostati, polimorfonuklearnim limfocitima, makrofagima. Oko 70-75% baze se vezuje za proteine plazme, dok se procenat vezivanja za proteine plazme kod estara i soli eritromicina povećava do 95%.^[12]

Mehanizam dejstva zasniva se na inhibiciji sinteze proteina mikroorganizama na taj način što se reverzibilno vezuje za 50S subjedinicu ribozoma i blokira reakcije translukacije i transpeptidacije. Studije intracelularne distribucije su utvrdile da se eritromicin aktivno koncentriše u polimorfonuklearnim leukocitima, tako da je intracelularna koncentracija eritromicina oko 10 puta veća od ekstracelularne. Gram pozitivne bakterije akumuliraju oko 100 puta više eritromicina od gram negativnih mikroorganizama. Nejonizovana forma leka bolje penetrira u bakteriju, čime se objašnjava povećana antimikrobna aktivnost eritromicina u alkalnom pH.^[12]

Terapijske indikacije za upotrebu eritromicina su infekcije gornjih (sinusitis, otitis, tonsilitis) i donjih disajnih puteva (bronhitis, pneumonia, bronchopneumonia), veliki kašalj, gonorhea, hronični prostatitis itd.^[22]

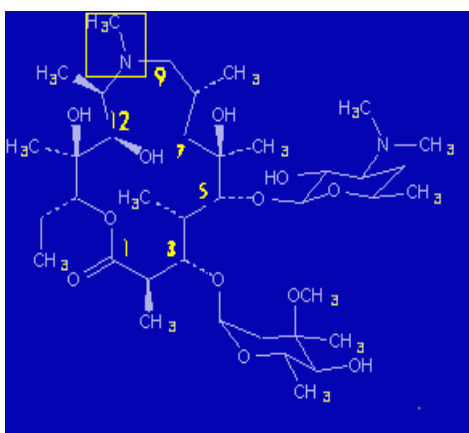
Prema svom metabolizmu eritromicin spada u one makrolidne antibiotike koji se metabolišu putem P450 mehanizma. Iz organizma se izlučuje preko urina, jetre i žuči.^[23]

U organizmu se ravnomerno raspoređuje u svim tkivima i organima ali zbog malog vremena poluživota mora se češće unositi (4 puta dnevno).^[12] Biološki poluživot

eritromicina se kreće između 1,5 i 2,5 h, kod pacijenata sa renalnom insuficijencijom može biti produžen, ali redukcija doze nije potrebna.

2.2.2. Azitromicin

Azitromicin je polusintetski makrolidni antibiotik. Pripada grupi makrolidnih antibiotika sa petnaestočlanim makrocikličnim prstenom za koji su α -glikozidnom vezom na poziciji C-3 i C-5 vezani šećeri kladinoza i dezozamin. Razlikuje se od ostalih makrolida po tome što ga karakteriše azalidna struktura (slika 6). Derivat je eritromicina A, dobijen reakcijom nukleofilne adicije hidroksilamina na karbonilnu grupu, a *Beckmanovim* premeštanjem je proširen u makrociklični laktam (azot ulazi u sastav makrocikličnog laktona). [14]



Slika 2. Strukturna formula azitromicina [8]

Azitromicin je bela praškasta supstanca. Postoji u obliku dihidrata i monohidrata pri čemu se monohidrat taloži smešom voda/etanol = 1/1. Pri rastvaranju prelazi u dihidrat. [24] Molekulska formula azitromicina je $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$.

Azitromicin je dibazan makrolidni antibiotik. Prisustvo drugog azota u strukturi uslovljava tu dibaznost, a zbog nje se azitromicin akumulira u belim krvnim zrnima zarobljavanjem u lizozomima. [25]

U odnosu na eritromicin odlikuje se većom stabilnošću prema kiselinama, ne dolazi do građenja ketala i drugih degradacionih proizvoda, ima proširen spektar dejstva i poboljšane farmakokinetičke osobine, kao i bolju oralnu primenljivost. Prema metabolizmu ovaj antibiotik se ponaša kao i roksitromicin, tj. metabolizam ne ide preko citohroma RU450. [23] Eliminiše se najvećim delom u nepromenjenom obliku putem žuči. [14, 19]

Azitromicin se uzima jedanput dnevno u trajanju od 3 do 5 dana s tim da zbog akumuliranja u ćeliji ima produženo dejstvo i po prestanku uzimanja leka. Ima veoma povoljnu bioraspoloživost i biološko poluvreme eliminacije i dozira se jednom dnevno. Utvrđeno je da ima afinitet nagomilavanja u *mastocitima*, odakle sporo difunduje u tkivne tečnosti, te ima dugo biološko poluvreme eliminacije. Zbog efekta akumulacije u organizmu dugotrajna upotreba ovog antibiotika može da izazove oštećenje jetre i žuticu. Hrana nepovoljno utiče na bioraspoloživost azitromicina, pa se preporučuje uzimanje azitromicina 1 sat pre ili 2 sata posle obroka.

Odlikuje se velikom penetracijom u tkiva i ćelije pri čemu pokazuje kumulativni efekat i ima produženo dejstvo. [12]

Farmakodinamični podaci

Azitromicin deluje tako što se vezuje za 50S subjedinicu ribozoma osetljivih mikroorganizama i ometa sintezu proteina. Na većinu bakterija deluje bakteriostatski. Antimikrobna aktivnost azitromicina je smanjena na niskim pH. Azitromicin ima široki antimikrobni spektar; deluje na različite gram pozitivne, gram negativne, anaerobne, intracelularne i atipične mikroorganizme.

Azitromicin je pokazao aktivnost protiv većine sojeva sledećih mikroorganizama:

Gram pozitivni mikroorganizmi: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*.

Gram negativni mikroorganizmi: *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae*.

Ostali mikroorganizmi: *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma pneumoniae*. [12,20,26]

Farmakokinetički podaci

Azitromicin se brzo resorbuje iz gastrointestinalnog trakta nakon peroralne primene. Bioraspoloživost azitromicina iznosi oko 37%. Maksimalna koncentracija u plazmi postiže se 2 - 3 sata nakon primene i iznosi $0,4 \mu\text{g ml}^{-1}$ (posle doze od 500 mg). U zavisnosti od primenjenog oralnog oblika, prisustvo hrane u digestivnom traktu može da produži resorpciju azitromicina. Kada se azitromicin daje u obliku kapsula, hrana smanjuje maksimalne koncentracije u plazmi i obim resorpcije (PIK) za 52 odnosno 43%. Međutim, kada se azitromicin daje u obliku film tableta ili oralne suspenzije hrana ne utiče značajno na obim resorpcije (PIK), ali utiče na njenu brzinu.

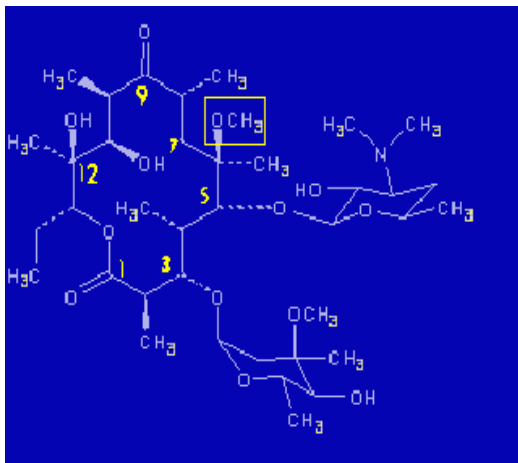
Nakon oralne i intravenske primene azitromicin se distribuira u skoro sva tkiva i telesne tečnosti. Vezivanje za proteine plazme se smanjuje sa porastom koncentracije azitromicina u krvi: 52% azitromicina je vezano za proteine plazme pri koncentraciji od $0,05 \mu\text{g ml}^{-1}$ i 12% pri koncentraciji od $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Terapijske indikacije za upotrebu azitromicina su:

- Infekcije gornjih disajnih puteva: sinuzitis, faringitis/tonzilitis,
- Infekcije donjih disajnih puteva: bakterijski bronhitis, vanbolnički stečena pneumonija,
- Akutni otitis media,
- Nekomplikovane infekcije kože i mekih tkiva (uključujući i Erythema migrans), i
- Nekomplikovani uretritis i cervicitis uzrokovan sa *Chlamydia trachomatis*.^[12]

2.2.3. Klaritromicin

Klaritromicin je polusintetski četrnaestočlani makrolidni antibiotik. Nastaje semisintetskim putem, tj. metilovanjem hidroksi grupe na C6 atomu makrolidnog prstena (slika 3). Sintetisan je s ciljem da se dobije aktivno jedinjenje koje je otpornije na želudačnu kiselinu u digestivnom traktu od eritromicina i tako smanje neželjena dejstva (npr. mučnina u stomaku).



Slika 3. Strukturna formula klaritromicina^[8]

Dobro se resorbuje posle oralne primene. Klaritromicin ima nekoliko značajnih prednosti u odnosu na eritromicin uključujući pojačanu aktivnost, veću koncentraciju u tkivima i poboljšanu tolerantnost.^[27-29] Koristi se za lečenje upale grla, krajnika, bronhitisa, upale pluća.

Biotransformacijom klaritromicina nastaje aktivni metabolit *14-hidroksietil klaritromicin*. Delimično se eliminiše renalnim putem. U zavisnosti od koncentracije, deluje bakteriostatično i baktericidno. U najnovije vreme primenjuju se i dozirani oblici sa modifikovanim oslobađanjem klaritromicina za lečenje hroničnih oblika bronhitisa.

Farmakokinetički podaci

Farmakokinetička svojstva klaritromicina su poboljšana u odnosu na eritromicin. Dokazano je da je od velikog značaja za lečenje bakterijskih infekcija kod pacijenata koji pokazuju osetljivost na beta laktame. Koncentracije klaritromicina u tkivima mogu biti 10 puta veće nego u plazmi. Najveće koncentracije su pronađene u jetri.

Svoje antibakterijsko dejstvo ispoljava vezivanjem za 50S ribozomalnu subjedinicu osetljivih bakterija i sprečavanjem sinteze proteina. On je izuzetno snažan

protiv velikog broja aerobnih i anaerobnih gram-pozitivih i gram-negativnih mikroorganizama. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) klaritromicina je generalno dva puta niža od MIC eritromicina. Kao što je spomenuto 14-hidroksi metabolit klaritromicina ima, takođe, antibakterijsko dejstvo. Ovo dejstvo je jednako ili dvostruko manje u odnosu na antibakterijsko dejstvo samog klaritromicina, posmatrano za većinu mikroorganizama izuzev za *H.influenzae*. Kod *H.influenzae* aktivnost 14-hidroksietil klaritromicina je dvostruko veća u odnosu na sam klaritromicin. [12]

Klaritromicin je najčešće aktivan protiv sledećih mikroorganizama u *in vitro* uslovima Gram pozitivne bakterije: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus(Diplococcus) pneumoniae*; *Streptococcus agalactiae*; *Listeria monocytogenes*.

Gram negativne bakterije: *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae*; *Legionella pneumophila*, *Bordetella pertussis*, *Helicobacter pylori*; *Campylobacter jejuni*.

Mikoplasme: *Mycoplasma pneumoniae*; *Ureaplasma urealyticum*.

Ostali mikroorganizmi: *Chlamydia trachomatis*; *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium leprae*; *Mycobacterium kansasii*; *Mycobacterium chelonae*; *Mycobacterium fortuitum*; *Mycobacterium intracellulare*. [12]

Klaritromicin ima baktericidnu aktivnost protiv nekoliko bakterijskih sojeva: Te mikroorganizme uključuju *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *H. pylori* and *Campylobacter spp.* [30-33] *H. pylori* uzročnik peptičkih bolesti kao što su duodenalni čir i želudačni čir kod kojih je 95%, odnosno, 80% pacijenata inficirano ovom bakterijom. Takođe, *H. pylori* se smatra glavnim uzročnim faktorom koji doprinosi razvoju recidiva gastritisa ili čira. [30-33]

Farmakodinamički podaci

Klaritromicin se nakon peroralne primene brzo i dobro resorbuje iz želudačno-crevnog trakta na čiji ukupan obim resorpcije značajnije ne utiče trenutno prisustvo hrane.

Metabolizmom kroz jetru, nastaje mikrobiološki aktivan metabolit 14-hidroksi-etil-klaritromicin. Maksimalne koncentracije klaritromicina postižu se u krvi posle 2-3 sata.

Vreme postizanja maksimalnih koncentracija aktivnog metabolita, 14-hidroksiklaritromicina, blisko je onom određenom za klaritromicin.

Ulaskom u cirkulaciju klaritromicin se u procentu koji varira od 40% do 70% vezuje za proteine plazme, a u visokim koncentracijama prisutan je u sastavu fagocita koji ga aktivno transportuju do žarišta infekcije. Dobro prolazi u tkiva i telesne tečnosti, gde su mu koncentracije više nego u krvi, što je glavni preduslov za efikasno antibakterijsko delovanje klaritromicina. [12]

Klaritromicin se metaboliše u jetri a, preko žuči izlučuje se fecesom. Dvadeset do 30% apsorbovanog klaritromicina, kao i 10%-15% nastalog aktivnog metabolita eliminiše se nerazgrađeno preko urina. Poluvreme eliminacije klaritromicina varira od 3 do 7 sati, dok je biološki poluživot 14-hidroksiklaritromicina nešto duži (7-9 sati).^[12]

2.2.4. Roksitromicin

Roksitromicin je polusintetski derivat eritromicina A. Hemijski predstavlja 9-(2',5'-dioksaheksiloksiimino)-eritromicin A. Pripada grupi makrolidnih antibiotika sa četrnaestočlanim prstenom (Slika 2). Pored antimikrobne, poseduje i antiprotozoičnu aktivnost. Nastaje u reakciji nukleofilne adicije sa derivatom hidroksilamina (metoksietiloksimetilhidroksilaminom). Transformacijom u odgovarajući *O*-alkiloksim, karbonilna grupa se deaktivira prema reakciji građenja neaktivnih *hemiketala*, koji su potencijalni degradacioni proizvodi.^[7,14,34]



Slika 4. Strukturna formula roksitromicina [8]

Roksitromicin je beo kristalan prašak molekulske formule $C_{41}H_{76}N_2O_{15}$, slabo rastvoran u vodi. Teško se rastvara u razblaženoj hlorovodoničnoj kiselini i pokazuje polimorfizam [16,34]

Kao i svi makrolidi i roksitromicin je bazno jedinjenje koje se dobro apsorbuje u crevima, a odlikuje se većom stabilnošću prema kiselinama u odnosu na eritromicin A. Ovo je posledica modifikacije prstena. Ta osobina je važna jer se na ovaj način sprečava dezaktivacija u želucu. [35] Dobro prodire u tkiva naročito u bronhije, tkivo prostate, srednjeg uva i kostiju. Kao i svi ostali makrolidi ne prodire u tkivo CNS.

Delimično se transformiše u jetri, a metaboliti se izlučuju preko urina. Metabolički priozvodi roksitromicina ne pokazuju bilošku aktivnost. [36]

Sa farmakokinetičkog i farmakodinamičkog aspekta roksitromicin se odlikuje produženim dejstvom i zbog lakog prodiranja u tkivo odlikuje se velikom koncentracijom u ćelijama i dobrom rasprostranjenosti u telesnoj tečnosti i plazmi. Treba reći da produženo dejstvo zavisi od vrste patogena i njegove koncentracije. Terapijske indikacije za upotrebu roksitromicina su infekcija gornjih i donjih respiratornih puteva, sinusitis, otitis media, otitis eksterna kože, mekog tkiva, urogenitalnih infekcija *Chlamydia-ma* u graviditetu (tetraciklini su kontraindikovani), dentalnih infekcija, HIV pozitivnih infekcija, *Helicobacteria pilori* i sl. [12,37,38]

Farmakodinamični podaci

Osnovne odlike roksitromicina su dug biološki poluživot, dobra penetracija u tkiva i efikasnost u lečenju infekcija izazvanih atipičnim patogenima (*Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophyla* i dr.) [36,39].

Roksitromicin je bakteriostatski antibiotik koji se vezuje za 50 S subjedinicu ribozoma i inhibira sintezu proteina.

Njegov antibakterijski spektar obuhvata sledeće mikroorganizme: *Streptococcus pneumonia*, *Streptococcus pyogenes*, *Neisseria meningitides*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Moraxsella catarrhalis*, *Haemophylus influenzae*, *Listeria monocytogenes*, *Ueraplasma urealyticum*, *Corynobacterium diphtheraie*, *Staphylococcus aureus* je nešto manje osetljiv na antibiotik dok su: *Ps. Aeruginosa*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp*, *Klepsiela* i *E.coli* rezistentne. [12,36,39]

Farmakokinetički podaci

Resorpcija roksitromicina koja sledi nakon oralne primene leka je veoma dobra. 1,5 do 2 sata nakon davanja leka postiže se maksimalna koncentracija u plazmi od 6,6-7,9 mg l⁻¹ pri davanju doze leka od 150 mg, a 9,1-10,8 mg l⁻¹ pri davanju doze od 300 mg.

Kada se lek daje 2 sata nakon jela, maksimalna koncentracija i obim resorpcije (PIK) su dva puta manji, a pri uzimanju hrane 15 minuta nakon davanja leka ova nema efekta na resorpciju. Dinamička ravnoteža nakon višekratnog davanja leka se postiže nakon 4 dana, a kumulacija roksitromicina nije primećena. Roksitromicin, kao i drugi makrolidni antibiotici, se dobro distribuira u organizmu. Vezivanje roksitromicina za proteine plazme zavisi od koncentracije leka u plazmi.

Mali deo leka se metaboliše u jetri. Identifikovana su 3 metabolita: deskladini derivat, jedan N-monodesmetil derivat i N-didesmetil derivat. U fecesu su pronađena dva neidentifikovana metabolita. Roksitromicin se eliminiše mahom fecesom, 50% kao nepromenjen lek, oko 25% deskladini derivat, i oko 6% kao desmetil derivat. Vreme polueliminacije nakon pojedinačne doze od 150 mg je 8-13 sati, sa velikim individualnim

razlikama. Kod dece i starijih pacijenata farmakokinetika roksitromicina se ne razlikuje od odraslih osoba. [12]

2.2.5. Midekamicin

Midekamicin spada u grupu makrolidnih antibiotika sa šesnaestočlanim makrocikličnim prstenom (leukomicini). Za razliku od eritronolida, makrolid sadrži dienski konjugovani sistem, karbonilna grupa u položaju C9 je redukovana do 6 α -hidroksilne grupe, a u položaju C6 je formilmetil grupa (slika 7). [14]



Slika 5. Strukturna formula midekamicina [8]

Izolovan je iz goveđe kulture *Streptomyces mycarofaciens* pri čemu se smeša sastoji od glukoze : peptona : goveđeg ekstrakta : rastvorljivog jestivog proteina : sojinog semena : natrijum-hlorida : 0,3% kalcijum-karbonata u odnosu 3:1:0,5:0,4:0,3:0,2 na pH=7 pri čemu se najbolji prinos dobija posle 60-70 sati. [40]

Za razliku od derivata eritromicina, specifični šećer (disaharid) je vezan u položaju C5 i sastoji se od 4'-hidroksidezozamina i mikaroze. Midekamicin je beli kristalni prašak molekulske formule C₄₁H₆₇NO₁₅, bez mirisa, gorkog ukusa, slabo rastvoran u vodi i etru, a dobro rastvoran u metanolu, etanolu i etil-acetatu. [17]

Primenjuje se oralno i karakteriše ga dobra apsorpcija i niska toksičnost. U poređenju sa eritromicinom pokazuje manju aktivnost prema svim ispitivanim vrstama bakterija.^[41] Kao i svi makrolidi i midekamicin se odlikuje bakteriostatskim dejstvom, a na neke patogene deluje i baktericidno pri čemu mu je potrebna veća koncentracija.

Koristi se kod infekcija respiratornog i urogenitalnog trakta *Urealitikumenteritis Campylobacter*, lečenja kod difterije i velikog kašlja, kao zamena za penicilin kod bolesnika preosetljivih na penicilin.^[22]

Farmakodinamični podaci

Aktivnost midekamicin je slična eritromicinu. Delotvoran je protiv gram-pozitivnih bakterija (stafilokoka, streptokoka, pneumokoka, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae* i *Listeria monocytogenes*), protiv određenih gram-negativnih bakterija (*Bordetella pertussis*, *Campylobacter* spp., *Moraxella catarrhalis* i *Neisseria* spp.), anaeroba (*Clostridium* spp. i *Bacteroides* spp.) i drugih bakterija, kao što su mikoplazme, ureaplazme, klamidije i legionele.^[41]

Metaboliti midekamicina imaju sličan antibakterijski spektar kao midekamicin, ali je njihovo dejstvo nešto slabije. Rezultati nekoliko testova na životinjama pokazali su da je efikasnost midekamicina i midekamicin-acetata bolja *in vivo* nego *in vitro*. Ovo je delimično posledica visokih koncentracija aktivnih metabolita u tkivima.

Midekamicin inhibira sintezu proteina zavisnih od RNA u fazi produžavanja proteinskog lanca. Reverzibilno je vezan za podjedinicu 50S i blokira reakciju transpeptidacije i/ili translokacije.^[12]

Kao i ostali makrolidni antibiotici, midekamicin primarno pokazuje bakteriostatsko delovanje. On, međutim, može pokazati i baktericidno delovanje, što zavisi od tipa bakterije, koncentracije leka na mestu delovanja i reproduktivne faze mikroorganizma. *In vitro* aktivnost je smanjena u kiseloj sredini. Ukoliko je pH vrednost u medijumu kulture *Staphylococcus aureus* ili *Streptococcus pyogenes* povećana sa 7,2 na 8,0, MIC za midekamicin je duplo niži. Ukoliko se pH smanji, situacija je obrnuta. Visoke intracelularne koncentracije makrolida postižu se zbog njihove dobre rastvorljivosti u

mastima. Ovo je posebno važno u terapiji infekcija izazvanih mikroorganizmima sa intracelularnim ciklusom razvića, kao što su klamidija, legionela i listerija. Dok je odnos ekstracelularnih i intracelularnih koncentracija za eritromicin od 1 do 10, on je veći od 10 za novije makrolide, uključujući i midekamicin. *In vitro* istraživanja pokazala su da midekamicin utiče i na funkciju imunog sistema. [12]

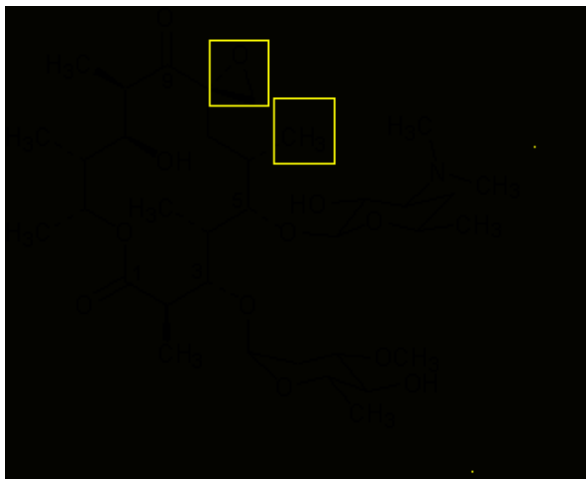
Farmakokinetički podaci

Midekamicin i midekamicin-acetat se brzo i relativno dobro resorbuju i dostižu maksimum koncentracije u serumu od 0,5 µg/ml do 2,5 µg/ml (midekamicin) i 1,31 µg/ml do 3,3 µg/ml (midekamicin-acetat) za 1 do 2 sata. Unos hrane neznatno smanjuje maksimalnu koncentraciju, posebno kod dece (od 4 do 16 godina starosti). Stoga se preporučuje da se midekamicin uzima pre obroka.

Midekamicin dobro prodire u sva tkiva, gde postiže veće koncentracije nego u krvi. Za proteine se vezuje 47% midekamicina i 3% do 29% metabolita. Midekamicin-acetat se takođe ekskretuje u majčino mleko. Nakon doze od 1.200 mg/dan, utvrđeno je prisustvo 0,4 µg/ml do 1,7 µg/ml midekamicin-acetata u mleku. [12]

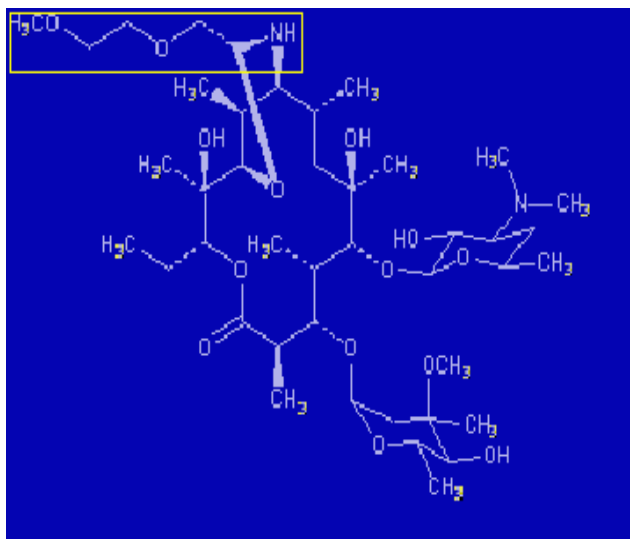
2.2.6. Ostali značajni makrolidni antibiotici

Oleandomicin je makrolidni antibiotik koji je proizvod metabolizma soja *Streptomyces antibioticus*. Strukturno je sličan eritromicinu A. Sadrži identičan makrociklični lakton od 14 atoma koji se razlikuje po sledećim grupama: sadrži *spiro-oksiranski* ciklus u položaju C8 umesto α -etil grupe, didehidroksi je derivat u položajima C6 i C12 eritromicina A i sadrži dodatnu metil grupu u C13, umesto etil grupe u ovom položaju eritromicina A. Oleandomicin se rastvara u mineralnim kiselinama. Koristi se kao so *oleandomicin-fosfat* i triacetatni estar (*troleandomicin*), koji se terapijski koristi u lečenju respiratornih infekcija. Mehanizam antimikrobne aktivnosti je identičan kao i kod ostalih makrolida, a pokazuje i nešto izraženiju hepatotoksičnost. [14]



Slika 6. Strukturna formula oleandomicina ^[8]

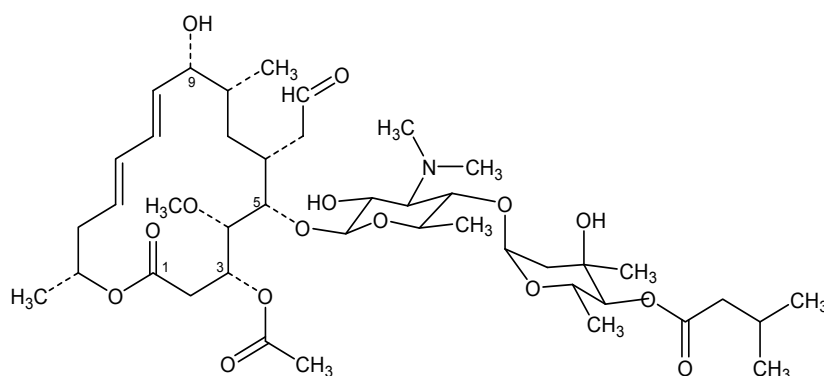
Diritromicin se hemijski označava kao [9*S*(*R*)]-9-deokso-11-deoksi-9,11-[imino[2-(2-metoksietoksi)etiliden]oksi]eritromicin. Kiselinska konstanta iznosi p*K*_a = 9,0 i određena je iz 66 % rastvora dimetilfluorida. Stabilan je u kiseloj sredini, a u biosredini podleže neenzimskoj hidrolizi, pri čemu nastaje aktivni metabolit **eritromicilamin** (9-deokso-9-aminoeritromicin A). Za razliku od eritromicina, diritromicin ne angažuje hepatske enzime, citohrom P-450. Aktivni metabolit eritromicilamin je lipofilan, visoke terapijske koncentracije se postižu u plućima, bronhijalnoj i nazalnoj mukozii, tonzilama i tkivu prostate. Vezivanje za proteine plazme (α -kiselii glikoprotein) iznosi 15–30 %, i ako se drugi lekovi uzimaju istovremeno (teofilin, terfenadin i dr.) ne dolazi do značajnih interakcija. ^[14]



Slika 7. Strukturna formula diritromicina [8]

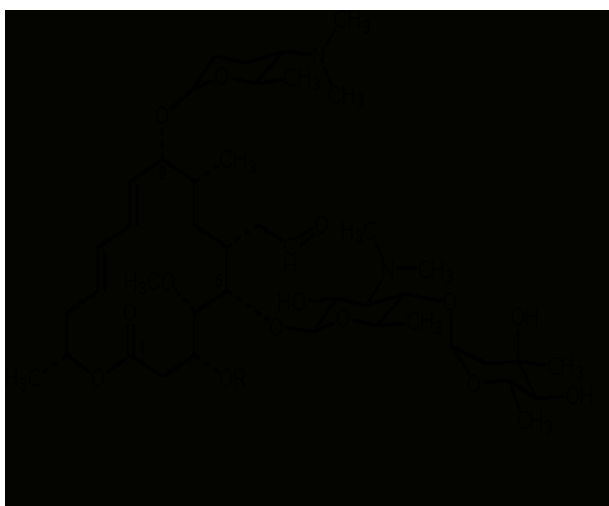
Josamicin (leukomicin A₃) je makrolid koji pripada leukomicinina (makrolidi koji sadrže laktonski ciklus od 16 atoma). Za razliku od eritronolida, makrolid sadrži dienski konjugovani sistem, karbonilna grupa u položaju C9 je redukovana do 6 α -hidroksilne grupe, a u položaju C6 je formilmetil grupa. Za razliku od derivata eritromicina, specifični šećer (disaharid) je vezan u položaju C5 i sastoji se od 4'-hidroksidezozamina i *mikaroze*.

Ako je u položaju C⁴ mikaroze izvršena esterifikacija sa 3-metil-butanskom kiselinom, dobijen je **josamicin (leukomicin A₃)**. U terapiji se koristi propionat. [14]



Slika 8. Strukturna formula josamicina [8]

Spiramicini su takođe derivati *leukomicina* koji se međusobno razlikuju po supstituentima u položaju C3. U odnosu na leukomicin A₃, *spiramicin I* se razlikuje po prisustvu još jednog specifičnog deoksi-aminošećera u položaju C9 i odsustvu ostatka 3-metilbutanske kiseline u šećeru *mikarози*.^[14]



Slika 9. Strukturna formula spiramicina^[8]

Ketolidi su nova vrsta makrolidnih antibiotika, a strukturom su posebno prilagođeni za lečenje infekcija gornjeg i donjeg dela sistema za disanje, uključujući i one uzrokovane rezistentnim uzročnicima. Ketolidi imaju sličan mehanizam delovanja kao eritromicin i drugi makrolidi.

Telitromicin je širokospektralni antibiotik iz grupe *ketolida* koji umesto šećera *kladinoze*, sadrži dodatnu karbonilnu grupu u položaju C4. Strukturna karakteristika telitromicina je prisustvo *N,3,4-trisupstituisanog-2-oksazolidinona*. Telitromicin deluje protiv pneumokoka, rezistentnih na eritromicin i penicilin. Bioraspoloživost telitromicina je veća od bioraspoloživosti azitromicina.^[14]

Telitromicin je prvi ketolidni antibiotik koji je ušao u kliničku primenu. Telitromicin ima dobru aktivnost protiv gram-pozitivnih, gram-negativnih i atipičnih uzročnika respiratornih infekcija. Takođe deluje i na *Streptococcus pneumoniae* rezistentnog na penicilin i druge makrolide. Farmakokinetske osobine i dobro prodiranje u

- imunohemijskim metodama (npr. ELISA),
- elektrohemijskim metodama (npr. cikličnom voltametrijom i dr.) i
- mikrobiološkim metodama.

Ove metode se koriste za kvalitativno i kvantitativno određivanje makrolidnih antibiotika iz fermentacione smeše, proveru stepena čistoće sirovine i komercijalnih proizvoda, kao i za određivanje u biološkim uzorcima - krv, plazma, urin, serum i tkiva. [42,43]

2.3.1. Određivanje eritromicina

Eritromicin se može odrediti HPLC metodom sa bazno dezaktiviranom C18 stacionarnom fazom i mobilnom fazom acetonitil:kalijum-dihidrogenfosfat:triethylamin u odnosu 6:4:0,005 v/v. Vrednost pH mobilne faze je podešena na 7,5 sa 10% kalijum hidroksidom. Detekcija se vrši sa fluorescentnim detektorom na talasnoj dužini ekscitacije 255 nm i emisije 315 nm. [44]

Još jedan sistem za određivanje eritromicina pomoću HPLC-a je i sistem sa acetonitriлом i 0,05 M fosfatnim puferom (pH=7,2) u odnosu (43:57 v/v) na reverzno faznoj koloni sa amperometrijskim detektorom. [45] Pored toga može se odrediti i sa mobilnom fazom koja se sastoji od 50 mM natrijum-hidrogenfosfata:natrijum-dihidrogenfosfata: acetonitrila : metanola na cijano koloni uz kolorimetrijski detektor i pH mobilne faze u opsegu od 6,5-7,5. [46]

Takodje detekcija se može vršiti i kolorimetrijski pri čemu je interni standard za određivanje eritromicina roksitromicin. [47] Tečnom hromatografijom može se odrediti eritromicin i njegove nečistoče pri čemu se kao stacionarna faza koristi C18 dok se mobilna faza sastoji od acetonitrila:vode: 2.0 M amonijum-dihidrogenfosfat (25:45:30 v/v). Detekcija se vrši UV detektorom na talasnoj dužini 215 nm. [48]

Hromatografski postupak može da se sprovede i na koloni stiren-divinilbenzen kopolimer (8-10 μm), sa mobilnom fazom koja se sastoji od 50 ml rastvora 35 g l⁻¹ kalijum-

dihidrogenfosfata podešenog na pH 9 sa razblaženom fosfornom kiselinom, 165 ml 2-metil-2-propanola, 30 ml acetonitrila i 755 ml vode. [49]

Prema jugoslovenskoj farmakopeji (Ph. Jug V) za ispitivanje i identifikaciju eritromicina koristi se TLC pri čemu je sorbent silika-gel, a mobilna faza je etil-acetat : izopropanol : 150 g l⁻¹ amonijum-acetat (9:4:8 v/v) čija je pH vrednost podešena na 9,6 dodatkom amonijaka. [15]

2.3.2. Određivanje azitromicina

Azitromicin se određuje primenom istog hromatografskog sistema kao kod određivanja eritromicina. [44]

Za kvantitativno određivanje azitromicina može se koristiti reverzno-fazna hromatografija na C18-koloni, a mobilna faza je smeša pufera (amonijum-hidrogenfosfat i tetrabutilamonijum-fosfat) : acetonitril : metanol u odnosu (60:20:20 v/v) i pH vrednost je podešena na 8 fosfornom kiselinom. [20]

Azitromicin se može određivati HPLC metodom i na sledećim kolonama: Supelcosil LC-18-DB, Chromegabond RP alkylphenyl 5 μ m, Chromegabond γ RP alumina 5 μ m, Nucleosil C₁₈ 5 μ m, Hypersil ODS 3 μ m, sa sistemima mobilne faze: acetonitril : izopropanol : amonijum-fosfat pH = 9, acetonitril : metanol : amonijum-acetat : natrijum-perhlorat pH 6,8-7,2 podešen sirćetnom kiselinom, acetonitril : kalijum-fosfat podešen na pH = 11 1,0M kalijum-hidroksidom, acetonitril : tetrabutilamonijum-perhlorat : dinatrijum-hidrogenfosfat podešen na pH = 7 sa fosfornom kiselinom, acetonitril : tetrabutilamonijum-perhlorat : dinatrijum-hidrogenfosfat podešen na pH = 7 sa fosfornom kiselinom, acetonitril : metanol : tetrahidrofuran : amonijum-acetat pri čemu je detekcija praćena UV detektorom na 215 nm. [50]

Još jedan sistem za određivanje azitromicina tečnom hromatografijom je i sistem sa mobilnom fazom acetonitril i 0,05M fosfatnim puferom u odnosu (43:57 v/v). Vrednost pH mobilne faze je 7,2, a kolona je reverzno fazna pri čemu se detekcija vrši amperometrijski, [51] kao i sistem sa mobilnom fazom koja se sastoji od 50mM od natrijum-hidrogen fosfata : natrijum-dihidrogenfosfata : acetonitrila : metanola, na koloni koja je punjena cijanopropil

silikagelom uz kolorimetrijski detektor i pH vrednosti mobilne faze je u intervalu od 6,5 do 7,5.^[52]

Tankoslojnom hromatografijom može se ispitati i odrediti azitromicin i njegove nečistoće i degradacioni proizvodi, kako u sirovom materijalu tako i u gotovom proizvodu. Ispitivanje se vrši na tankom sloju silika-gela, a mobilna faza je n-heksan : etilacetat : dietilamin (75:25:10 v/v/v). Čist azitromicin ima veće R_F vrednosti u odnosu na degradacione proizvode. Ova metoda se može koristiti za kontrolu čistoće azitromicina u sirovom materijalu i kapsulama.^[53]

2.3.3. Određivanje klaritromicina

Kvantitativna metoda za određivanje klaritromicina je metoda visoko efikasne tečne hromatografije (HPLC) koja ima široku primenu.^[54-60] Postoji nekoliko značajnih HPLC metoda za kvalitativno i kvantitativno određivanje klaritromicina u biološkim uzorcima.

Klaritromicin se određuje u serumu HPLC metodom pretkolonskom derivatizacijom sa 9-fluorenilmetiloksikarbonil hloridom i fluorescentnim detektorom.^[44,58] Klaritromicin i njegovi metaboliti u plazmi pacova i želudačnom soku mogu se odrediti metodom tečne hromatografije sa elektrohemijjskim detektorom^[61-63], zatim amperometrijski^[64] i masenom spektrometrijom.^[65-67]

Za određivanje klaritromicina u humanoj plazmi koristi se takodje metoda tečne hromatografije sa masenim detektorom (HPLC-MS) pri čemu se uzorci pripremaju tečno-tečnom ekstrakcijom. Kolona na kojoj se sprovodi razdvajanje je Supelco Discovery C18 sa mobilnom fazom acetonitril, metanol i sirćetna kiselina. Analiza je izvršena koristeći maseni analizator sa trostrukim kvadrupolom i turbo elektrosprej jonizacionim izvorom. Pri tome je posmatran najintenzivniji fragment m/z 158,2 dobijen fragmentacijom protonovanog molekulskog jona $[M+H]^+$ klaritromicina, m/z 748,5^[68]

Određivanje klaritromicina metodom tečne hromatografije sa elektrohemijjskom detekcijom sprovedeno je i sa amperometrijskim detektorom na radnoj elektrodi od staklastog ugljenika koja je korišćena u uslovima hidrodinamične voltametrije posle

"column-switching" HPLC pripreme uzorka humane plazme koja sadrži metabolite klaritromicina. [69]

HPLC metoda sa elektrohemijom za određivanje klaritromicina u humanoj plazmi je našla primenu u određivanju bioekvivalencije i farmakokinetičkim studijama. [70]

2.3.4. Određivanje roksitromicina

Roksitromicin se određuje primenom istog hromatografskog sistema kao kod određivanja eritromicina. [43]

Još jedan sistem za određivanje roksitromicina pomoću HPLC- a je sa acetonitrilom i 0,05M fosfatnim puferom (pH =7,2) u odnosu (43:57 v/v) na reverzno-faznoj koloni pri čemu se detekcija vrši amperometrijski. [44]

Pored toga roksitromicin se može odrediti i sa mobilnom fazom koja se sastoji od 50 mM natrijum-hidrogenfosfata : natrijum-dihidrogenfosfata : acetonitrila : metanola, a stacionarna faza je kolona punjena CN-silika-gelom uz kolorimetrijski detektor, pH vrednost mobilne faze je od 6,5 do 7,5. [20]

Tečnom hromatografijom roksitromicin se takodje može odrediti u sirovom uzorku i razdvojiti od nečistoća, pri čemu se kao stacionarna faza koristi X-terra RP-18 dok se kao mobilna faza koristi acetonitril: 2,0 M amonijum-hidrogenfosfat : voda pH 6,4 (25:35:45 v/v). Detekcija se vrši UV apsorpcijom na 215 nm. [71]

2.3.5. Određivanje midekamicina

Midekamicin se može odrediti metodom tečne hromatografije sa ELSD detektorom (detekcija razdvajanjem rasute svetlosti), pri čemu se kao stacionarna faza koristi kolona oktadecilsilan, a kao mobilna faza acetonitril : 0,2 M amonijak u odnosu (52:48 v/v), pH mobilne faze je 7,3 podešen sa trietilaminom, a protok mobilne faze je 1 ml min⁻¹ [16].

Midekamicin se može odrediti i LC-MS hromatografijom pri čemu se prvo stvara viševalentni jon koji se dobija jonizovanim elektronskim mlazom pozitivnih jona i pokazuje broj baznih funkcionalnih grupa. Velika prednost ove metode je visoka osetljivost. Stacionarna faza je STR ODS-II, a mobilna faza A je 20% acetonitril 80% voda i 0,1% sirćetne kiseline, dok je mobilna faza B 90% acetonitril 10% voda i 0,1% sirćetne kiseline. [17]

Jos jedna metoda kojom se midekamicin može odrediti u urinu je ultra tečna hromatografija (UPLC) kuplovana sa masenim detektorom (TOF). [72] Tečna hromatografija kuplovana sa jon-trap masenim detektorom se često koristi za detaljnu karakterizaciju josamicin-propionata i midekamicina. [73]

Midekamicin se određuje na tankom sloju silika-gela pri čemu se kao mobilna faza koriste sledeći rastvarači: etil-acetat : izopropanol : 15% amonijum-acetat u odnosu (9:7:8 v/v/v), etil-acetat : izopropanol : 15% amonijum-acetat u odnosu 9:4:8 v/v/v, etil-acetat : etanol : 15% amonijum-acetat (9:7:8 v/v), etil-acetat : etanol :15% amonijum-acetat (9:4:8 v/v/v). [18]

Takodje je metoda kapilarne elektroforeze sa elektrohemijским detektorom vrlo efikasna za određivanje midekamicina. [74]

Postoji još metoda ranije objavljenih u literaturi koje se odnose na određivanje midekamicina tankoslojnom i tečnom hromatografijom. [75-78]

2.3.6. Određivanje ostalih značajnih makrolidnih antibiotika

Od ostalih značajnih makrolidnih antibiotika ističu se diritromicin, josamicin, spiramicin i telitromicin. U daljem tekstu su navedene osnovne metode određivanja ovih lekova.

Diritromicin se može odrediti metodom tečne hromatografije sa elektrohemijским detektorom. Kao stacionarna faza koristi se kolona Kromasil C18, mobilna faza metanol : acetonitril : fosfatni pufer (13 : 40 : 47), a protok mobilne faze je 0.7 mL/min. Kao interni standard koristi se indapamid. Metoda je linearna u opsegu koncentracija od 13,8 do 460 ng ml⁻¹. [79]

Takodje se diritromicin može odrediti HPLC metodom na koloni Hypersil ODS sa mobilnom fazom koja se sastoji od acetonitrila, metanola, 50 mM fosfatnog pufera, pH 7.5 (44:19:37) sa UV detektorom na 205 nm, [80] kao i sa mobilnom fazom acetonitril, metanol, voda (25:35:40). [81] Još jedan sistem za određivanje diritromicina je na koloni Hypersil BDS C18 sa mobilnom fazom acetonitril, fosfatni pufer (1.41 g kalijum- dihidrogen fosfat i 6,91 g dikalijum-hidrogenfosfat koji se rastvara u 1000 mL vode), metanol (44:37:19) sa UV detektorom na 205 nm. [82]

Josamicin se može odrediti metodom adsorpcione "stripping" voltimetrije u farmaceutski doziranim oblicima i telesnim tečnostima. Metoda se bazira na adsorpcionoj akumulaciji antibiotika na visećoj elektrodi od žive. Josamicin je definisan katodnim pikom na $-1,38$ V (vs. Ag/AgCl elektrodi). Metoda je linearna u opsegu od 1.5×10^{-7} do 3.5×10^{-7} mol l⁻¹. [83]

Josamicin se u humanom serumu i urinu određuje metodom tečne hromatografije na reversno faznoj C18 koloni sa UV detektorom. Mobilna faza se sastoji od acetonitrila, 0,015 M fosfatnog pufera, pH 6,0 (5:2) sa protokom 1,2 ml min⁻¹. Temperatura kolone je 35 °C. Opseg koncentracija za određivanje u serumu je od 0,1 do 2,0 mg l⁻¹, a u urinu od 0,5 do 5 mg l⁻¹. [84]

Josamicin se u tabletama određuje tečnom hromatografijom na reversno faznoj C8 koloni sa UV detektorom na 210 nm. Mobilna faza se sastoji od amonijum-acetata, metanola i acetonitrila. [85] Još jedan sistem tečne hromatografije je i na koloni μ Bondapak-C18, sa mobilnom fazom methanol : 0,02 mol l⁻¹ kalijum-dihidrogenfosfat (65:35; pH = 3,3) i UV detektorom na 232 nm. [86]

Spiramicin se može odrediti voltametrijski diferencijalnom pulsnom polarografijom (DPP) i polarografijom sa pravougaonim talasom (SWP). Kao elektroda koristi se viseća elektroda od žive u puferu (pH 11,5) Spiramicin je određen katodnim pikom na $-1,45$ V vs. Ag/AgCl elektrodi. [87]

Spiramicin se može odrediti metodom reversno fazne tečne hromatografije sa mobilnom fazom koja se sastoji od acetonitrila i natrijum - dihidrogenfosfatnog pufera (22:78) i UV detektorom na 232 nm [88], kao i na koloni ZORBAX Eclipse XDB C18 i mobilnom fazom acetonitril, 0,05 M fosfatni pufer (pH 2,6) sa protokom 1,0 ml min⁻¹ i UV

detektorom na 232 nm .^[89]

Telitromicin se u biološkim tečnostima može odrediti metodom reversno fazne tečne hromatografije. Kao mobilna faza koristi se acetonitril, 0,03 M amonijum-acetat, pH 5,2 (43:57) i protok mobilne faze je 0,8 mL min⁻¹. Detektor je fluorescentni sa talasnom dužinom ekscitacije 263 nm i emisije 460 nm. Metoda je linearna u opsegu koncentracija od 0,01 do 5 µg ml⁻¹. Limit kvantifikacije je 0,02 i 0,015 µg ml⁻¹.^[90]

2.3.7. Elektrohemijske metode

Elektrohemija je oblast nauke koja se bavi fundamentalnim i primenjenim istraživanjima u analitičkoj hemiji, bioelektrohemiji, gorivnim spregovima, molekularnoj hemiji, koroziji, enzimima i mikrobima, nanostrukturnim materijalima i katalizi sa rezultatima koji su široko primjenjivi u svim oblastima svakodnevnog života. Osim u različitim oblastima tehnike, elektrohemija ima primenu u brojnim područjima biologije i medicine.

Osnovu elektrohemije čine hemijske reakcije u kojima je aktivan učesnik elektron kao osnovna čestica elektricneta i električne struje. Interakcija između elektrona i molekula ili jona izaziva redukciju ukoliko supstanca prima elektron ili oksidaciju ukoliko ga odaje. Elektrodna reakcija se uvek odigrava na graničnoj površini elektroda-elektrolit. [91]

Osnovni element elektrohemijskog sistema je elektrohemijska ćelija koja sadrži najmanje dve elektrode i rastvor elektrolita. Na jednoj elektrodi katodi, odigrava se elektroredukcija, a na drugoj, anodi elektrooksidacija. Rastvor elektrolita služi kao nosilac supstance koja reaguje ali i kao prenosilac električne energije u tom delu električnog kola koje čini ćelija. [91]

Elektrolit koji čini sastavni deo ćelije može biti tečan ili čvrst i neophodno je da što bolje provodi električnu struju. Rastvor to čini posedujući jone. Oni nastaju disocijacijom neutralnih molekula supstance. Disocijaciji najlakše podležu soli (praktično potpuno) i kiseline i baze (praktično potpuno ili samo delimično). [91]

U zavisnosti od pristupa elektrohemiji, u literaturi se može naći veći broj sistematizacija i podela elektroanalitičkih metoda. Po nekoj opšteprihvaćenoj podeli, elektroanalitičke metode se uopšteno dele na faradejske i nefaradejske.

Kod faradejskih metoda dolazi do direktne razmene elektrona između elektroaktivne vrste i radne elektrode. Zbog toga kod ovih metoda govorimo o radnim elektrodama, a naziv faradejske potiče od toga što kroz elektrolitičku ćeliju protiče struja (faradejska struja) određenog intenziteta.

Kod nefaradejskih metoda po pravilu nema direktne razmene elektrona između elektroaktivne vrste i indikatorske elektrode. Prema tome kada govorimo o nefaradejskim metodama po pravilu govorimo o indikatorskim elektrodama. [91]

Podela elektroanalitičkih metoda:

Faradejske (radne elektrode)

Elektrogravimetrija

Kulometrija

Volt (ampero) metrija – *Voltometrija*

Nefaradejske (indikatorske elektrode)

Konduktometrija

Potencimetrija

Elektroforeza ^[91]

2.3.7.1. Voltometrija

Polarografija i voltometrija su analitičke metode koje se zasnivaju na merenju zavisnosti struja-potencijal u elektrohemijskim ćelijama. Prema IUPAC-u, polarografija je metoda koja se odnosi na merenja u kojima se koristi tečna radna elektroda čija se površina obnavlja periodično ili kontinualno (npr. kapima). Tu spadaju dropping mercury electrode - DME (kapajuća živina elektroda) i static mercury drop electrode - SMDE (statična živina elektroda). ^[92]

Voltometrija obuhvata sve metode gde se koriste stacionarne ili fiksne radne elektrode. Npr. Hanging mercury drop electrode - HMDE (viseća živina elektroda), Thin mercury film electrode - TMFE (elektroda presvučena tankim filmom žive), Glassy carbon electrode - GCE (elektroda od staklastog ugljenika), Carbon paste electrode - CPE (elektroda od ugljenične paste), *Pt*, *Ag*, *Au* i dr.). ^[92]

Voltometrija pored potencimetrije i kulometrije čini osnovu elektroanalitičke hemije. Obuhvata skup elektroanalitičkih metoda kod kojih se podaci o analitu dobijaju iz merenja jačine struje u zavisnosti od priključenog napona pri uslovima koji izazivaju polarizaciju stacionarne ili fiksirane radne elektrode. Voltometrija se razvila iz polarografije kod koje je radna elektroda kapljuća živina elektroda. ^[93]

Različite metode obuhvaćene su terminima polarografija i voltometrija. One se razlikuju po tehnikama merenja i tipu električnog potencijala upotrebljenog za pobuđivanje.

U voltometriji se promenjivi potencijal koji se naziva ekscitacijski signal dovodi na elektrohemijsku ćeliju koja sadrži radnu elektrodu. Ekscitacijski signal stvara odgovor struje (faradejske) koja protiče kroz ćeliju u toku reakcije analita na radnoj elektrodi. ^[93] Bliže posmatranje struje koja teče kroz radnu elektrodu pokazuje da se ona sastoji od dve komponente, faradejske struje, koja potiče od redukcije ili oksidacije analita i nafaradejske

(kapacitivne ili kondenzatorske struje) koja nastaje usled pražnjenja elektrohemijskog dvostrukog sloja na površini radne elektrode. ^[93]

Kondenzatorska ili kapacitativna struja nastaje zbog toga što se radna elektroda ponaša kao kondenzator. Jednu ploču tog kondenzatora čini naelektrisanje na površini radne elektrode, a drugu suprotno naelektrisani joni ili dipoli rastvarača u rastvoru neposredno uz samu elektrodu. Ovo predstavlja električni ili elektrohemijski dvojni sloj. ^[91]

Sredinom 60-ih godina dvadesetog veka došlo je do modifikacije klasične voltometrije koja je postala znatno osetljivija i selektivnija. Tada je primena voltometrije postala mnogo značajnija za određivanje velikog broja jedinjenja naročito u farmaciji. Postoji mnogo načina da se elektrodi zada određeni potencijal. U zavisnosti od toga postoje različite vrste voltometrije.

1. Voltometrija sa linearnom promenom potencijala
2. Ciklična voltometrija
3. "Stripping" voltometrija- Voltometrija sa taloženjem i rastvaranjem
4. Diferencijalna pulsna voltometrija i normalna pulsna voltometrija
5. "Square wave" voltometrija -voltometrija sa pravougaonim impulsima ^[93]

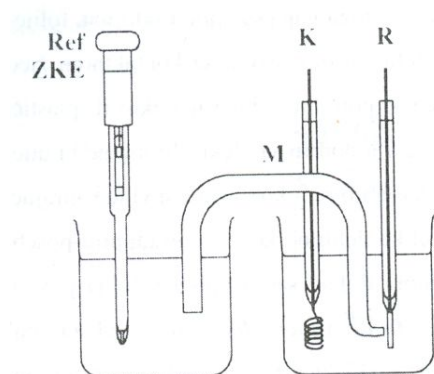
Voltometrijski sistem sastoji se od tri elektrode uronjene u rastvor analita i viška elektrolita koji ne reaguje a zove se osnovni elektrolit. Jedna od tri elektrode je radna elektroda čiji se potencijal održava na određenoj poznatoj vrednosti ili se kao u voltometriji sa linearnom promenom potencijala menja sa vremenom. ^[93]

Radna elektroda je elektroda na kojoj se ispituje željena pojava. ^[91] Male je površine čime se pojačava njena sklonost ka polarizaciji. Često je napravljena od inertnih metala kao što su plemeniti metali zlato, platina ili staklasti ugljenik i pirolitički grafit. ^[93]

Druga elektroda je *referentna elektroda* čiji potencijal je poznat i stabilan. ^[93] Referentna elektroda se u ćeliju uvodi preko *Luginove kapilare*. Vrh kapilare treba da se postavi na sto je moguće krace rastojanje od radne elektrode kako bi otpornost elektrolita između elektrode i vrha kapilare mogla da se svede na zanemarljivu vrednost, s obzirom na to da kada teče struja javlja se pad potencijala na tom rastojanju koji se sabira sa potencijalom elektrode, te mereni potencijal ne odgovara vrednosti elektrodnog

potencijala koji se zeli meriti ili nametnuti elektrodi. Referentna elektroda treba da se odvoji od rastvora koji se nalazi u celiji pomocu elektrolitickog mosta, da elektrolit iz ćelije ne bi prodirao u elektrolit referentne elektrode i obrnuto. ^[91]

Treća elektroda je *kontra elektroda (pomoćna elektroda)* koja je često platinska žica ili posuda sa živom koja omogućava tok struje od izvora kroz rastvor do radne elektrode. ^[93] Kontra elektroda obično ima veliku površinu u odnosu na radnu elektrodu. Kontra elektroda se stavlja na veću ili manju udaljenost od radne electrode. Na slici 11 prikazan je sistem za merenje u kinetici elektrodnih procesa gde R predstavlja radnu elektrodu, M- elektroliticki most sa luginovom kapilaramom a Ref je referentna elektroda. ^[91]



Slika 11. sistem za merenje u kinetici elektrodnih procesa ^[91]

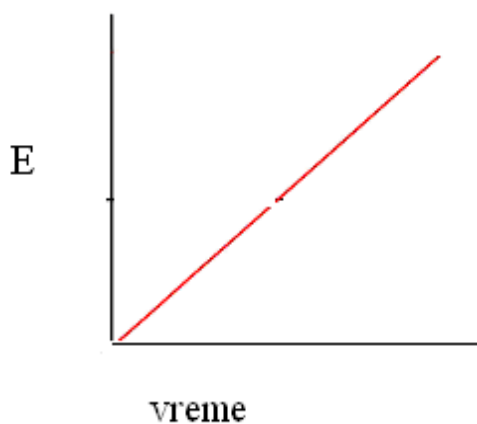
Kao što je već navedeno voltametrijske metode se zasnivaju na promeni potencijala stacionarne radne elektrode sa vremenom i merenja odgovarajuće struje koja se javlja kao posledica redukciono-oksidacionih procesa, a ispitivana vrsta na elektrodu dospeva procesom difuzije. Kod klasične polarografije, brzina promene potencijala je mala pa se ne uzima u obzir dok se kod ovih tehnika vrednost difuzione struje izražava u funkciji brzine promene potencijala radne elektrode. Metoda je u početku uvedena da bi se smanjilo vreme polarografske analize, ali eksperimentalni rezultati koji se bitno razlikuju od polarografskih, ne samo po obliku grafika, ukazali su na mogućnost praćenja niza novih efekata.

U toku preliminarnih istraživanja elektrohemijskog ponašanja ispitivanog sistema, voltametrijske tehnike su upravo one koje se koriste jer dobijeni voltamogram predstavlja skup informacija koji pokazuje potencijale na kojima se dešavaju oksidacioni ili redukcion

procesu, učešće homogenih reakcija u ukupnom elektrohemijском procesu, adsorpciju elektroaktivnih vrsta i slične informacije o ponašanju ispitivanog sistema. ^[91]

2.3.7.2. Voltometrija sa linearnom promenom potencijala

Najstarija i najjednostavnija voltometrijskih metoda je voltometrija sa linearnom promenom potencijala. Kod ove metode potencijal radne elektrode povećava se ili smanjuje brzinom od 2-5 mV/s. Struja najčešće u mikroamperima beleži se kao voltamogram koji je grafički prikaz struje u zavisnosti od potencijala radne elektrode. Postoje dve vrste voltometrije sa linearnom promenom potencijala, hidrodinamička voltometrija i polarografija.



Slika 12. Promena potencijala kod linearne voltometrije ^[93]

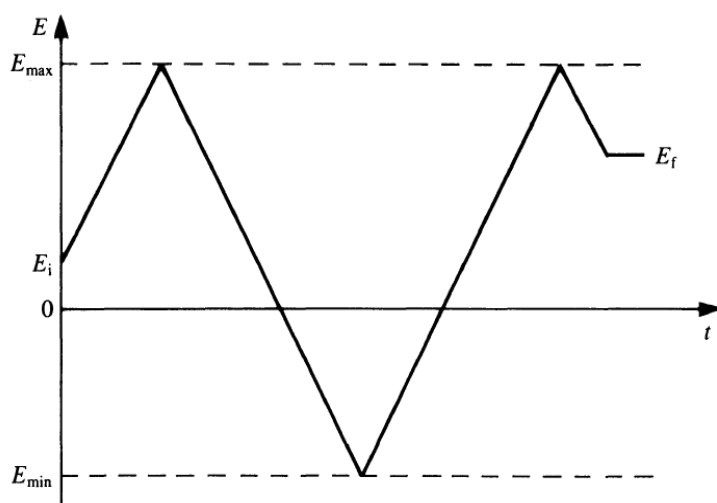
Primena ovih metoda je za dokazivanje i određivanje hemijskih jedinjenja na izlazu iz hromatografske kolone, za rutinsko određivanje glukoze, saharoze i laktoze i za određivanje završnih tačaka kulometrijskih i volumetrijskih titracija ^[93]

2.3.7.3. Ciklična voltametrij

Ciklična voltametrij predstavlja metodu koja se široko koristi za sagledavanje elektrohemijskog sistema u celini, svih procesa koji se u njemu odigravaju u širokom opsegu potencijala, potencijala u kome se odigrava svaki pojedinačni proces kao i struja, kao odraza brzine tih procesa u datim uslovima.

To se postiže jednostrukim korišćenjem ili višestrukim ponavljanjem trougaonog pulsa potencijala, tako što se potencijal menja linearno u opsegu potrebnom da se sagledaju svi procesi, a ograničenom u vodenim rastvorima, izdvajanjem vodonika na nekom negativnom ili kiseonika na nekom pozitivnom potencijalu. Kada se dostigne potencijal na kome određeni proces može da se odigrava primetnom brzinom, struja počinje naglo eksponencijalno da raste. Sa nastupanjem difuzione polarizacije dolazi do usporavanja tog porasta, da bi se dostigao maksimum posle koga struja za taj proces opada na nulu, ali registrovana struja zadržava neku minimalnu vrednost (određenu kapacitetom elektrohemijskog dvosloja koji se puni usled stalne promene potencijala) ukoliko se nije dostigao potencijal započinjanja sledećeg procesa.^[91]

Snimanje cikličnih voltamograma se sastoji od reversne promene potencijala od vrednosti E_1 do vrednosti E_2 pa ponovo do vrednosti E_1 odgovarajućom brzinom skeniranja (slika 13)



slika 13. Promena potencijala sa vremenom kod ciklicne voltametrije^[92]

Za proces oksidacije obično se polazi od elektrodnog potencijala na kome nema oksidacije i u toku snimanja elektrodni potencijal se menja prema pozitivnijim vrednostima. Obrnuto, za proces redukcije polazi se od elektrodnog potencijala na kome nema redukcije, a elektrodni potencijal se menja prema negativnijim vrednostima.

Elektrodni potencijal u određenom trenutku ima vrednost:

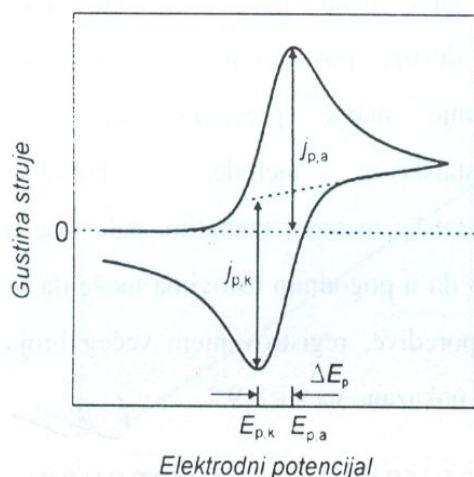
$$E(t) = E_i + vt \quad (1)$$

Nakon postizanja konačne vrednosti elektrodnog potencijala koja se za primer oksidacije obično postavlja na vrednost nešto manju od potencijala oksidacije rastvarača ili osnovnog elektrolita, elektrodni potencijal se vraća na početnu vrednost, a elektrodni potencijal u određenom trenutku ima vrednost:

$$E(t) = E_i - vt \quad (2)$$

Prilikom povratka potencijala redukuje se deo vrste koja je oksidovana u direktnom snimanju. Brzina promene potencijala v , brzina polarizacije ili brzina skeniranja kao i kod linearne voltametrije se kreće od nekoliko mV/s do nekoliko miliona V/s. Primena brzina od nekoliko miliona volti u sekundi zahteva upotrebu mikroelektroda i posebnih instrumenata. ^[92]

Tipičan ciklični voltamogram za reverzibilni proces je dat na slici 14.



Slika 14. Izgled cikličnog voltamograma reverzibilnog procesa ^[91]

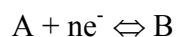
Uobičajeno je da reduktivnom procesu odgovara negativna struja, a oksidacionom pozitivna.

Svaki proces karakterišu potencijal vrha maksimuma struje i strujni vrh (peak Current) na voltamogramu. Za ciklične voltamograme tj. za mnoge reakcije koje se ispituju cikličnom voltametrijom karakteristična je veća ili manja naspramnost pikova. U tome se razlikuju povratni (reversible) i nepovratni procesi (irreversible). ^[91]

Reverzibiln (Nernstovski) sistemi

Povratnim procesom smatra se proces koji ima dovoljno vrednost konstante brzine da se za korišćenu brzinu promene potencijala (sweep rate) na svakom postignutom potencijali uspostavlja ravnotežu između reaktanta i produkta u prielektrodnom sloju čija je koncentracija određena isključivo difuzijom. U takvom slučaju moglo se izvesti da je rastojanje anodnog i katodnog vrha određeno isključivo brojem elektrona razmenjenih u svakom pojedinačnom događaju elektrohemijske reakcije ^[91].

Ako se razmotri jednostavna reverzibilna reakcija redukcije oksidovane vrste A u redukovanu vrstu B, koja se može predstaviti jednačinom:



Polazeći od drugog *Fick*-ovog zakona difuzije za oksidovani A i redukovani B oblik elektroaktivne vrste. Izraz za krivu struja-potencijal se dobija rešavanjem diferencijalnih jednačina:

$$\frac{\partial C_A}{\partial t} = D_A \frac{\partial^2 C_A}{\partial x^2} \quad (3)$$

$$\frac{\partial C_B}{\partial t} = D_B \frac{\partial^2 C_B}{\partial x^2}$$

gde su C_A i C_B koncentracije oksidovane vrste A, odnosno redukovane vrste B, a D_A i D_B njihovi difuzioni koeficijenti, x je udaljenost od površine elektrode, a t vreme proteklo od početka elektrolize.

Na početku je $t = 0$, $x > 0$, $C_A = C_0$ и $C_B = 0$. Kada je $t > 0$:

2 Odnos koncentracija oba oblika na elektrodi ($x \geq 0$) predstavlja se Nernstovom jednačinom:

$$C_A / C_B = \exp [nF/RT(E-E^0)],$$

zamenom $E = E_i - vt$ dobija se oblik:

$$C_A / C_B = \exp [nF/RT(E_i-E^0)] \exp [nF/RT(-vt)] \quad (4)$$

3 Zbir tokova oksidovane i redukovane vrste na površini elektrode ($x = 0$) jednak je nuli:

$$D \frac{\partial C_A}{\partial x} + D \frac{\partial C_B}{\partial x} = 0$$

Kao rešenje diferencijalne jednačine $\frac{\partial C_A}{\partial t} = D_A \frac{\partial^2 C_A}{\partial x^2}$, pod pretpostavkom da je difuzija linearna, dobija se:

$$i_p = 0,4463nFA(nF / RT)^{\frac{1}{2}} D^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}} C_0 \quad (5)$$

Ovaj izraz se naziva **Randles-Ševčikovom jednačinom**. Kada je $T=25^{\circ}C$, jednačina dobija oblik:

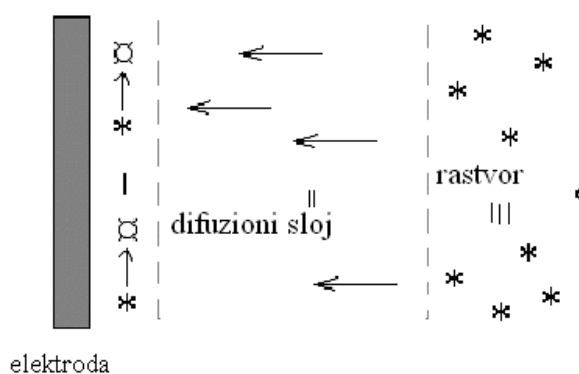
$$i_p = 2,69 \cdot 10^5 An^{\frac{3}{2}} D^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}} C_0 \quad (6)$$

gde je i_p - struja pika izražena u amperima, A - površina elektrode izražena u cm^2 , D - difuzioni koeficijent izražen u jedinici cm^2s^{-1} , v - brzina promene potencijala izražena u Vs^{-1} i C_0 koncentracija oksidovanog oblika izražena u molcm^{-3} [93,94,95]

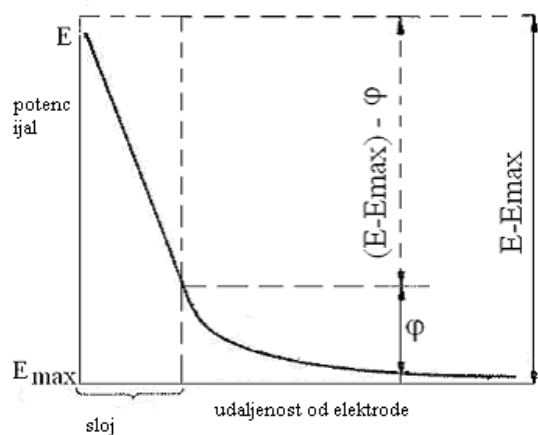
Iz Randles-Ševčikove jednačine proizilazi da struja pika zavisi od:

- koncentracije elektroaktivne vrste,
- difuzionog koeficijenta,
- broja izmenjenih elektrona,
- veličine površine elektrode, i
- brzine promene potencijala.

Na *slici 15.* je prikazan model granice faza, elektroda/rastvor, područje označeno kao I je tanak sloj uz samu elektrodu, debljine nekoliko Å i u ovom sloju se odigrava glavna elektrohemijaska reakcija. Područje III označava glavni rastvor, gde elektrodni proces više ne utiče na koncentraciju elektroaktivne vrste. Razlog tome je što potencijal opada sa povećanjem udaljenosti od elektrode (sl. 17). Područje II je difuzioni sloj kroz koji elektroaktivna vrsta difunduje prema elektrodi zbog koncentracionog gradijenta između rastvora III i površine elektrode I. [98]



Slika 15. Model granice faza [98]

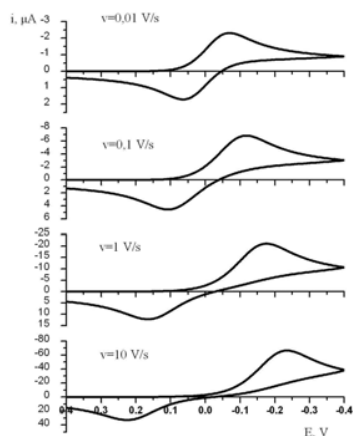


Slika 16. Promena potencijala sa povećanjem udaljenosti od elektrode^[98]

Ciklična voltometrija je jedna od metoda za proučavanje kinetike elektrohemijskih reakcija. Prethodno opisane karakteristike cikličnih voltamograma odnose se na elektrohemijske reakcije ograničene samo difuzijom (takozvani reverzibilni sistem) dok ciklični voltamogram za ireverzibilni (potpuno ograničen kinetikom prenosa naelektrisanja) i kvazireverzibilni sistem (delimično ograničen) ima nešto drugačiji izgled^[91].

Ireverzibilni sistemi

Kada je brzina prenosa elektrona nedovoljna da omogući površinsku ravnotežu i oblik cikličnih voltamograma se menja. Pri tom oblik voltamograma zavisi od brzine polarizacije. Pri nižim vrednostima brzine polarizacije prenos elektrona je brži od masenog transporta elektroaktivne vrste što se manifestuje dobijanjem cikličnog voltamograma kao za reverzibilni proces. Međutim, sa porastom brzine polarizacije raste i brzina masenog transporta tako da ove dve veličine postaju uporedive i dolazi do remećenja ravnoteže na površini elektrode. Najvidljiviji efekat ovakvog nereverzibilnog ponašanja je povećanje razlike potencijala katodnog i anodnog pika sa povećanjem brzine polarizacije.^[91,96]

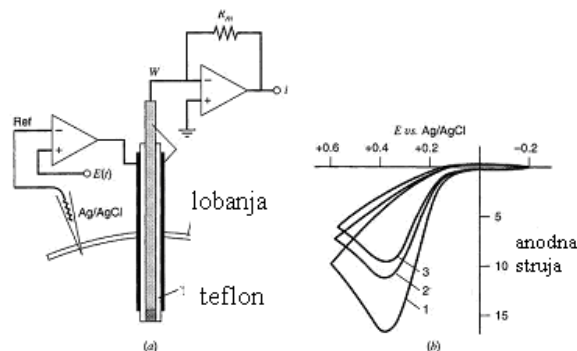


Slika 17. Ciklični voltamogrami ireverzibilnog procesa za različite brzine promene potencijala [91,96]

Moguće je da se isti elektrodni proces pri nižim brzinama promene potencijala ponaša kao reverzibilan, a da pri većim brzinama postaje ireverzibilan. Između ta dva slučaja postoji oblast u kojoj se elektrohemijski proces odvija kao kvazireverzibilan. Kvazireverzibilni procesi se javljaju kada postoji ograničenje u brzini prenosa naelektrisanja. Najsigurnija identifikacija ireverzibilnosti nekog elektrohemijskog procesa je odsustvo reverzibilnog pika na cikličnom voltamogramu.

Ciklična voltametrija je jedna od metoda za izučavanje mehanizama elektrodnih reakcija, homogenih reakcija, elektrokatalize i adsorpciono-desorpcionih procesa. Treba pomenuti da je rezultat elektrohemijskih istraživanja veoma velik jer elektrodne reakcije mogu biti reverzibilne, ireverzibilne i kvazireverzibilne, mogu biti sa višestrukim (uzastopnim) prenosom naelektrisanja, zatim mogu uključivati hemijske reakcije (reverzibilne i ireverzibilne), a elektroaktivne vrste mogu da se adsorbuju na elektrodama.

Ciklična voltametrija može da se koristi za određivanje nekih supstanci *in vivo*. Tipičan primer u kome je primenjena elektroda od ugljenične paste je ispitivanje askorbinske kiseline u mozgu pacova (slika 18). [95]



Slika 18. Primena ciklične voltametrije za analizu tkiva mozga *in vivo* a) aparatura za cikličnu voltametriju, b) ciklični voltamogram oksidacije askorbinske kiseline. [95]

2.3.7.4. "Stripping" voltametrija (anodna, katodna i adsorpciona)

Ove voltametrijske metode su najefikasnije elektrohemijske tehnike za analizu ultramikro količina (tragova).

Neuobičajeno visoka osetljivost i selektivnost se baziraju na činjenici da se određivana supstanca akumulira pre svog određivanja i da su i akumulacija i određivanje elektrohemijski procesi čije se odigravanje može kontrolisati. Određivanja "Stripping" voltametrijom su generalno osetljivija, tako da su granice detekcije između 10^{-9} – 10^{-11} mol/L, a u nekim slučajevima čak i 10^{-12} mol/L. To znači da ove metode spadaju među najosetljivije instrumentalne metode analize. One su takođe superiorne u odnosu na druge tehnike analize tragova po korektnosti izmerenih vrednosti. Pošto se i akumulacija i određivanje odigravaju na istoj elektrodi bez promene posude, to znači da se pojava sistematskih grešaka zbog kontaminacije ili isparavanja mogu držati na vrlo niskom nivou.

Rastvaranje u toku određivanja akumuliranih proizvoda je njihovo uklanjanje sa radne elektrode odakle potiče termin skidanje (engleski *stripping*). Ovaj proces se može pratiti voltametrijski i otuda nazivi voltametrija sa rastvaranjem (*stripping voltammetry*).

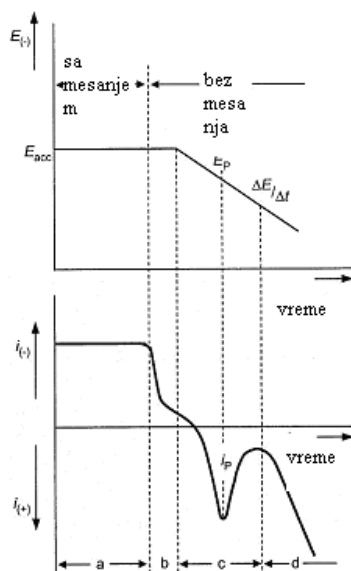
Akumulacija se uvek odigrava na konstantnom potencijalu (E_{ac} – potencijal akumulacije) na stacionarnoj živinoj elektrodi, filmu žive ili elektrodi od plemenitog metala i u kontrolisanom vremenskom periodu (t_{ac} akumulaciono vreme). Analit se taloži

elektrolitički kao metal, kao slabo rastvorno Hg(I) jedinjenje ili adsorptivno kao kompleksno jedinjenje. Uklanjanje akumuliranog analita sa radne elektrode, zasniva se na procesu oksidacije ili redukcije.

Kod anodnog rastvaranja elektroda se tokom talozenja ponasa kao katoda , a tokom rastvaranja kao anoda. Kod katodnog rastvaranja je obrnuto. Taloženjem se analit elektrohemijski koncentruje. To znaci da je koncentracija analita na površini elektrode mnogo veća nego u samom rastvoru. [94,97]

Anodna "stripping" voltametrija - Voltametrija sa anodnim rastvaranjem

Anodna stripping voltametrija može da se koristi za određivanje svih metala koji su rastvorni u živi uz stvaranje amalgama ili koji se mogu elektrolitički taložiti na elektrodama od ugljenika ili plemenitog metala. Stepeni kod određivanja prikazani su na slici 19.



Slika 19. Stepeni metode i kriva struja-potencijal pri određivanjima sa anodnom stripping voltametrija ; E_{ac} akumulacioni potencijal, $\Delta E/\Delta t$ brzina promene potencijala, E_p pik potencijala, i_p pik struje, a vreme akumulacije, b period mirovanja, c stepen određivanja, d anodno rastvaranje Hg elektrode. [97]

Deo **a** je vreme akumulacije, u kome se analit taloži na radnoj elektrodi pri konstantnom potencijalu i uz kontinualno mešanje rastvora uzorka

Deo **b** je period mirovanja. U toku ovog perioda rastvor uzorka se više ne meša, što znači da katodna struja opada zbog nedostatka konvekcije. Kako se male količine analita talože čak i iz nemešanog rastvora, ovaj period takođe mora biti kontrolisan. Zbog toga period mirovanja treba da bude 5 s do maksimalno 30 s.

U Anodnoj stripping voltametriji određivanje se bazira na anodnom rastvaranju akumuliranog analita. Ovaj proces se prati voltametrijski i daje pik struje.

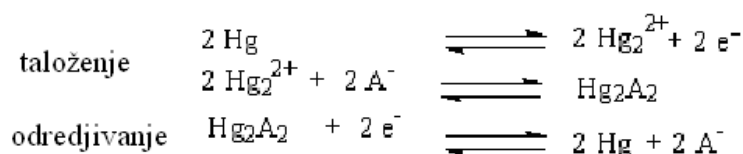
Određivanje Al i Au, koji su takođe lako rastvorni u živi, nije moguće jer su ovi metali plemenitiji od žive, tako da se rastvara samo živa, a ne i analit. Ovo je i razlog zašto se plemeniti metali mogu akumulirati i odrediti samo na inertnim elektrodama napravljenim od plemenitih metala ili ugljenika. Na kraju, moguće je odrediti Hg anodnom stripping voltametrijom, akumulirajući je u obliku amalgama na rotirajućoj disk elektrodi od zlata i njenim anodnim rastvaranjem. ^[94,97]

Katodna "stripping" voltametrija-Voltametrija sa katodnim rastvaranjem

Katodna stripping voltametrija je metoda koja se koristi za određivanje neorganskih i organskih anjona i razlikuje se od anodne stripping voltametrije ne samo u procesu određivanja nego i u akumulacionom procesu.

Pri akumulaciji analit je staložen anodno kao slabo rastvorna živa (I) so. Najprostiji i najčešći proces je akumulacija u obliku soli jednovalentne žive, Hg_2A_2 . U toku određivanja Hg_2^{2+} iz akumuliranog Hg_2A_2 se katodno redukuje tako da se mehanizam može prikazati i na sledeći način:

Mehanizam katodne stripping voltametrije:



Halogenidi, pseudohalogenidi, oksometalati i organski anjoni mogu se odrediti u tragovima ovim indirektnim postupkom. Kako se u svakom slučaju proces određivanja zasniva na redukciji Hg_2^{2+} jona teško rastvornog jedinjenja staloženog tokom akumulacije na površini elektrode, pikovi imaju slične potencijale. Organske supstance se takođe mogu odrediti na sličan način kao neorganski anjoni. Među supstancama koje reaguju sa Hg_2^{2+} jonima su tioli, merkaptani, cistein, glutamin, tiourea, tioamini, barbiturna kiselina, derivati uracila. [94,97]

Adsorpciona "stripping" voltometrija - Voltometrija sa obogaćivanjem analita adsorpcijom i sukcesivnim rastvaranjem

U adsorpcionoj "stripping" voltometriji analit se akumulira u pogodnom obliku adsorpcijom na elektrodnoj površini, a onda se voltometrijski određuje oksidacijom ili redukcijom. Adsorptivna akumulacija je važan dodatak elektrolizi jer omogućava da se voltometrija sa obogaćivanjem koristi za određivanje onih elemenata koji se ne mogu akumulirati ili odrediti zbog ireverzibilnosti elektrodnih reakcija ili zbog nedostatka građenja amalgama na Hg elektrodi. Između ostalih u ovu grupu elemenata spadaju Al, Fe, Co, Ni, Ti, Cr, Mo, W, Sb, V, U i platinski metali. Pored toga takođe je pogodna za analizu mnogih organskih jedinjenja.

Uglavnom je adsorpciona "stripping" voltometrija efikasnija od anodne "stripping" voltetrije. Veća osetljivost metode se zasniva na činjenici da adsorbovano jedinjenje ostaje na elektrodnoj površini, dok kod anodne "stripping" voltetrije staloženi metal difunduje u film žive ili živinu kap. Kao rezultat, nakon akumulacije adsorpcijom, lokalni akumulacioni faktor tj. koncentracija analita raspoloživa za proces rastvaranja sa elektrodne površine je veći nego nakon elektrolize i nastajanja amalgama.

Posebno je pogodna za određivanje tragova elemenata u vodama. Ovo znači da je adsorpciona "stripping" voltetrija, zajedno sa mnogo komplikovanim tehnikama, kao što su masena spektrometrija i neutron aktivaciona analiza (čija je eksploatacija skupa), jedna od najosetljivijih metoda instrumentalne analize.

Ova metoda se koristi za određivanje tragova Pt u morskoj vodi, telesnim tečnostima i tkivima. Na ovaj način moguće je odrediti elemente koji se ne mogu elektrohemijski redukovati (ili se vrlo teško redukuju) u vodenom rastvoru. Među ovim elementima je aluminijum čije je određivanje pri analizi tragova prilično problematično. Granice detekcije se nalaze u opsegu ultra tragova oko 10^{-10} mol/L pa i niže. Među jedinjenjima koji se adsorptivno akumuliraju i određuju voltametrijom rastvaranjem, oksidacijom ili redukcijom su boje, benzodiazepini, tetraciklini, indoli i različita zaštitna sredstva za biljke. [94,97]

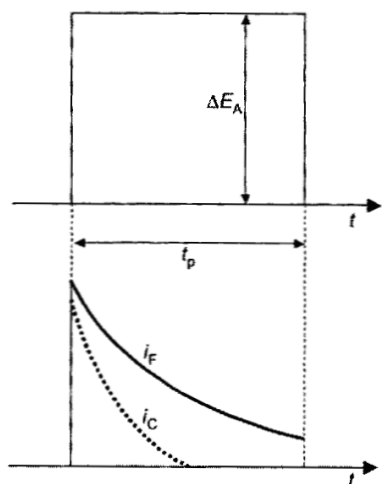
2.3.7.5. Pulsne metode

Nedostaci nekih voltametrijskih metoda izbegnuti su primenom novih pulsni metoda kao što je voltometrija sa pravougaonim talasima, normalna i diferencijalna pulsna voltometrija. Povećanje osetljivosti određivanja može se postići poboljšanjem odnosa signala i šuma tj. odnosa faradejske i kondenzatorske struje (i_F/i_C). To se postiže delimičnim eliminisanjem kondenzatorske struje i_C (uglavnom izazvane periodičnim punjenjem i pražnjenjem dvostrukog sloja). Pristup koji se odnosi na smanjenje kondenzatorske struje doveo je do pojave pulsni metoda.

Opšta karakteristika ovih metoda da se elektroodni procesi pobudjuju na različite načine pri periodičnim promenama potencijala pravougaonih talasa sa konstantnom ili rastućom amplitudom ΔE_A . Rezultat toga je da se pri kraju trajanja impulsa t_p , uglavnom meri faradejski doprinos dok je istovremeno kapacitativna struja skoro potpuno iscezla (slika 20). Zavisnost kapacitativne struje tokom vremena impulsa data je relacijom:

$$i_c = \frac{\Delta E_A}{R} x e^{-\frac{t}{RC_D}} \quad (7)$$

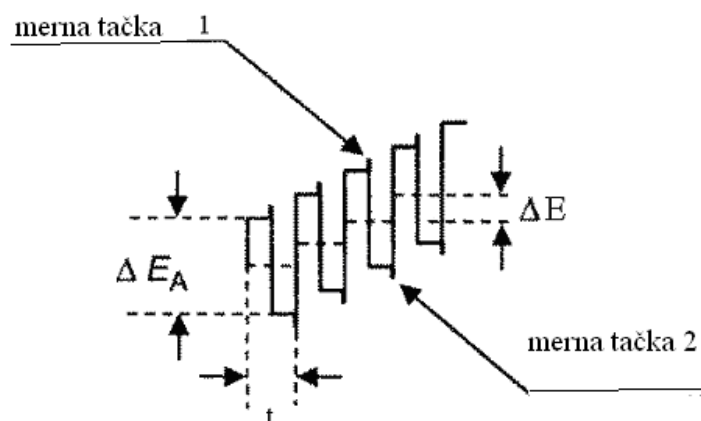
gde je i_C -kapacitativna struja, ΔE_A -amplituda impulsa, R -otpor pražnjenja, t - vreme posle primene impulsa, C_D -kapacitet dvostrukog sloja radne elektrode



slika 20. Princip pulsnih metoda. [97]

2.3.7.6. Voltometrija sa pravougaonim impulsima (SWV-square wave voltametry)

Metoda poznata pod imenom voltometrija sa pravougaonim impulsima je metoda kod koje se celokupon postupak merenja odigrava na jednoj zivinoj kapi $\Delta E_A = 50$ mV i sa brzom promenom potencijala. Trajanje potencijalnog stepena je identično sa dužinom trajanja pulsa pravougaonog talasa i iznosi 5-10 ms tj. na svaki stepen potencijala dodata je samo jedna oscilacija potencijala pravougaonog talasa sa relativno velikom amplitudom (slika 21).



slika 21. Tehnika merenja u voltametriji sa pravougaonim talasima, t_{step} trajanje stepena potencijala ili pulsa pravougaonog talasa (10 ms), ΔE_A amplituda potencijala pravougaonog talasa (20 mV), ΔE_{step} potencijalski stepen povećanja (4 mV) ^[97]

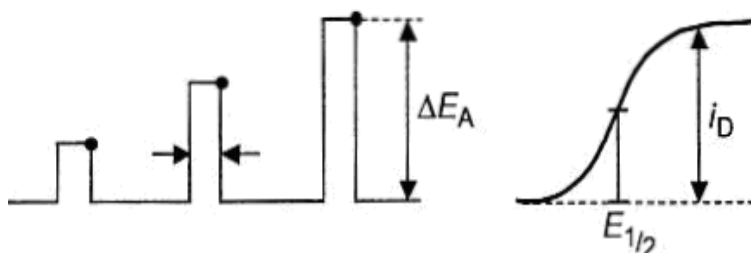
Razlika između izmerenih vrednosti u tačkama 1 i 2 (za vrlo kratka merenja) prikazuje se u zavisnosti od potencijala i dobija se kriva struja-potencijal.

Voltametrija sa pravougaoni talasom može se upotrebiti i kao detektor za HPLC. ^[94,97]

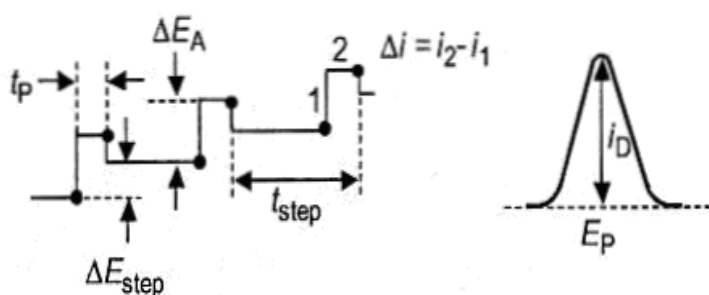
2.3.7.7. Normalna pulsna voltametrija (NPV) i diferencijalna pulsna voltametrija (DPV)

U normalnoj pulsnoj voltametriji (NPV) potencijal se ne menja linearno rastućim potencijalom nego sa pulsevima potencijala pravougaonih talasa sa rastućom visinom (amplituda pulsa ΔE_A) superponiranjem na konstantan početni potencijal. Superponiranje pulsa je sinhronizovano sa nastajanjem kapi pri čemu svaka kap ima jedan puls potencijala sa vremenom pulsa od oko 50 ms primenjen na nju. Amplituda raste od jedne kapi do sledeće za konstantnu veličinu i postize maksimum od 1000 mV. Struja se meri na kraju života kapi oko 10 do 15 ms pre završetka vremena impulsa t_p . Postoji promena potencijala na svakoj kapi relativno velika, a vreme trajanja pulsa vrlo kratko nastaje veliki koncentracioni gradijent i kao rezultat velika faradejska struja. Obrnuto kondenzatorska

struja ostaje mala, jer se merenje vrši kada je površina živine kapi konstantna i i_c praktično nestaje za vreme merenja. Izmerena struja se snima do sledeceg merenja (na sledećoj kapi). Ako se pojedine vrednosti struje prikazu u zavisnosti od promene potencijala pulsa dobijaju se krive struja-potencijal stepenastog oblika. Krive su oblika pika ako se struja svakog prethodnog pulsa oduzme od sačuvane izmerene vrednosti sledećeg. Osetljivost koja se može postići je oko 10^{-7} mol/L. Slika 25 pokazuje ekscitacioni signal i krivu struja-potencijal za NPV. ^[94,97]



Slika 22. Ekscitacioni signali i krive struja-potencijal kod normalne pulsne voltometrije NPV. ^[97]



Slika 23. Ekscitacioni signali i krive struja-potencijal diferencijalne pulsne voltometrije DPV. ^[97]

Najefikasnija pulsna metoda je diferencijalna pulsna voltetrija (DPV). Kod digitalnih instrumenata pobudjujuci signal se sastoji od stepenastog povećanja jednosmernog potencijala (potencijal stepena ΔE_{step}) na koji se primenjuju mali pulsevi

pravougaonih talasa konstantnog potencijala (amplituda impulsa ΔE_A). Superponiranje je sinhronizovano sa vremenom kapanja i odigrava se kada se površina elektrode dalje ne menja. Slika 26 prikazuje mernu tehniku DPV.

Struja se meri dva puta na svakoj živinoj kapi, pre svakog pulsa i na kraju vremena pulsa t_p . Razlika između merenja (Δi) se crta u zavisnosti od jednosmernog potencijala i dobijaju se voltamogrami oblika pika jer je Δi najveća za promenu potencijala u oblasti polutalasnog potencijala. Nastajanje ove razlike takođe dovodi do daljeg smanjenja doprinosa kondenzatorske struje i stoga do povećanja osetljivosti čak i kada se poredi sa određivanjima sa NPP.

Struja pika u DPP je data relacijom:

$$i_p = \frac{n^2 F^2}{4RT} A C_a E_A \sqrt{\frac{D}{\pi t_p}} \quad (7)$$

gde je i_p struja pika, n broj razmenjenih elektrona u reakciji, F faradejeva konstanta, R gasna konstanta, T apsolutna temperatura, A površina elektrode, S_a koncentracija određivane supstance, ΔE_A amplituda pulsa, D difuzioni koeficijent određivane supstance, t_p vreme trajanje pulsa

Prema jednačini za reverzibilne elektrodne procese visina pika i_p u voltamogramima je proporcionalna koncentraciji analita c_a i određena je amplitudom ΔE_A pulsa pravougaonih talasa kao i vremenom trajanja pulsa t_p . Granica detekcije u DPV iznosi $\sim 10^{-7} - 10^{-8} \text{ mol l.}^{-1}$

Jedna od prednosti ove metode je što se pojedinačni maksimum krive može dobiti za supstance sa sa polutalasnim potencijalom koji se razlikuju za 0,04 V-0,05 V. Nasuprot tome normalna pulsna voltometrija zahteva razliku potencijala od najmanje 0,2 V za razlikovanje talasa. Derivativni voltamogrami daju maksimume pogodne za kvalitativnu analizu. [94,97]

2.3.8. Metode elektrohemijskog određivanja makrolidnih antibiotika opisane u literaturi

2.3.8.1 Elektrohemijsko određivanje eritromicina

Prvi radovi koji se odnose na određivanje eritromicina metodom tečne hromatografije sa elektrohemijskom detekcijom objavljeni su 1983 godine. Različite HPLC metode koje koriste elektrohemijski detektor našle su primenu za kvantitativno određivanje eritromicina u serumu, plazmi i urinu, a manji broj radova odnosi se na određivanje u životinjskim tkivima. [99-100,145]

S obzirom da su elektrohemijske metode jeftinije i brže od hromatografskih objavljeno je nekoliko radova u kojima se eritromicin određuje elektrohemijski na osnovu svojih oksidativnih osobina. U tim metodama određivanja korišćene su različite elektrode od staklastog ugljenika. [101-103]

Zapaženo je da se elektrohemijsko ponašanje eritromicina A na elektrodi od zlata u velikoj meri razlikuje od azitromicin dihidrata što je izazvano razlikama u strukturi. [104,105] Poređenjem elektrohemijske aktivnosti eritromicina i klaritromicina uočeno je da je elektrohemijska aktivnost eritromicina izraženija. Uzimajući u obzir da je 6-hidroksi grupa eritromicina metilovana da bi se dobio klaritromicin pretpostavlja se da je aktivnost eritromicina izraženija zbog prisustva slobodne hidroksilne grupe. [106]

HPLC analiza elektrolita posle elektrohemijske reakcije je potvrdila ovo zapažanje i pokazala da su se u toku elektrohemijske oksidacije eritromicina desile promene u strukturi eritromicina. Početna koncentracija antibiotika se smanjila dok su koncentracije nečistoća porasle. Takođe su detektovani i neki novi produkti. Proizvodi oksidacije eritromicina nisu samo protonovane soli i demetilovani eritromicin. [104]

Prema snimljenim hromatogramima, dobijeni pikovi takođe mogu odgovarati anhidro ili demetilovanim proizvodima, kao što su anhidro-N-demetileritromicin A i anhidroeritromicin C. Moguće formiranje eritromicina C ili D desilo bi se usled cepanja etarske veze. FTIR rezultati zajedno sa rezultatima ciklične voltometrije i tečne

hromatografije ukazuju da je na elektrodi od zlata u elektrolitu 0,05 M NaHCO_3 eritromicin elektrohemijski reaktivniji od klaritromicina. ^[104]

2.3.8.2. *Elektrohemijsko određivanje azitromicina*

Studije elektrohemijske oksidacije i određivanja azitromicina na elektrodi od staklastog ugljenika i modifikovanim elektrodama od staklastog ugljenika (elektroda od ugljenične paste, grafita itd.) objavljene su ranije. Odnose se na voltametrijsko određivanje azitromicina na elektrodama od ugljenične paste, ^[107] određivanje adsorpcionom "stripping" voltametrijom na elektrodi od staklastog ugljenika ^[108] i voltametrijsko određivanje azitromicina u farmaceutskim doziranim oblicima. ^[109] Takodje je poznata metoda elektrohemijske oksidacije azitromicina i njegova interakcija sa albuminom iz govedjeg seruma ^[111], kao i identifikacija azitromicina abrazivnom "stripping" voltametrijom ^[110] i matematičko modelovanje elektrodnog procesa azitromicina koristeći viseću kapljuću živinu elektrodu. ^[111]

Postoje takodje neki podaci koji se odnose na validiranu LC metodu za in vitro određivanje azitromicina koristeći elektrohemijsku detekciju sa dualnom elektrodom od staklastog ugljenika ^[112]. Elektrohemijska oksidacija azitromicina na elektrodi od platine u acetonitrilu praćeno je voltametrijom i in situ FTIR spektroskopijom. ^[113]

Elektroda od zlata se pokazala kao odličan izbor za uspešno kvalitativno i kvantitativno određivanje azitromicin dihidrata i azitromicina u Hemomicin kapsulama. Ova ispitivanja su dala mogućnost da u budućnosti ove metode nadju primenu u analiziranju bioloških uzoraka. ^[105,115]

Vrednost visine strujnog pika oksidacije čistog azitromicina i azitromicina u Hemomycin® kapsulama na 0,6 V prema SCE u 0,05 M NaHCO_3 pri brzini promene potencijala 50 mVs^{-1} je linearna funkcija koncentracije u opsegu od 0,235 do 0,588 mg cm^{-3} . Slični, ali manje dobri rezultati dobijeni su kada se kao elektrolit koristi smeša metanol : 0,05 M NaHCO_3 (1:1).

HPLC analiza glavnine elektrolita u toku i posle elektrohemijske reakcije je potvrdila da vrednosti pika struje odgovaraju koncentracijama antibiotika u ispitivanom opsegu. [105,115]

U slučaju komercijalnog azitromicina (Hemomycin® kapsule) razvijena je elektrohemijska metoda za razdvajanje azitromicina i ekscipijensa laktoze monohidrata u elektrolitu 0,05 M NaHCO₃ u odsustvu metanola. Za kvalitativno i kvantitativno određivanje azitromicina u Hemomycin® kapsulama treba izbegavati prisustvo metanola u elektrolitu. [105,115]

2.3.8.3. *Elektrohemijsko određivanje klaritromicina*

U ranije objavljenim radovima postoje neki podaci koji se odnose na voltametrijsko određivanje klaritromicina u Klaricid tabletama HPLC metodom sa elektrohemijskim detektorom. [69]

Klaritromicin se amperometrijski detektuje u uzorcima humane plazme koja sadrži metabolite klaritromicina. Kao radna elektroda koristi se elektroda od staklastog ugljenika u uslovima hidrodinamicne voltametrije. Ne postoje podaci koji se odnose na elektrohemijsku identifikaciju klaritromicina u tabletama, njegov sadržaj i uticaj tabletno mase na detekciju klaritromicina. [69]

Ove metode su našle primenu u određivanju bioekvivalencije i farmakokinetickim studijama. [71]

Kao i ostali i makrolidni antibiotici i klaritromicin je elektrohemijski ispitivan na različitim elektrodama ali najčešće na elektrodi od staklastog ugljenika. [108-109,111,116] Kvalitativno određivanje standarda klaritromicina radjeno je na elektrodi od zlata u neutralnom elektrolitu 0,05M NaHCO₃ cikličnom voltametrijom. [109]

Elektroda od zlata u oblasti potencijala od -1,2 do 1,0 V vs. SCE u 0,05 M NaHCO₃ kao elektrolitu je odličan izbor za elektrohemijsko određivanje standarda klaritromicina i komercijalnog klaritromicina. [106, 117]

Komercijalni klaritromicin u Clathrocyn[®] tabletama određen je pod istim eksperimentalnim uslovima. Clathrocyn[®] tablete u sastavu placebo imaju nekoliko ekscipijenasa: povidon K90, avicel pH101, magnezijum-stearat i prosolv SMC90. Ovi ekscipijensi uglavnom ulaze u sastav placebo za proizvodnju tableta čija je aktivna supstanca klaritromicin. Avicel pokazuje katodni pik na $-0,90$ V vs. SCE a prosolv pokazuje anodni pik na $+0,33$ V vs. SCE. ^[117]

Standard klaritromicina je na elektrodi od zlata definisan sa četiri anodna (na $0,58$ V, $0,31$ V, $0,33$ V i na $0,6-0,7$ V vs. SCE) i jednim katodnim reproduktivnim pikom (na $0,61$ V vs. SCE). ^[106]

FTIR analizom glavnine elektrolita posle 4 sata držanja na potencijalu $0,61$ V vs. SCE (katodni pik) uočene su značajne promene u strukturi molekula standarda klaritromicina. Promene se odnose na estarsku vezu laktona, i promene etarske i acetalne veze.

HPLC analizom glavnine elektrolita posle 4 sata pod primenjenim elektrohemijским uslovima navedenim u referenci ^[106] uočeno je značajno smanjenje koncentracije standarda klaritromicina. ^[106]

Komercijalni klaritromicin je na elektrodi od zlata definisan sa jednim reproduktivnim anodnim pikom na $+0,60$ V do $0,80$ V vs. SCE. ^[117]

FTIR analizom glavnine elektrolita posle 4 sata držanja na potencijalu $0,68$ V vs. SCE (anodni pik) zapažena je promena u strukturi molekula klaritromicina kada je u obliku komercijalnog klaritromicina. Promene se odnose na nestajanje laktonskog prstena i karbonilne grupe u položaju 9. ^[117]

2.3.8.4. *Elektrohemijsko određivanje roksitromicina*

Radovi koji opisuju određivanje roksitromicina u humanoј plazmi, urinu i serumu odnose se na metode tečne hromatografije sa elektrohemijском i spektrofotometrijskom detekcijom. ^[118-121]

Optimalni uslovi za amperometrijsku detekciju roksitromicina postignuti su ispitivanjima cikličnom voltametrijom i HPLC elektrohemijском detekcijom u uslovima

različitih temperatura i različitih binarnih, tercijarnih i kvaternernih smeša vodenih pufera pH vrednosti 7 sa metanolom, acetonitrilom i izopropanolom. [122]

Kao i ranije pomenuti makrolidni antibiotici i roksitromicin je ispitivan na raznim elektrodama, ali najčešće na elektrodi od staklastog ugljenika. [108-109,111,116]

2.3.8.5. *Elektrohemijsko određivanje midekamicina*

Postoji nekoliko metoda za elektrohemijsko određivanje midekamicina u vodeno uljanim fazama [123-125] i vodenim rastvorima kada je korišćena elektroda od žive [126] i elektroda od staklastog ugljenika [127]

Midekamicin se takodje ispituje elektrohemijski i kapilarnom elektroforezom sa elektrohemijskom detekcijom na elektrodi od staklastog ugljenika. Midekamicin se oksiduje na elektrodi u $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaOH}$ puferu čija pH vrednost je podešena 11,4. Oksidacioni pik midekamicina je na 0,78 V, a redukcionog pika nema.

Ova metoda je našla primenu za određivanje midekamicina u humanom urinu. [74]

2.3.9. **Oficinalne metode određivanja makrolidnih antibiotika**

- Eritromicin je oficinalan po Japanskoj (JP. XV 2006) [128], Evropskoj (Ph.Eur.6.2), [129] Britanskoj (BP 7.0) [130] i Američkoj farmakopeji (USP 31-NF 26) [131]
- Azitromicin je oficinalan po Evropskoj (Ph.Eur 6.2), Britanskoj (BP 7.0) i Američkoj farmakopeji (USP 31-NF 26)
- Klaritromicin je oficinalan po Evropskoj (Ph.Eur.6.2) i Američkoj farmakopeji (USP 31-NF 26)
- Roksitromicin je oficinalan po Evropskoj (Ph.Eur.6.2) farmakopeji
- Midekamicin je oficinalan po Japanskoj (JP. XV 2006) farmakopeji

2.3.9.1 Eritromicim (Ph EUR 7.0 i BP 2009)

Sadržaj farmaceutске supstance eritromicina se određuje metodom tankoslojne hromatografije

- Mobilna faza sastoji se od: 4 zapremine 2-propanola, 8 zapremina 150 g l⁻¹ rastvora amonijum acetata. pH vrednost je 9,6.
- Zapremina nanošenja 10 µl
- Detekcija sa rastvorom anisaldehyda i zagrevanje 5 min na 110 °C.

Stepen čistoće farmaceutске supstance eritromicina se određuje metodom tečne hromatografije.

1. mobilna faza je 50 ml 35 g/l rastvora kalijum dihidrogen fosfata pH vrednost je 9 podešena sa razblaženom fosfornom kiselinom, 400 ml vode, 165 ml 2-metil-2-propanola i 30 ml acetonitrila, i razblaži se vodom do 1000 ml
2. stacionarna faza je stiren-divinilbenzen kopolimer (8 µm),
3. temperatura kolone je 70 °C,
4. protok mobilne faze 2,0 ml/min,
5. detekcija 215 nm, i
6. zapremina injektiranja 100 µl

Stepen čistoće i sadržaj farmaceutске supstance eritromicina po Američkoj farmakopeki (USP 31-NF 26) određuju se metodom tečne hromatografije

- mobilna faza je mešavina rastvora A (50 ml fosfatnog pufera pH 9, 400 ml vode 165 ml tercijarnog butil alkohola, 30 ml acetonitrila i doda se vode do 1000 ml), acetonitrila i vode u odnosu (5:2:1),
- kolona: 25 cm x 4.6 mm (L21),
- temperatura kolone 65°C, i

- protok: 2,0 ml/min.

Eritromicin (JP. XV 2006)

Po japanskoj farmakopeji sadržaj farmaceutske supstance eritromicina se određuje mikrobiološki.

Nečistoće koje se kvantitativno određuju u farmaceutskoj supstanci su: eritromicin F, N-demetileritromicin A, eritromicin E, anhidroeritromicin, eritromicin A enol etar i pseudo eritromicin A enol etar.

2.3.9.2. Azitromicin

Stepen čistoće i sadržaj farmaceutske supstance azitromicina po Ph BP 7.0 i Ph EUR 6.0 određuju se metodom tečne hromatografije

Za određivanje stepena čistoće farmaceutske supstance azitromicina koriste se hromatografski uslovi:

- mobilna faza A : 1.80 g/l anhidrovanog dinatrijum-hidrogenfosfata, pH vrednost mobilne faze 8.9 je podešena sa fosfornom kiselinom ili razblaženim NaOH,
- mobilna faza B: metanol, acetonitril (250:750 V/V),
- stacionarna faza je "end-capped" octadecil silika (5 µm),
- temperatura kolone je 60 °C,
- protok mobilne faze 1,0 ml/min,
- detekcija 210 nm,
- zapremina injektiranja 50 µl.

Za određivanje sadržaja farmaceutske supstance azitromicina koristi se hromatografski uslovi:

- mobilna faza je mešavina 60 zapremina acetonitrila i 40 zapremina 6,7 g/l rastvora kalijum-hidrogenfosfata, pH vrednost mobilne faze je 11,0 podešena rastvorom kalijum-hidroksida

- protok mobilne faze je 1,0 ml/min,
- detekcija 210 nm,
- stacionarna faza je octadecil silika vinil polimer (5 µm),
- temperatura kolone je 40°C,
- zapremina injektiranja 10 µl

Stepen čistoće i sadržaj farmaceutске supstance azitromicina po Americckoj farmakopeji (USP 31-NF 26) određuju se metodom tečne hromatografije

Test 1

- mobilna faza: Napravi se mešavina 750 ml fosfatnog pufera pH 7,5 sa i 250 ml acetonitrila,
- amperometrijski elektrohemijski detektor sa dualnom elektrodom od staklastog ugljenika,
- 4,6-mm × 5-cm pretkolona 5-µm (L29), and a 4,6-mm × 15-cm kolona.

Test 2

- mobilna faza: mešavina 400 ml fosfatnog pufera pH 8,2 i 600 ml acetonitrila
- detekcija 210-nm,
- kolona oktadecil silika 4.6-mm × 15-cm , 5-µm,
- protok 0,9 ml/min,
- temperatura kolone je 30 °C,
- zapremina injektiranja je 50 ul.

Nečistoće koje se kvantitativno određuju u farmaceutskoj supstanci su:

6-dimetilazitromicin, 3-deoksiazitromicin, 3'-*O*-dimetilazitromicin, 14-dimetil-14-(hidroksi metil) azitromicin, 3'-*N*-dimetil-3'-*N*-formilazitromicin, 3'-*N*- dimetilazitromicin, 2-desetil-2-propilazitromicin, 3'- (*N,N*-didemetil)azitromicin (aminoazithromycin), 3'-*N*-demetil-3'-*N*-[(4metilfenil) sulfonil] azitromicin, 3'- *N*- [[4-(acetilamino) fenil] sulfonil]-3'- *N*-demetil azitromicin, 13-*O*-dekladinosilazitromicin, azitromicin 3'-*N*-oksid, 3'-(*N,N*-didemethyl)- 3'-*N*-formilazitromicin, 3'-de (dimetilamino)-3'-oksoazitromicin i C₁₄,1"-epoksiazitromicin.

2.3.9.3. Klaritromicin

Klaritromicin je oficinalan po Evropskoj (Ph EUR 6.0) i Američkoj farmakopeji (USP 31-NF 26). Sadržaj i stepen čistoće farmaceutske supstance klaritromicina određuju se metodom tečne hromatografije

3. gradijentno eluiranje,

- mobilna faza A je fosfatni pufer pH 4,4, mobilna faza B je acetonitril,
- protok mobilne faze je 1,1 ml/min,
- stacionarna faza je octadecil silika gel (3,5 μm),
- temperatura kolone je 40°C,
- talasna dužina detekcije je 205 nm,
- injekciona zapremina 10 μl

Nečistoće koje se kvantitativno određuju u farmaceutskoj supstanci su: 2-demetil-2-(hidroksimetil)-6-*O*-metileritromicinA, 6-*O*-metil-15-noreritromicin A, 4',6-di-*O*-metil eritromicin A, 6-*O*-metileritromicin A(*E*)-9-oksime, 6-*O*-metileritromicin A(*E*) - 9 -(*O*-metil oksim) eritromicinA(*E*)-9-oksime, 3"-*N*-dimetil-6-*O*-metileritromicin A(*E*)-9-oxime, 3"-*N*-dimetil-6-*O*-metileritromicinA, 6,11-di-*O*-metileritromicinA, 6,12-di-*O*-metil eritromicin A, 3"-*N*-demetil -3'-*N*-formil-6-*O*-metileritromicin A, 2-etil-6-hidroksi - 9-metoksi - 1,5,7,9,11, 13-heksametil - 8- [[3,4,6-trideoksi-3-(dimetilamino) - β -*D*-ksilo-hekso piranozil] oksim]-3,15-dioksa biciklo[10.2.1] pentadeka-11,13-dien-4-one (3-*O*-dekladinosil-8,9:10,11-dianhidro-6-*O*-metileritromicinA - 9,12 - hemiketal, 6-*O*-metil eritromicin A(*Z*)- 9 -oksime, 6-*O*-metil eritromicinA A (*Z*)-9-(*O*-metiloksime), 10,11-didehidro-11-deoksi-6-*O*-metil eritromicin A.

2.3.9.4. Roksitromicin

Sadržaj i stepen čistoće farmaceutske supstance roksitromicina se po Evropskoj (Ph EUR 6.0) farmakopeji određuju metodom tečne hromatografije.

- ✓ mobilna faza A je mešavina 26 zapremina acetonitrila i 74 zapremine 59,7 g l⁻¹ rastvora amonijum-dihidrogenfosfata, pH vrednost mobilne faze je podešena na 4,3 rastvorom natrijum-hidroksida,
- ✓ mobilna faza B: voda :acetonitril (30:70 V/V),
- ✓ protok 1,1 ml/min,
- ✓ detekcija 205 nm,
- ✓ zapremina injektiranja 20 µl,
- ✓ temperatura autosamplera 8 °C.

Nečistoće koje se kvantitativno određuju u farmaceutskoj supstanci su:

4- [(2,6-dideoksi- 3- C-metil - 3- O-metil] - α -L-ribo-heksopiranozil)oksi]- 14- etil- 7,12,13-trihidroksi-3,5,7,9,11,13-heksametil-6-[[3,4,6-trideoksi-3-(dimetilamino)- β -D-ksilo-heksopiranozil]oksi]oksaciklotetradekan-2,10-dion(eritromicinA),3-O-de(2,6-dideoksi-3-C-metil -3-O-metil- α -L-ribo-heksopiranozil) eritromicin 9-(E)-[O-[(2-metoksietoksi) metil] oksim], eritromicin 9-(E)-oksim,eritromicin 9-(E)-[O-[[2-metoksietoksi) metoksi] metil] oksim], eritromicin 9-(E)-[O-[(2-hloroetoksi)metil]oksim], erithromicin 9-(E)-[O-[[2-(hidroksil metoksi)etoksi]metil]oksim], eritromicin 9-(Z)-[O-[(2-metoksietoksi) metil] oksim], 3"-O-dimetileritromicin 9-(E)- [O-[(2-metoksietoksi)metil] oksim], 3'- N dimetil eritromicin 9-(E)-[O-[(2-metoksietoksi)metil]oksim], 12-deoksi eritromicin 9- (E)-[O-[(2-metoksietoksi) metil]oksim], 2'-O-[(2-metoksietoksi)metil]eritromicin 9-(E)[O-[(2-metoksietoksi)metil] oksim].

2.3.9.5. Midekamicin

Midekamicin je oficinalan po Japanskoj (JP. XV 2006.) farmakopeji i sadržaj farmaceutske supstance midekamicina određuje se mikrobiološki.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Materijali

U eksperimentalnom radu korišćeni su sledeći standardi i hemikalije:

- radni standard roksitromicina, Jugoremedija, Zrenjanin
- Runac[®] tablete 150 mg, Jugoremedija
- radni standard midekamicina, Krka, Novo Mesto
- natrijum-hidrogenkarbonat, p.a., Merck
- dihlormetan, p.a., Merck
- natrijum-dihidrogenfosfat, p.a., Merck
- fosforna kiselina p.a., Merck
- amonijum-hidroksid 25%, p.a., J.T. Baker
- dejonizovana voda, 18 MΩ, IHTM, Beograd
- metanol HPLC čistoće, Merck
- etanol HPLC čistoće, Merck
- acetonitril HPLC čistoće, Merck
- amonijum-dihidrogenfosfat p.a., Merck
- sumporna kiselina, p.a, Merck

3.1.1. Pripremanje standardnih rastvora i uzoraka roksitromicina

Opseg koncentracija roksitromicina koje se određuju elektrohemijski u praksi se koristi za ispitivanje roksitromicina u sirovini i različitim formulacijama leka.

- *Pripramanje osnovnog standardnog rastvor za analizu farmaceutске supstance roksitromicina*

Elektrohemijski se ispituje farmaceutска supstanca roksitromicin tako što se napravi štok rastvor roksitromicina u metanolu koncentracije 10 mg ml⁻¹. Određjena zapremina štok rastvora roksitromicina dodaje se u elektrolit (100 ml) da bi se dobile koncentracije u opsegu 0,11396-0,3802 mg ml⁻¹.

- *Pripremanje uzoraka komercijalnog roksitromicina*

Elektrohemijski se ispituju Runac[®] tablete proizvođača Jugoremedija, Zrenjanin koje sadrže 150 mg roksitromicina. Ekscipijensi koji ulaze u sastav placeba su hidroksipropil celuloza, magnezijum-stearat, poloksamer 188, povidon K30, silicijum(IV)-oksid, kukuruzni škrob, talk, anhidrovana glukoza, metilhidroksipropil-celuloza, propilenglikol, titanijum (IV)-oksid. Uzorak tableta se priprema sledećom procedurom:

Izmeri se masa deset Runac[®] tableta i izračuna prosečna masa jedne tablete. Tablete se sprāše i odmeri se količina tabletnе mase koja sadrži zahtevanu količinu roksitromicina da bi se dobio ispitivani opseg koncentracija (0,196-0,741 mg ml⁻¹).

Odmerena sprāšena tabletnа masa rastvori se u 10 ml etanola , tretira na ultrasoničnom kupatilu 10 min i filtrira u normalni sud od 100 ml. Ostatak se ispere sa 0,05 M NaHCO₃ i dopuni istim rastvaračem do oznake. Dobijene koncentracije roksitromicina su potvrđene HPLC metodom.

- *pripremanje osnovnog standardnog rastvora za analizu urina*

Osnovni standardni rastvor roksitromicina priprema se rastvaranjem 10 mg analitičkog standarda u 10 ml metanola. Dobijeni rastvor se čuva na -4⁰C.

Ostale ispitivane koncentracije dobijaju se razblaženjem standardnog štok rastvora roksitromicina metanolom. Kalibracioni uzorci se pripremaju dodatkom rastvora roksitromicina u blank ("drug-free") humanog urina. Napravi se kalibraciona kriva za uzorak urina koji je spajkovao sa roksitromicinom i dobije se zavisnost površina pikova roksitromicina od koncentracionog opsega 2,5–20 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

- *pripremanje uzoraka urina*

U 1 ml uzorka urina doda se 100 μl 25% amonijum-hidroksida i 5 ml dihlormetana. Uzorci se mešaju na mehaničkoj mešalici 20 min i centrifugiraju 10 min na 3000 obrtaja. Posle centrifugiranja organski sloj se odvoji i upari u struji vazduha. Suvi ekstrakt se rekonstituiše u metanolu i analizira metodom tečne hromatografije sa UV detektorom na talasnoj dužini 200,5 nm. [132,133]

3.1.2. Pripremanje standardnih rastvora i uzoraka midekamicina

Opseg koncentracija midekamicina koje se određuju elektrohemijski u praksi se koristi za ispitivanje midekamicina u sirovini i različitim formulacijama leka.

- *pripremanje štok standardnog rastvora za analizu farmaceutske supstance midekamicina*

Pripremi se osnovni standardni rastvor midekamicina u metanolu koncentracije 5 mg ml^{-1} . Odredjena zapremina štok rastvora midekamicina dodaje se u elektrolit (100 ml) da bi se dobile koncentracije u opsegu 0,11396–0,3802 mg ml^{-1} .

3.2. Aparati i uređaji

- 3.2.1. Potenciostat RDE 4, PINE, XY pisač PM 8134, PHILIPS, korišćen za cikličnu voltametriju
- 3.2.2. Gamry potentiostat Reference 600 , softver PV 220, korišćen za diferencijalnu pulsnu voltametriju
- 3.2.3. HPLC/UV- Waters Alliance 2695 (photo diode array (PDA), Waters 2696), softver Empower Login
- 3.2.4. HPLC/UV-Agilent series 1100 (pump, UV VIS detektor, degaser, auto sampler), softver Chem station
- 3.2.5. HPLC/MS: HPLC instrument (Agilent 1200 Serija, Agilent Technologies) degaser, autosempler, diode-array detektor (DAD) kuplovan sa 6210 Time-of-Flight LC/MS sistemom (Agilent Technologies), softver MassHunter Workstation
- 3.2.6. Centrifuga Rotofix 32, Nemačka
- 3.2.7. pH metar, PHM93 reference pH metar, Radiometar, Kopenhagen, Danska
- 3.2.8. Magnetna mešalica, Heindolph MR 3001
- 3.2.9. Ultrasonično kupatilo UZ-4P, Iskra Kranj, Slovenija

3.3. Metode

3.3.1. Ciklična voltametrija

Standardna oprema koja se koristi za cikličnu voltametriju je elektrohemijska ćelija i sastoji se od staklene posude i tri elektrode. U našim eksperimentima korišćena je komercijalna TacuCell staklena ćelija. Polikristalna elektroda od zlata koristi se kao radna elektroda (Pine, $0,5 \text{ cm}^2$), žica od zlata kao pomoćna elektroda i zasićena kalomelova elektroda (SCE-saturated calomel electrode) kao referentna elektroda. Svi potencijali su dati prema zasićenoj kalomelovoj elektrodi (vs. SCE). Pre dodavanja ispitivanih antibiotika rastvor elektrolita se degazira provođenjem azota. Svi eksperimenti se izvode na sobnoj temperaturi.

Priprema elektrode

Pre početka rada polikristalna elektroda od zlata (površine $0,500 \text{ cm}^2$) se polira aluminijumskim pastom, posle se čisti se mešavinom $18\text{M}\Omega$ vode i sumporne kiseline u ultrasoničnom kupatilu i na kraju ispira $18\text{M}\Omega$ vodom.

3.3.2. Diferencijalna pulsna voltametrija

Za metodu diferencijalne pulsne voltametrije (DPV) koristi se elektrohemijska ćelija koja se sastoji staklene posude i tri elektrode kao što je navedeno kod metode ciklične voltametrije.

3.3.3. HPLC/UV

Hromatografski uslovi pod kojim je ispitivan *roksitromicin* u uzorcima urina razlicitih koncentracija:

- gradijentno eluiranje (sastav mobilne faze se menja u toku vremena)
- kolona: Symmetry C8 5 μ m (4.6 mm x 250 mm, Waters), pretkolona: Symmetry C18,
- mobilna faza A : NaH₂PO₄xH₂O rastvori se u 1000 ml vode i pH vrednost podese na 3,6 20% fosfornom kiselinom,
- mobilna faza B : acetonitril,
- temperatura kolone : 30 °C,
- talasna dužina je 200,5 nm,
- zapremina injektiranja 50 μ l.

Hromatografski uslovi pod kojim je ispitivan elektrolit tokom praćenja elektrohemijske aktivnosti *midekamicina*:

- kolona : Zorbax SB C-18, 150 x 4.6 mm, stacionarna faza: octadecylsilane, veličina čestice: 5 μ m,
- mobilna faze: mešavina 307 : 693 v/v acetonitrila i rastvora amonijumdihidrogen - fosfata, pH vrednost mobilne faze je podešena na 5,3,
- protok mobilne faze 1,5 ml min⁻¹,
- detekcija 205 nm,
- zapremina injektiranja 20 μ l.

3.3.5. LC/MS

Uslovi LC/MS ispitivanja glavnine elektrolita tokom praćenja elektrohemijske aktivnosti *midekamicina*:

- izokratsko eluiranje (sastav mobilne faze se ne menja u toku vremena),
- zorbax Extend C18 column (250 mm × 4,6 mm; 5 μm),
- mobilna faza A se sastoji od mešavine rastvarača (10 mM amonijum formijat u 18.2 MΩ cm voda) mobilna faza B (acetonitril) (45 : 55, v/v),
- protok je 1.0 mL/min,
- diode-array detektor - mogućnost snimanja talasnih dužina u oblasti 190 – 450 nm,
- injekciona zapremina je 1 μl,
- temperatura kolone je 40°C,
- kao jonizaciona tehnika korišćena je elektrosprej jonizacija i posmatrani su pozitivni joni. Optimalni radni parametri su: temperatura gasa, 350 °C; protok gasa za sušenje, 10 L/min; pritisak raspršivača 3,102641 bara (45 psig), napon fragmentora 140 V, napon kapilare 4000 V, posmatrani opseg masa 100–1500 *m/z*.

4. REZULTATI RADA I DISKUSIJA

4.1. Elektrohemijsko ponašanje roksitromicina

Praćenje elektrohemijskog ponašanja roksitromicina izvršeno je prvo pomoću ciklične voltametrije (CV), a zatim i diferencijalne pulsne voltametrije (DPV). Koncentracija roksitromicina u elektrolitu je simultano praćena uz korišćenje HPLC metode.

4.1.2. Proučavanje elektrohemijske aktivnosti roksitromicina pomoću ciklične voltametrije

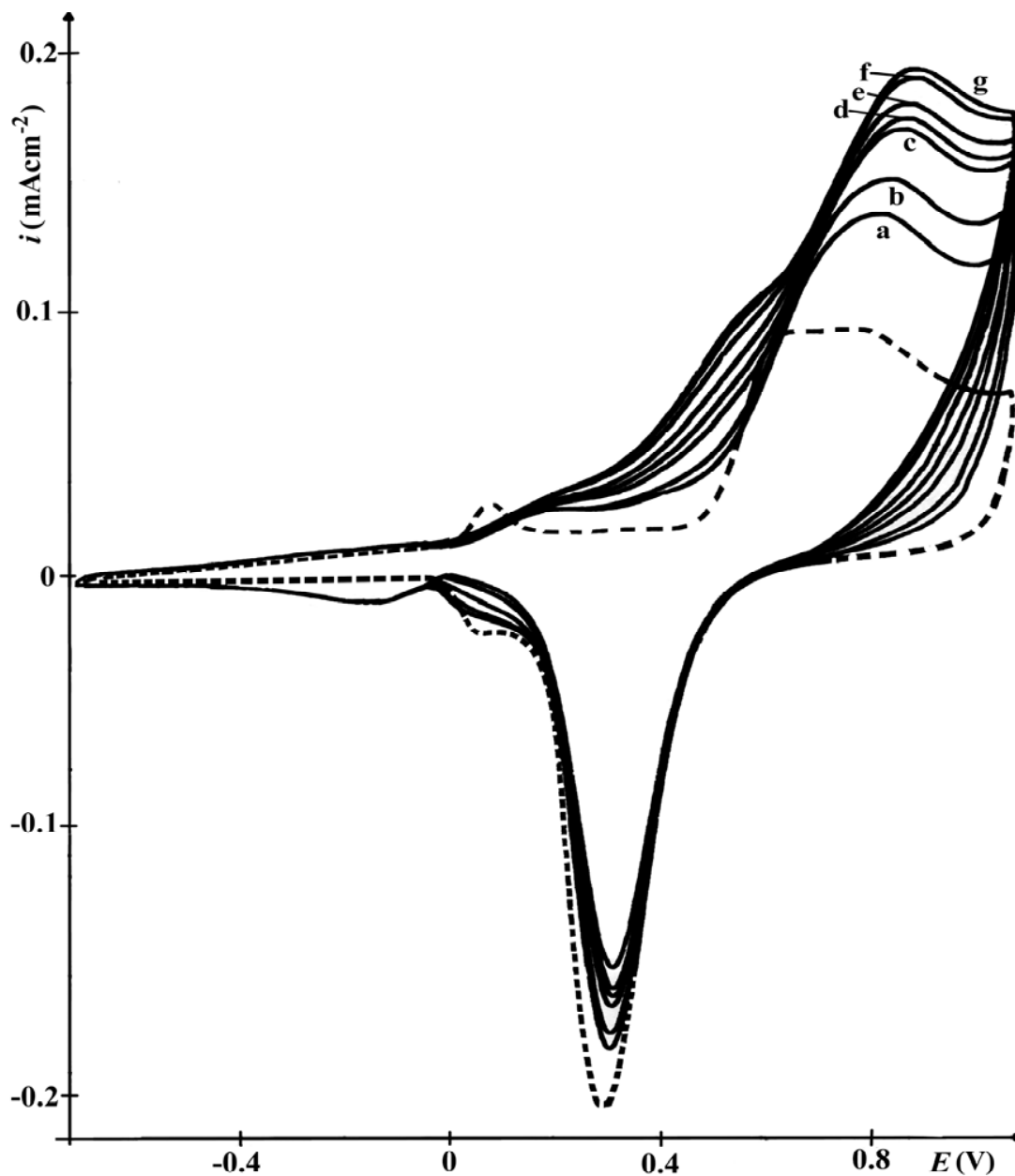
Kod metode ciklične voltametrije kao što je navedeno u eksperimentalnom delu kao radna elektroda korišćena je elektroda od zlata, a kao elektrolit 0,05 M NaHCO₃. Vrednost pH elektrolita je 8,4. Pre početka eksperimenta elektrolit je degasiran provodjenjem azota, a površina elektrode je karakterisana cikličnom voltametrijom. Ciklični voltamogram čiste elektrode je prikazan isprekidanom linijom (sl. 24). Ispitivane koncentracije roksitromicina su dodavane jedna po jedna u elektrolit i dobijeni voltamogrami prikazani su punom linijom (sl. 24). Za svaku ispitivanu koncentraciju sniman je samo prvi sweep.

Nakon dodatka roksitromicina, u oblasti potencijala od -0,6 V do +1 V (vs. SCE) na cikličnom voltamogramu zapažene su dve reakcije oksidacije sa strujnim maksimumom na 0,5 V i 0,8 V vs. SCE za sve ispitane i prikazane koncentracije.

U poredjenju sa čistom elektrodom strujni pik reakcije redukcije koji potiče od oksida zlata, se smanjuje kako se povećava koncentracija antibiotika, ali ne postoji linearna zavisnost od koncentracije roksitromicina.

Vrednost oksidativnog pika standarda roksitromicina na potencijalu 0,81 V (vs. SCE) u 0,05 M NaHCO₃, pri promeni brzine potencijala 50 mV s⁻¹ je linearna funkcija koncentracija u opsegu 0,10006–0,654 mg ml⁻¹ (slika 25). Linearnost oksidativnog pika na potencijalu 0,81V (vs.SCE) u 0,05 M NaHCO₃ pri promeni brzine potencijala 50 mV s⁻¹ prikazana je na slici 25. izračunata na osnovu cikličnih voltamograma pojedinačnih koncentracija prikazanih na slici 24.

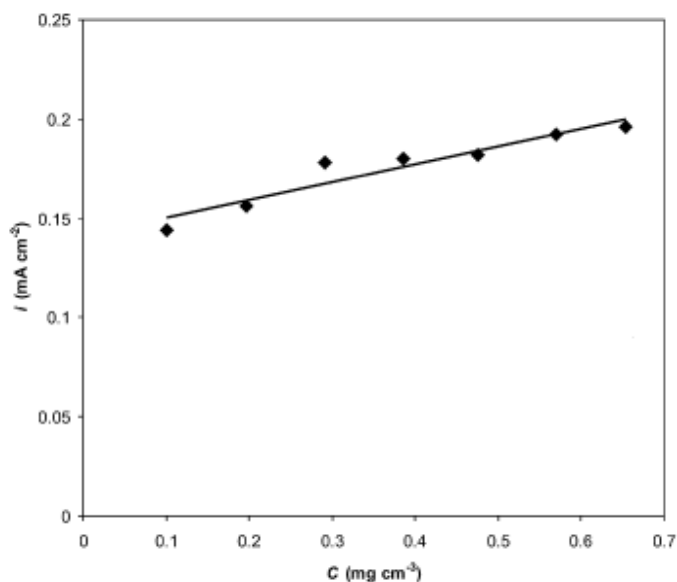
Izmedju dve analizirane ispitivane koncentracije elektroda nije ponovo čišćena.



Slika 24. Ciklični voltamogram elektrode od zlata u 0,05 M NaHCO₃ (- - -) i posle dodatka roksitromicina (koncentracije 0,10006– 0,654 mg ml⁻¹ (puna linija), početna koncentracija

je 0,10006, zatim 0,196, 0,291, 0,385, 0,476, 0,566 i 0,654 mg ml⁻¹), brzina promene potencijala: 50 mV s⁻¹. Sniman je prvi sweep.

Sve ispitivane koncentracije prikazane na slici 26, snimljene su na elektrodi od zlata, koja je očišćena i pripremljena prema proceduri opisanoj u eksperimentalnom delu samo pre početka eksperimenta i snimanja cikličnog voltamograma prikazanog isprekidanom linijom.



Slika 25. Zavisnost strujnog pika reakcije oksidacije roksitromicina na 0,81 V (◆) vs. SCE od ispitivanih koncentracija u opsegu 0,10006 – 0,654 mg ml⁻¹, pri promeni brzine potencijala 50 mV s⁻¹

Linearna zavisnost struja od ispitivanih koncentracija roksitromicina prikazana je jednačinom: ^[134,135]

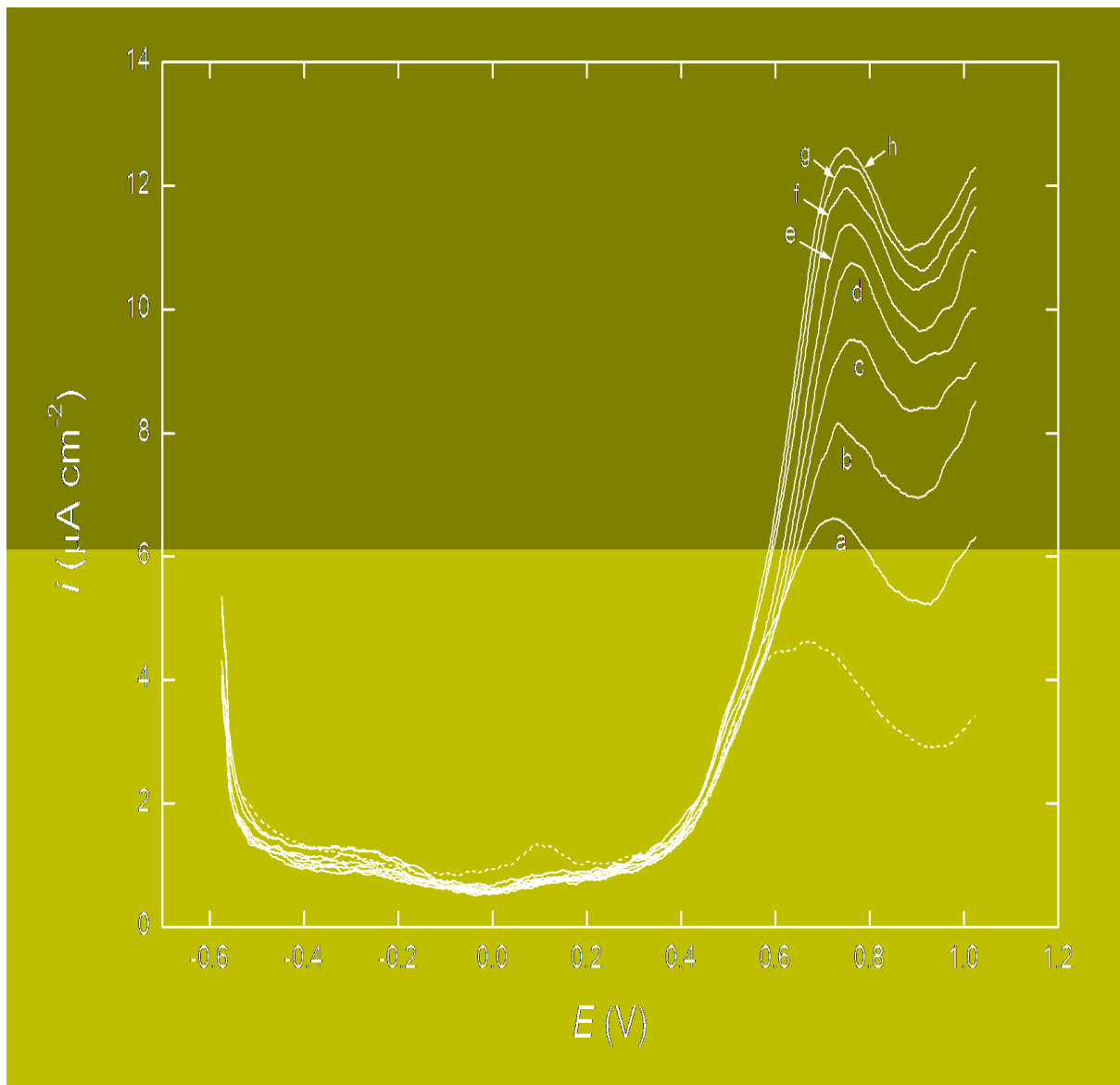
$$i_{pa} (\text{mAcm}^{-2}) = 0,148 (\pm 0,0066) + 0,076 (\pm 0,014) C (\text{mg ml}^{-1}), \quad r = 0,9939 \quad (8)$$

gde je i_p struja pika, C koncentracija, a r koeficijent korelacije.

Ovakve jednačine su ranije primenjivane za kvantitativno određivanje malih koncentracija azitromicina i metomila na elektrodi od zlata [105,136] i azitromicina na elektrodi od staklastog ugljenika. [108,109,111,116]

4.1.3. Proučavanje elektrohemijske aktivnosti roksitromicina pomoću DPV

Diferencijalna pulsna voltametrija je upotrebljena da bi potvrdila rezultate dobijene cikličnom voltametrijom. Diferencijalni pulsni voltamogrami su snimani na elektrodi od zlata u 0,05 M NaHCO₃ kao elektrolitu u koji su kao kod ciklične voltametrije dodate različite koncentracije roksitromicina. Potencijal je menjan u opsegu od -0,6 V do 1,0 V, brzina promene potencijala je 2 mVs⁻¹, amplituda pulsa je 25 mV i vreme pulsa je 0,1 s. Kod svih voltamograma zapaža se jedan anodni pik koji se nalazi na potencijalu oko 0,75 V, sl. 26.



Slika 26. Diferencijalni pulsni voltamogram u anodnom pravcu elektrode od zlata u 0,05 M NaHCO₃ (- - -) i posle dodatka različitih koncentracija roksitromicina (puna linija):

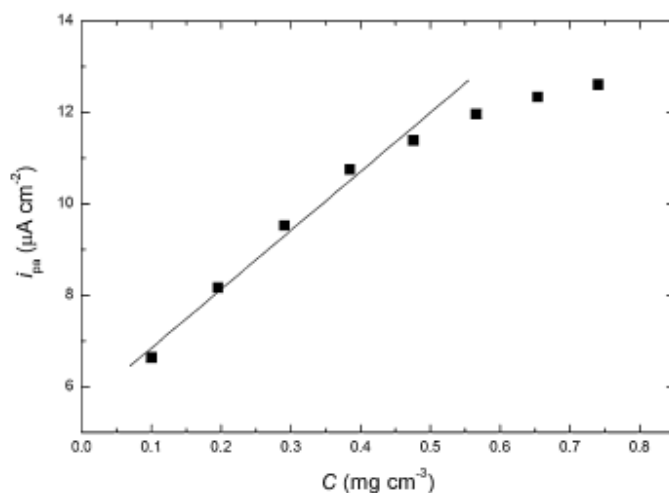
(a) 0,1006; (b) 0,196; (c) 0,291; (d) 0,385; (e) 0,476; (f) 0,566; (g) 0,654 i (h) 0,741 mg ml⁻¹. Početni potencijal -0,6 V, krajnji potencijal 1,0 V, brzina skeniranja 2 mVs⁻¹, amplituda pulsa 25 mV, vreme pulsa 0,1 s.

Strujni maksimum (anodni pik) ispoljava linearnu zavisnost struja od ispitivanih koncentracija roksitromicina u opsegu od 0.1006 do 0.476 mg ml⁻¹, prikazan je na slici 27. Navedena linearnost strujnog pika u zavisnosti od koncentracije prikazana je jednačinom:

$$i_{pa} (\mu A cm^{-2}) = 5,556 + 12,880 C (\text{mg ml}^{-1}), r = 0,9915 \quad (9)$$

Odstupanje pika gustine struje na višim koncentracijama može se objasniti trošenjem prisutnog roksitromicina u elektrolitu u toku eksperimenta. Uzimajući u obzir da DPV merenja traju 13,3 min (korišćeno je osam različitih koncentracija) pretpostavlja se da je stvarna koncentracija niža od izračunate jer količina roksitromicina koja se oksiduje u toku DPV merenja nije zanemarljiva.

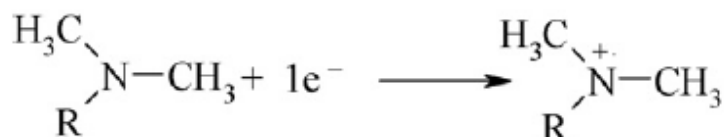
Može se zaključiti da bi linearnost bila odgovarajuća i za veće koncentracije antibiotika ako bi se povećala brzina skeniranja.



Slika 27. Zavisnost strujnog pika reakcije oksidacije roksitromicina na 0,81 V (■) vs.SCE od koncentracija u opsegu 0,10006 – 0,476 mg ml⁻¹

Kao što je u literaturnom pregledu navedeno elektrohemijaska aktivnost nekih makrolidnih antibiotika koji sadrže tercijarnu amino grupu uspešno se prati na elektrodi od staklastog ugljenika. [118,122]

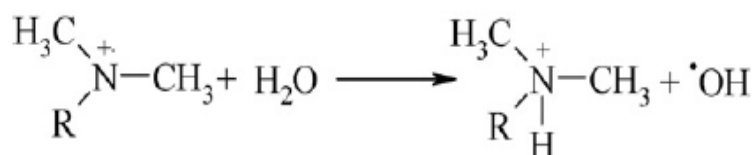
Iz dobijenih rezultata zapaža se da eritromicin A podleže oksidativnoj degradaciji. Pretpostavlja se da je prvi stepen u procesu oksidacije odlazak elektrona sa jednog od atoma azota pri čemu nastaje amonijum katjon radikal. [116]



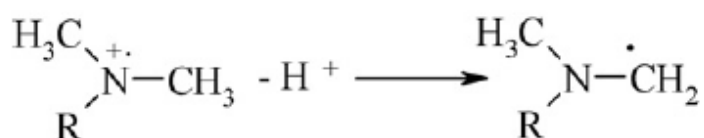
Gde je R šećerna komponenta.

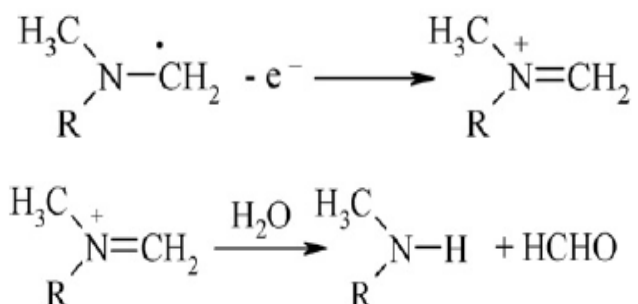
Formirani amonijum katjon radikal je veoma reaktivna grupa i brzo reaguje sa okolinom formirajući stabilan produkt. Formirani amonijum katjon radikal može odvojiti atom vodonika iz vode što dovodi do formiranja soli (reakcija 2) u dodatnom jednoelektronskom procesu.

Odatle formiranje katjona inhibira dalju elektrohemijsku oksidaciju. [116]



Pored reakcije 2 pretpostavlja se da amin grupa podleže reakciji demetilovanja što dovodi do formiranja sekundarnog amina. Ta reakcija se odvija kroz dodatni transfer dva elektrona (ECE mehanizam) (reakcije 3-5). [116] Stepeni koji određuju brzinu reakcije u toku mehanizma su uklanjanje α - protona i formiranje enamina kao intermedijera (reakcije 3 i 4). [137]





Praćenjem određivanja roksitromicina hidrodinamičnom voltametrijom na elektrodi od staklastog ugljenika dobijeni voltamogrami pokazuju da je oblast potencijala koja je potrebna za maksimalnu osetljivost od 0,85 V do 1,1 V. [118,132]

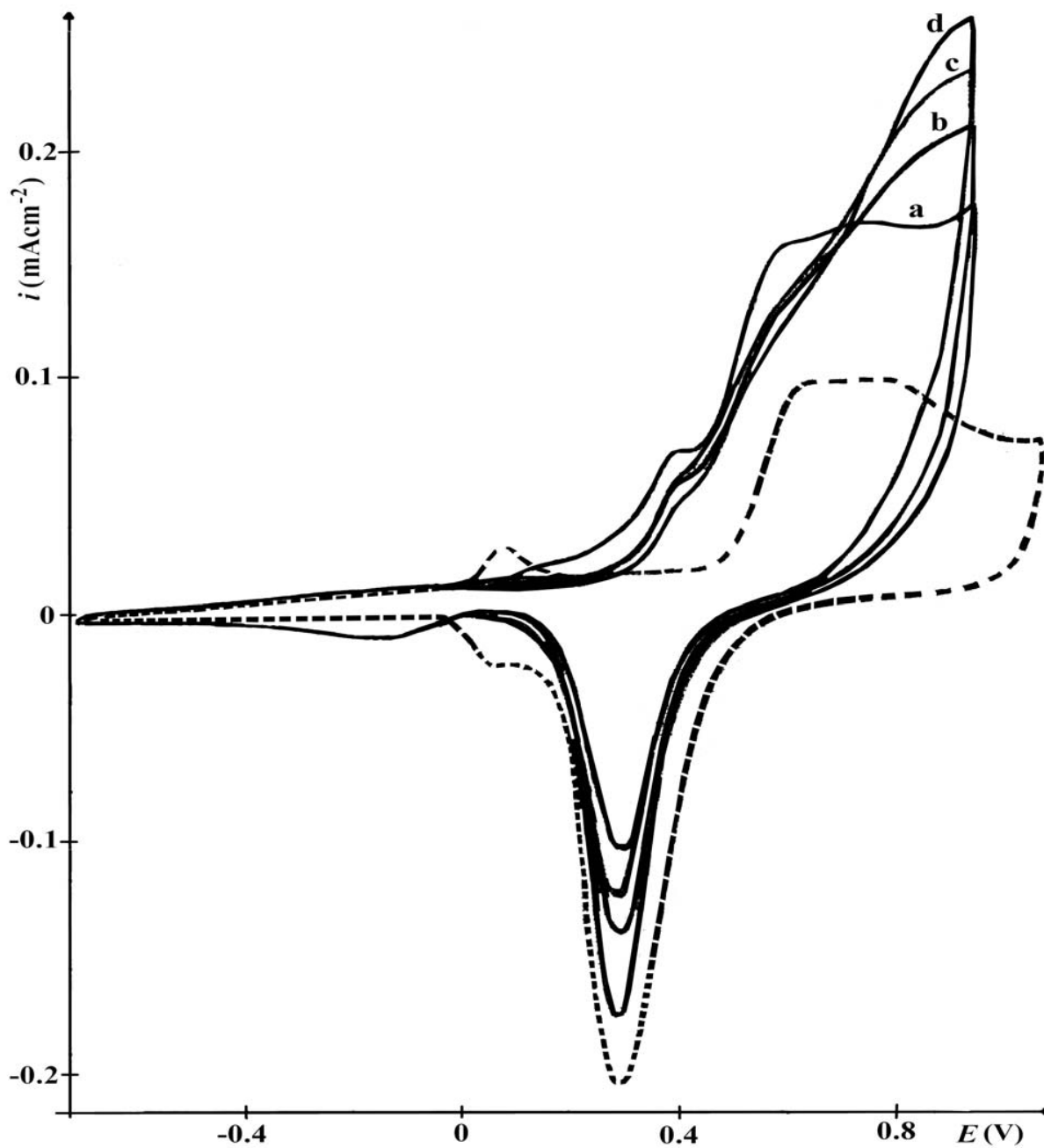
Za praćenje elektrohemijske aktivnosti cikličnom voltametrijom na elektrodi od zlata radni potencijal od 0,81 V je dovoljan za maksimalnu osetljivost (sl. 24), a za diferencijalnu pulsnu voltametriju 0,75 V (sl. 26)

Mehanizam oksidacije roksitromicina je svakako predmet budućih istraživanja. Na osnovu literaturnih podataka od funkcionalnih grupa roksitromicina amino grupa najlakše podleže oksidaciji.

Dialkilamini se oksiduju formirajući radikal katjon gubitkom elektrona. Slično voltametrijsko ponašanje je primećeno kod eritromicina koje ukazuje da je predloženi mehanizam oksidacije roksitromicina započinje transferom jednog elektrona sa azota i stvaranjem katjon radikala. [104]

4.1.4. Proučavanje elektrohemijske aktivnosti roksitromicina kod komercijalnih tableta

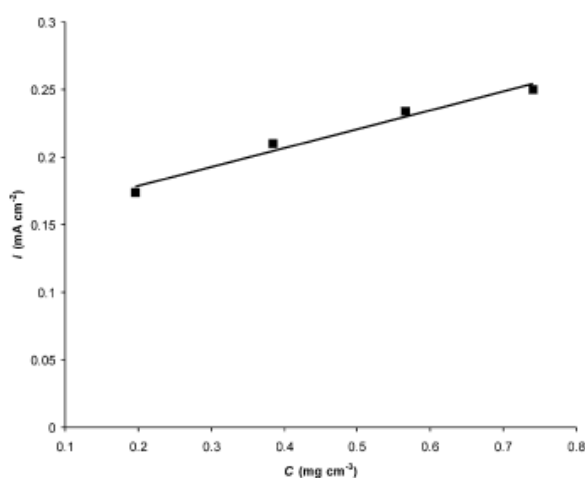
Uzimajući u obzir činjenicu da je stvarna koncentracija roksitromicina niža u odnosu na izračunatu zbog oksidacije roksitromicina u toku trajanja eksperimenta kod diferencijalne pulsne voltametrije, kvantitativno određivanje antibiotika za veće vrednosti koncentracija u komercijalnom uzorku i spajkovanom uzorku urina praćeno je cikličnom voltametrijom.



Slika 28. Ciklični voltamogram elektrode od zlata u 0,05 M NaHCO_3 (- - -) i posle dodatka Runac[®] tableta (puna linija) u opsegu koncentracija od 0,196 do 0,741 mg ml^{-1} :

(a) početna koncentracija 0,196; zatim (b) 0,385; (c) 0,566; (d) 0,741 mg ml^{-1} , brzina promene potencijala 50 mVs^{-1} . Sniman je prvi sweep

Na slici 28 prikazan je ciklični voltamogram roksitromicina kao sadržaj čvrstog doziranog oblika (Runac[®] 150 mg tableta) u 0,05 M NaHCO₃. Pod istim primenjenim eksperimentalnim uslovima (kao za standard roksitromicina koji je prikazan na slici 25) prisustvo ekscipijenasa u tabletama Runac[®] 150 mg uzrokuje pojavljivanje oksidativnog pika na 0,85 V umesto 0,81 V.



Slika 29. Zavisnost strujnog pika reakcije oksidacije roksitromicina u Runac[®] tabletama na 0,85 V (■) od koncentracija u opsegu od 0,196 do 0,741 mg ml⁻¹

Takodje, ciklični voltamogram komercijalnog roksitromicina (slika 28) se razlikuje od voltamograma standarda roksitromicina (slika 24) u oblasti potencijala od 0,3-0,4 V. Na voltamogramu komercijalnog roksitromicina zapaženo je "rame".

Maksimum visine pika "ramena" je pet puta manji od visine pika roksitromicina. Visina pika koja se odnosi na "rame" ima najveću vrednost za najniže koncentracije roksitromicina u Runac[®] tabletama (0,196 mg ml⁻¹). Nakon toga naglo se smanjuje sa povećanjem koncentracije roksitromicina i za veće koncentracije može se zanemariti.

Dok je aktivnost roksitromicina zapažena na 0,8 V, poreklo pika koji je primećen na 0,3-0,4 V može se pripisati prisustvu ekscipijenasa u Runac[®] tabletama. Hidroksipropil celuloza, magnezijum-stearat, poloksamer 188, povidon K30, silicijum(IV)-oksid,

kukuruzni skrob, talk, metilhidroksipropil celuloza, propilenglikol, titanijum(IV)-oksid su elektrohemijski neaktivni pod primenjenim eksperimentalnim uslovima.

Pojava "ramena" se sa velikom verovatnoćom pripisuje elektro oksidaciji glukoze koja je inhibirana nakon povećanja koncentracije i ostalih ekscipijenasa, prisutnih u Runac tabletama. [138,139]

Ovu pretpostavku potvrđuje i činjenica da je kod elektrohemijskog određivanja komercijalnog azitromicina pod istim eksperimentalnim uslovima zapažen pik na 0,4 V vs. SCE koji potiče od laktoze monohidrata (ekscipijens koji ulazi u sastav Hemomycin kapsula). [105]

Elektrohemijska oksidacija roksitromicina u Runac[®] tabletama je predstavljena jednim anodnim pikom. Vrednost oksidativnog pika roksitromicina na 0,85 V vs. SCE u 0,05 M NaHCO₃, pri promeni brzine potencijala 50 mVs⁻¹ je linearna funkcija koncentracija u opsegu od 0,196 do 0,741 mg ml⁻¹. Linearnost oksidativnog pika na 0,85 V vs.SCE u 0,05 M NaHCO₃ pri promeni brzine potencijala 50 mVs⁻¹ je predstavljena sledećom jednačinom :

$$i_{pa} \text{ (mAcm}^{-2}\text{)} = 0,151 (\pm 0,008) + 0,139 (\pm 0,016) C \text{ (mg ml}^{-1}\text{)}, r = 0,9873 \quad (10)$$

HPLC analiza glavnine elektrolita u toku elektrohemijske reakcije je potvrdila dobijene rezultate. Na osnovu analiziranja površina pikova roksitromicina u zavisnosti od ispitivanih koncentracija dobijena je jednačina:

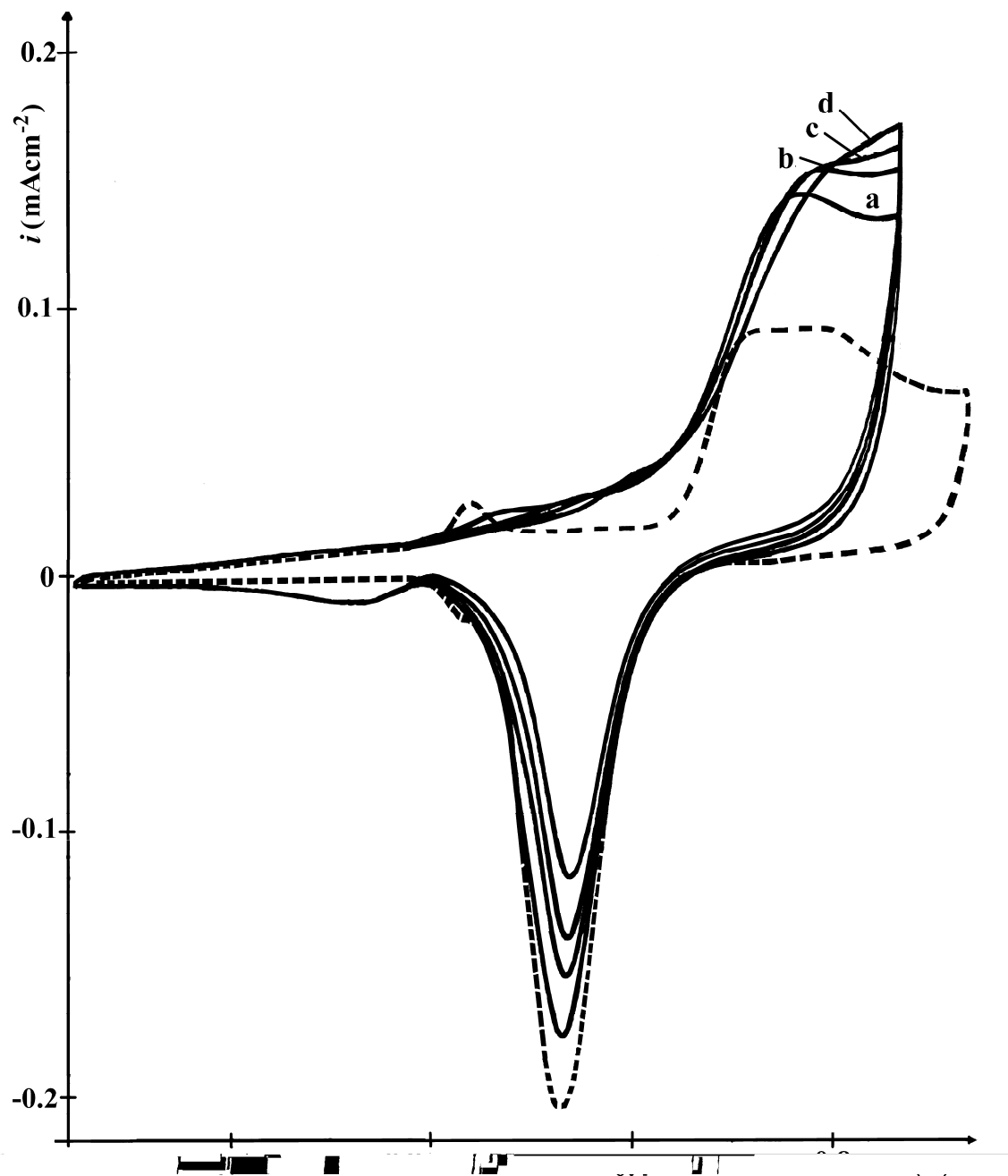
$$\text{Površina} = 5881,067 (\pm 99,890) C \text{ (mg ml}^{-1}\text{)}, r = 0,9993 \quad (11)$$

HPLC analiza Runac[®] tableta potvrdila je rezultate dobijene analiziranjem vrednosti struje pika u odnosu na ispitivane koncentracije. Ispitivane koncentracije su u korelaciji sa površinama pikova koji potiču od roksitromicina.

4.1.4. Proučavanje elektrohemijske aktivnosti roksitromicina u uzorcima urina

Roksitromicin je određen u uzorcima u kojima je urin spajkovan sa različitim koncentracijama standarda antibiotika koje odgovaraju farmakokinetičkim koncentracijama od 2,5 do 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Određivanje ovako niskih farmakokinetičkih koncentracija ranije je radjeno osetljivom hemiluminiscentnom metodom. ^[140]

Na slici 30. prikazani su ciklični voltamogrami elektrode od zlata u 0,05 M NaHCO_3 posle dodatka uzoraka urina koji je spajkovan sa standardom roksitromicina (u opsegu koncentracija od 2,5 do 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Na cikličnom voltamogramu elektrohemijske oksidacije roksitromicina zapažen je anodni pik između 0,60 V i 0,90 V (sa maksimumom struje na 0,85 V).



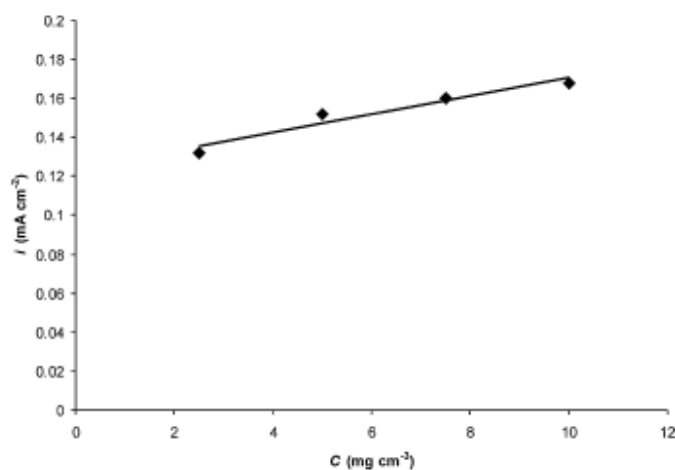
Slika 30. Ciklični voltamogram elektrode od zlata u 0,05 M NaHCO_3 (- - -) i posle dodatka urina koji je spajkovao sa roksitromicinom u opsegu koncentracija od 2,5 do 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (puna linija, označena od a do d), brzina skeniranja 50 mVs^{-1} . Sniman je samo prvi sweep.

Anodni pik je u direktnoj korelaciji sa povećanjem koncentracije antibiotika. Vrednost oksidativnog pika roksitromicina koji je spajkovan sa urinom (0,85V pri promeni brzine potencijala 50 ms^{-1}) je linearna funkcija koncentracija u opsegu od 2,5 do $10 \mu\text{g ml}^{-1}$. Linearna zavisnost prikazana je sledećom jednačinom (slika 31):

$$(12) \quad i_{pa}(\text{mAcm}^{-2}) = 0,124 (\pm 0,006) + 0,0046 (\pm 0,001) C (\text{mg ml}^{-1}), \quad r = 0,9694$$

Linearnost zavisnosti površine pikova od koncentracije (uzorci urina spajkovani sa roksitromicinom) u opsegu koncentracija od 2,5 - $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ dobijena je i HPLC metodom u toku elektrohemijske reakcije i predstavljena je jednačinom :

$$(13) \quad \text{Površina} = 17777,84 (\pm 659,22) C (\text{mg ml}^{-1}), \quad r = 0,9986$$



Slika 31. Zavisnost strujnog pika reakcije oksidacije uzorka urina koji je spajkovan sa roksitromicinom u opsegu koncentracija od 2,5 do $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ na 0,85 V (♦) vs.SCE u 0,05 M NaHCO_3 , brzina skeniranja 50 mVs^{-1}

4.1.6. Preciznost kvantitativnog određivanja roksitromicina

Polikristalna elektroda od zlata je izabrana kao optimalna radna elektroda za ispitivanje farmaceutskih jedinjenja zato što je potpuno definisana i daje apsolutno reproduktivne ciklične voltamograme. [104-106,117,141,142]

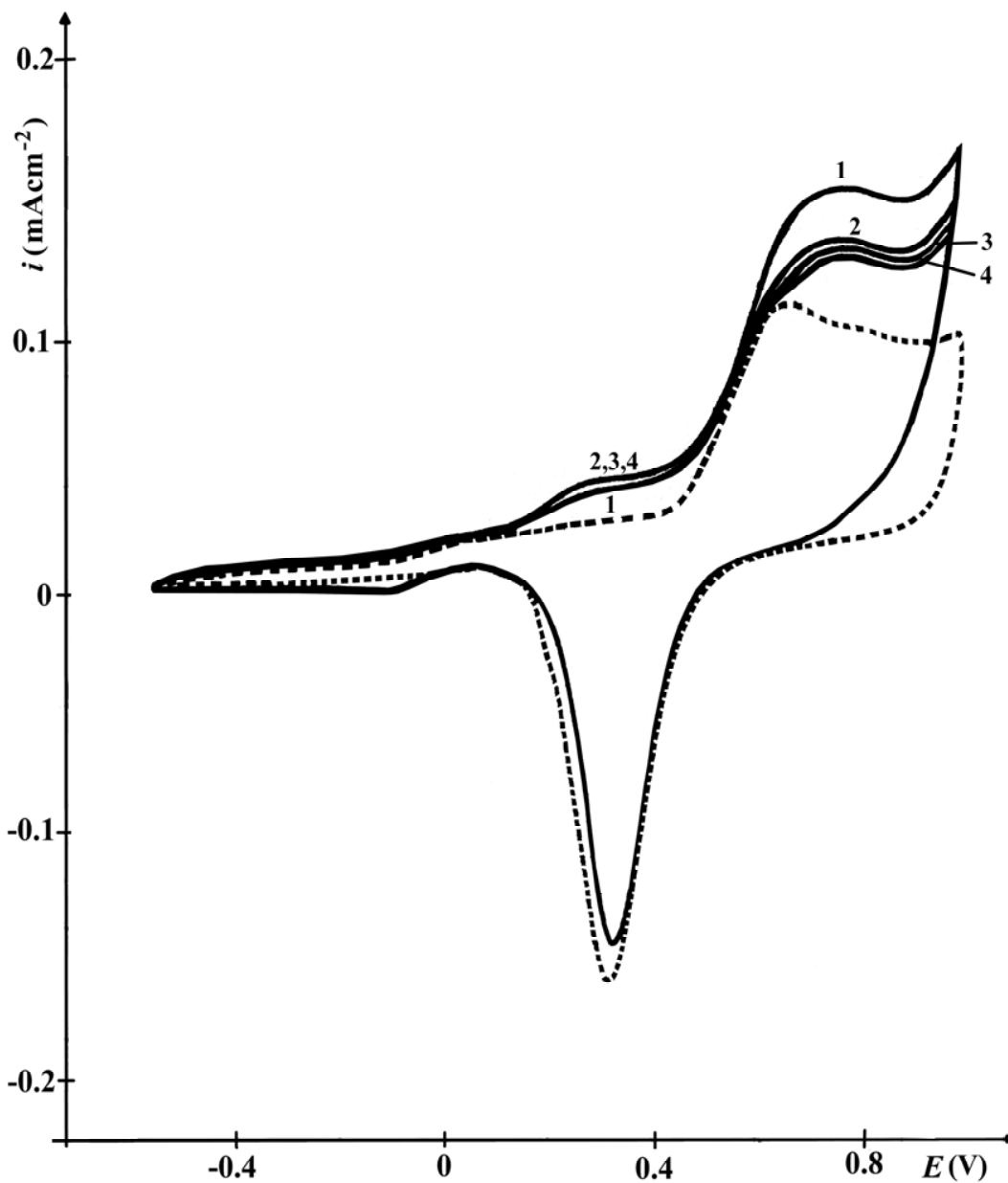
Preciznost kvantitativnog određivanja roksitromicina u čvrsto doziranim oblicima testirana je analiziranjem cikličnih voltamograma iz šest nezavisnih eksperimenata. Standardna devijacija i greška merenja su $6,08 \times 10^{-3}$ i $2,72 \times 10^{-4}$ mAcm⁻².

4.2. Elektrohemijsko ponašanje midekamicina

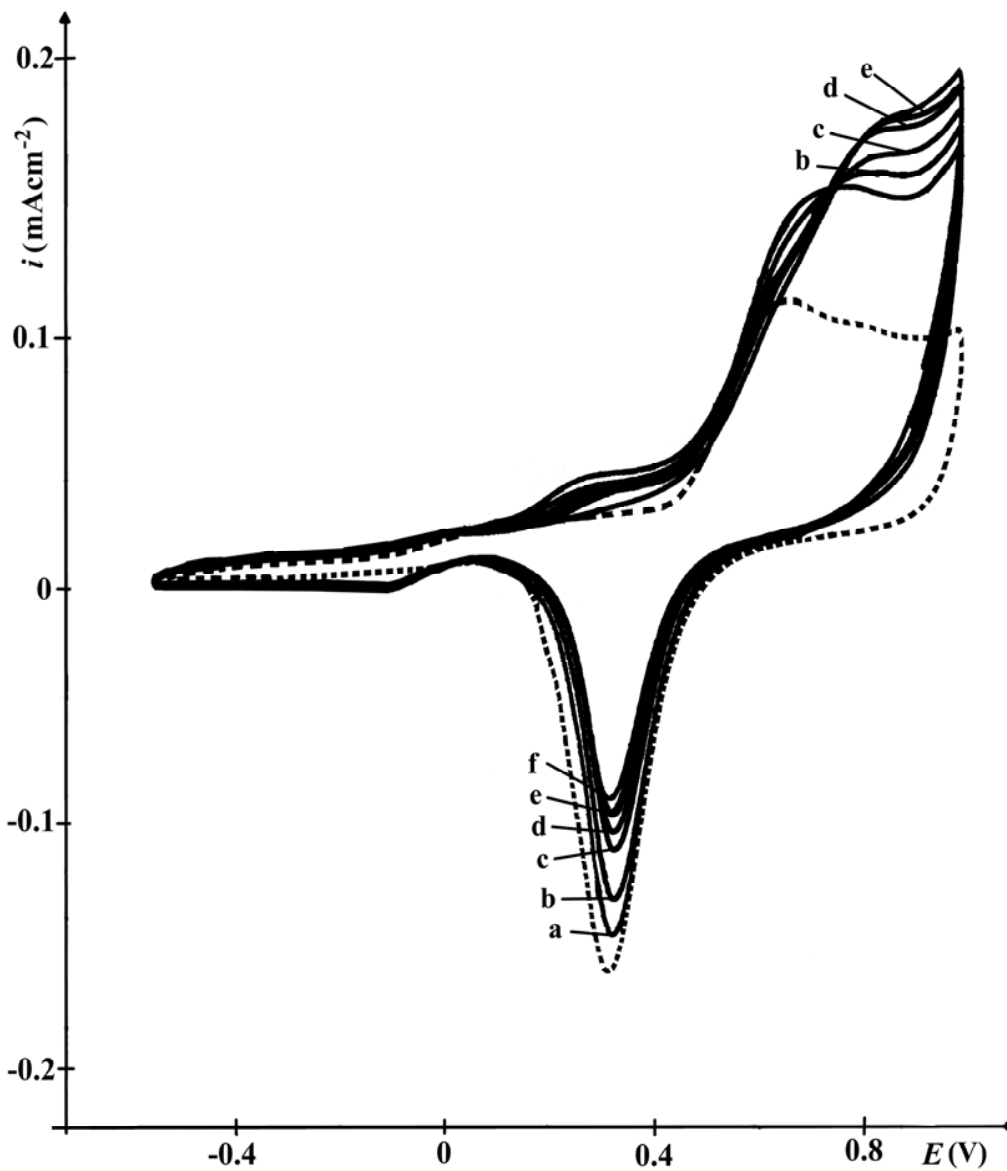
Ispitivanje elektrohemijskog ponašanja midekamicina izvršeno je pomoću ciklične voltametrije (CV) i simultano je praćeno HPLC i HPLC/MS metodama.

Kao što je navedeno kod elektrohemijskog proučavanja roksitromicina kao radna elektroda korišćena je se elektroda od zlata, a kao elektrolit 0,05 M NaHCO₃. Pre početka eksperimenta elektrolit je degasiran provodjenjem azota i površina elektrode je karakterisana cikličnom voltametrijom.

Na cikličnom voltamogramu koji je prikazan na slici 32 zapaža se da je počev od potencijala -0,6 V očigledna elektrohemijska aktivnost midekamicina. Aktivnost je izražena u prvom sweep-u za koncentraciju midekamicina 0,11396 mg ml⁻¹, a kasnije i za svaku ispitivanu koncentraciju (slika 33).



Slika 32. Ciklični voltamogram elektrode od zlata u 0,05 M NaHCO_3 (- - -) i posle dodatka midekamicina koncentracije $0,11396 \text{ mg ml}^{-1}$ (puna linija), snimljena četiri sweep-a označena po redosledu brojevima od 1 do 4, brzina promene potencijala: 50 mV s^{-1}



Slika 33. Ciklični voltamogram elektrode od zlata u 0,05 M NaHCO₃ (- - -) i posle dodatka midekamicina (puna linija) u opsegu koncentracija od 0,11396 do 0,3802 mg ml⁻¹: (a) početna koncentracija 0,11396; zatim (b) 0,1693 ; (c) 0,2235; (d) 0,2768; (e) 0,3289; (f) 0,3802 mg ml⁻¹, brzina promene potencijala: 50 mV s⁻¹

Midekamicin podleže dvema oksidativnim reakcijama između 0,1 V i 0,4 V i između 0,6 V i 1,0 V sa strujnim maksimumom (na 0,25 V i na 0,85 V) i jednoj redukcionoj reakciji na 0,30 V u povratnom sweep-u.

Na slici 32 zapaža se da je vrh i površina pika reduktivne reakcije niža u odnosu na čistu elektrodu u prisustvu midekamicina. Ova reakcija je u direktnoj korelaciji sa povećanjem koncentracije antibiotika. Sa povećanjem koncentracije midekamicina vrh pika i njegova površina se smanjuju (sl. 32 i 33).

Eventualna adsorpcija kiseonika je isključena jer je pre snimanja cikličnih voltamograma elektrolit degasiran strujom azota.

Na slici 30 takodje se zapaža da oksidacioni pik midekamicina ($0,11396 \text{ mg ml}^{-1}$) u celom području formiranja oksida (druga reakcija oksidacije) opada od prvog prema četvrtom sweep-u i stabilizuje se na konstantnu vrednost počev od četvrtog sweep-a. Najveći pad je zapažen u drugom sweep-u. Ovo smanjenje u drugom sweepu je izraženije sa sledećom koncentracijom ($0,2235 \text{ mg ml}^{-1}$) i postaje najviše izraženo kad se dostigne najviša koncentracija ($0,3802 \text{ mg ml}^{-1}$).

Oksidativni pikovi struje midekamicina pokazuju najveće vrednosti u prvom sweepu za sve ispitivane koncentracije. Ove struje se ne menjaju tokom eksperimenta i ne zavise od pripreme elektrode pre eksperimenta.

Za kvantitativno odredjivanje midekamicina u opsegu koncentracija od $0,11396$ do $0,3802 \text{ mg ml}^{-1}$ beležen je samo prvo sweep (sl. 33).

Prvo je dodata koncentracija $0,11396 \text{ mg ml}^{-1}$, veće koncentracije su dodavane u kontinuitetu tokom trajanja eksperimenta i za sve ispitivane koncentracije sniman je samo prvi sweep (sl. 33).

Vrednost maksimuma oksidativnog pika na $0,85 \text{ V}$ i pika reakcije redukcije na $0,30 \text{ V}$ u $0,05 \text{ M NaHCO}_3$ pri promeni brzine potencijala 50 mVs^{-1} je linearna funkcija ispitivanih koncentracija. Vrednost maksimuma oksidativnog pika na $0,25 \text{ V}$ nije linearna funkcija ispitivanih koncentracija antibiotika i ne može se koristiti za kvantitativno određivanje (slika 33).

Elektroda od zlata ima izvesne prednosti u poredjenju sa elektrodom od staklastog ugljenika na kojoj je ranije elektrohemijski ispitivan midekamicin. Kada se u cikličnoj voltametriji koristi elektroda od ugljeničnih vlakana u elektrolitu $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaOH}$ koji sadrži alkohol neohodno je uraditi cikliziranje 4 do 5 puta između 0,2 i 1,2 V dok se ne dobije stabilan voltamogram. [74]

Elektroda od zlata koja se pre eksperimenta čisti po proceduri koja je opisana u eksperimentalnom delu daje uvek reproduktivne ciklične voltamograme (slike 32 i 33- isprekidana linija) i nije potreban elektrohemijski pretretman. Za razliku od elektrode od zlata elektroda od ugljeničnih vlakana se mora čistiti vodom 2 minuta u ultrasoničnom kupatilu pre svakog snimanja naredne koncentracije. [74]

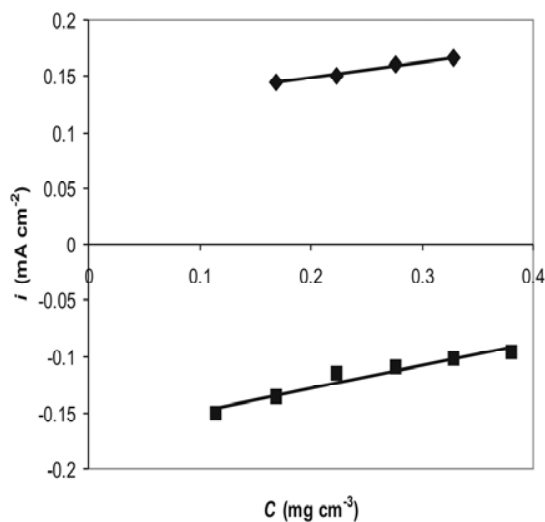
Linearnost oksidativnog pika na 0,85 V vs. SCE u 0.05 M NaHCO_3 u funkciji ispitivanih koncentracija pri promeni brzine potencijala 50 mVs^{-1} za midekamicin prikazana je na slici 35, i izračunata je na osnovu cikličnih voltamograma za svaku koncentraciju (slika 36). Ova linearna zavisnost prikazana je jednačinom:

$$i_{pa}(\text{mA cm}^{-2}) = 0,120 (\pm 0,002) + 0,141 (\pm 0,007) C(\text{mg ml}^{-1}), r = 0,9976 \quad (15)$$

Linearnost redukcionog pika na 0.3 V vs. SCE u 0.05 M NaHCO_3 u funkciji ispitivanih koncentracija pri promeni brzine potencijala 50 mVs^{-1} za midekamicin prikazana je na slici 35, izračunata na osnovu cikličnih voltamograma za svaku koncentraciju (slika 34). Ova linearna zavisnost prikazana je jednačinom:

$$i_{pa}(\text{mA cm}^{-2}) = -0,169 (\pm 0,006) + 0,203 (\pm 0,023) C(\text{mg ml}^{-1}), r=0,9759 \quad (16)$$

Kao što je već pomenuto ove jednačine su ranije primenjivane za kvantitativno određivanje malih koncentracija azitromicina, roksitromicina i metomila na elektrodi od zlata [105,136,143] i azitromicina na elektrodi od staklastog ugljenika. [108,109,111,116]

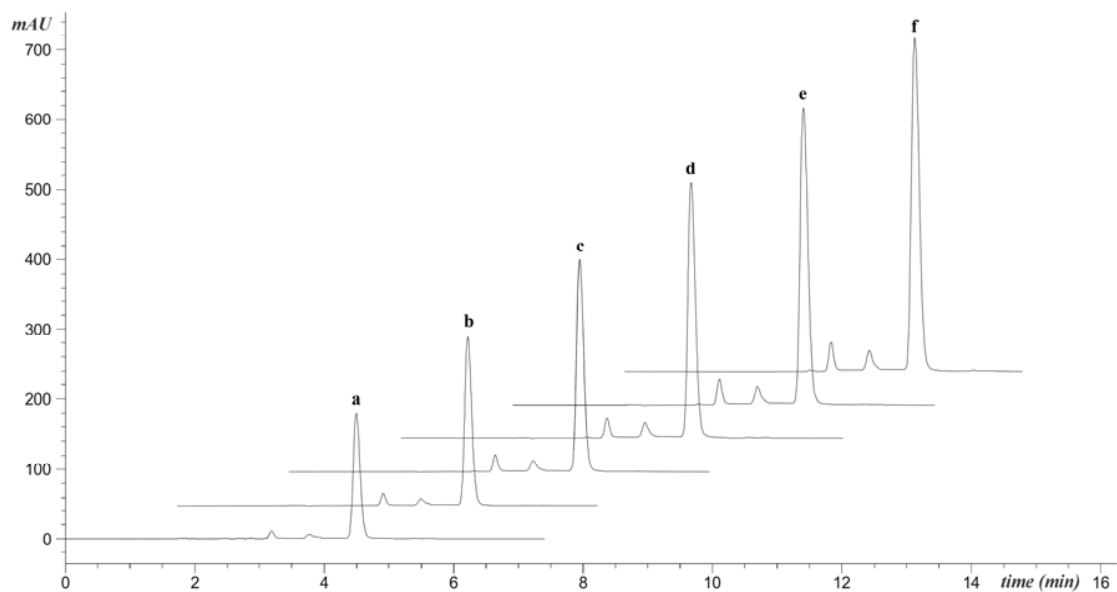


Slika 34. a) Zavisnost strujnog pika reakcije oksidacije midekamicina na 0,85 V (◆) od koncentracija u opsegu 0,11396 – 0,3802 mg ml⁻¹ b) Zavisnost strujnog pika reakcije redukcije na 0,3 V (■) od koncentracija u opsegu 0,11396 – 0,3802 mg ml⁻¹.

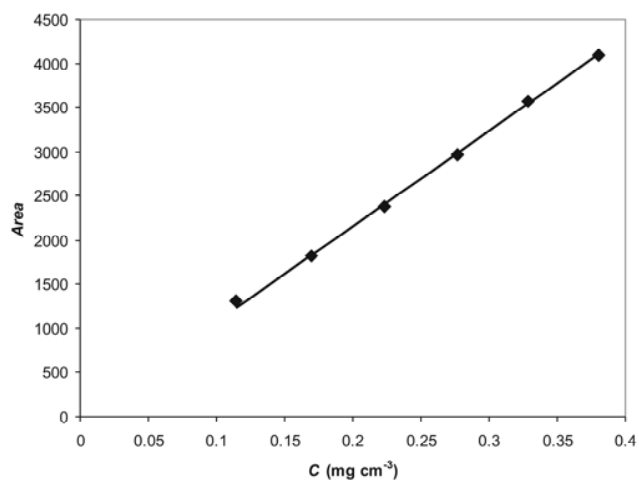
Preciznost kvantitativnog određivanja midekamicina je potvrđena analiziranjem cikličnih voltamograma iz 6 nezavisnih eksperimanata. Standardna devijacija i greška merenja su 6.08×10^{-3} i 2.72×10^{-4} mA cm⁻².

HPLC hromatogrami za svaku ispitivanu koncentraciju midekamicina (od 0.11396-0.3802 mg ml⁻¹) su prikazani na slici 35. Linearnost HPLC površina pikova midekamicina u zavisnosti od koncentracija prikazana je jednačinom (slika 36):

$$\text{površina} = 10779,067 (\pm 135,578) C (\text{mg ml}^{-1}), r = 0,9996 \quad (17)$$



Slika 35. HPLC hromatogrami uzoraka midokamicina koncentracije u opsegu od 0,11396 – 0,3802 mg ml⁻¹

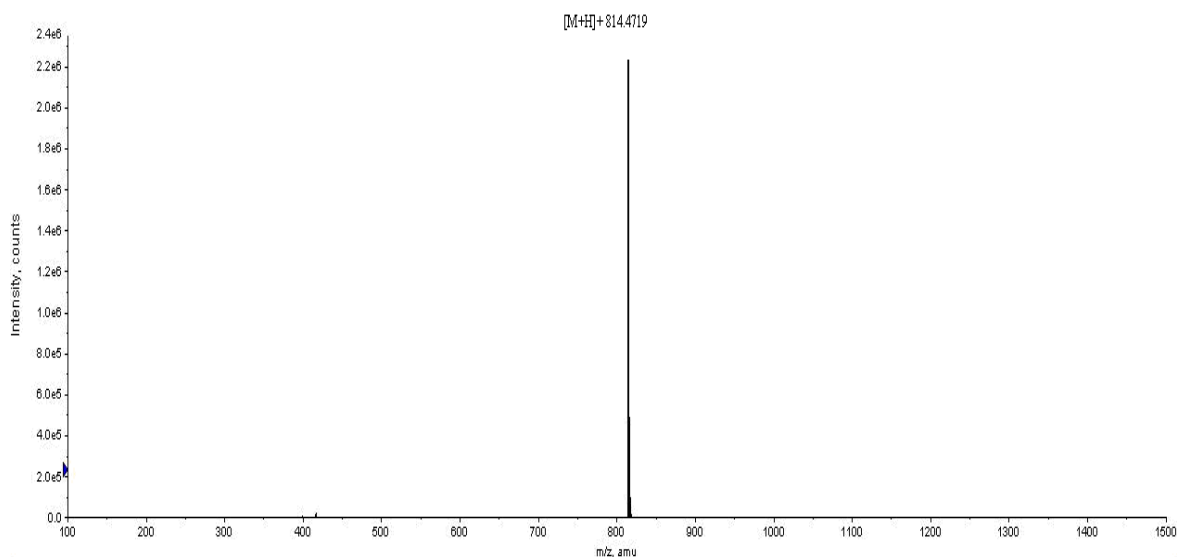


Slika 36. Kriva linearnosti površine pikova midokamicina u odnosu na ispitivane koncentracije 0,11396 – 0,3802 mg ml⁻¹

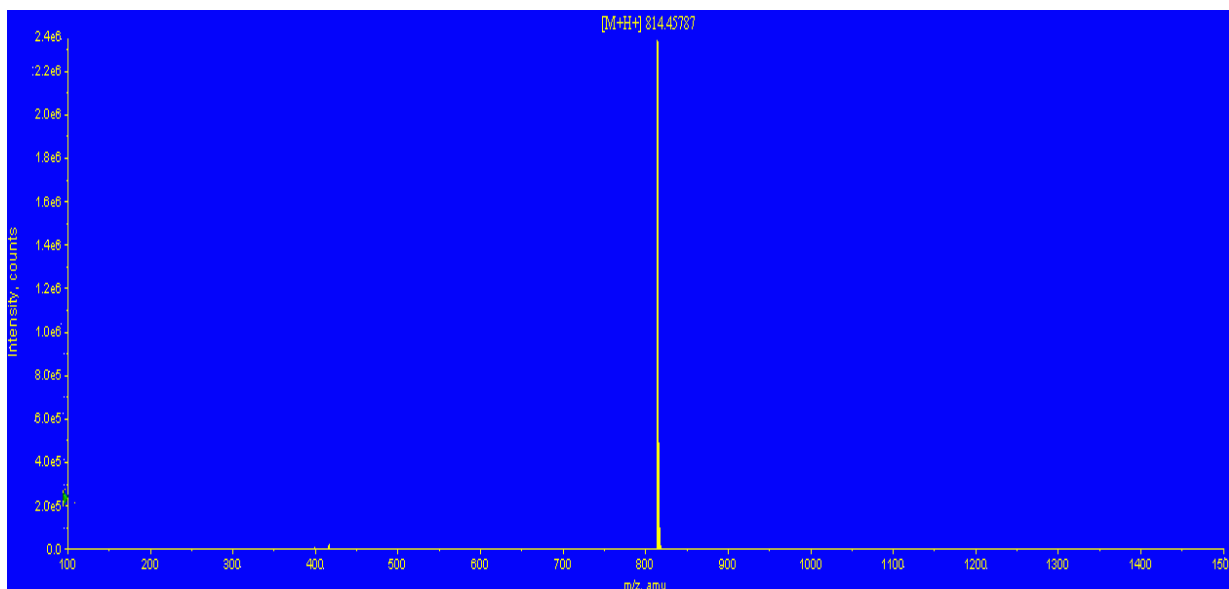
Voltametrijska metoda za kvantitativno određivanje ispitivanih koncentracija midekamicina u elektrolitu je brza, jednostavna i bez uticaja štetnih organskih isparenja.

Posmatrajući dobijene ciklične voltamograme zapaža se da elektro oksidacija midekamicina nije reverzibilan proces. Treba istaći da se zanemarljive količine oksidacionih produkata mogu akumulirati tokom cikliziranja. LC-MS analizom elektrolita u toku voltametrijskog kvantitativnog određivanja (svake ispitivane koncentracije) nisu nađeni degradacioni produkti midekamicina.

Na osnovu dobijenih masenih spektara (sl. 37 i 38) uočava se da maseni spektar ima samo jedan pik (m/z $[M+H]^+$ 814.45787) koji se javlja na istom retencionom vremenu i odgovara midekamicinu. Nakon ispitivanja elektrolita LC-MS analizom pre i posle elektrohemijskog tretmana može se zaključiti da nije došlo do promene u strukturi ispitivanog antibiotika.



Slika 37. Maseni spektar farmaceutske supstance midekamicina pre elektrohemijskog tretmana



Slika 38. Maseni spektar farmaceutске supstance midekamicina posle elektrohemijskog tretmana

4.3. Poređenje elektrohemijskog ponašanja eritromicina, azitromicina, klaritromicina, roksitromicina i midekamicina

Poredeći elektrohemijsko ponašanje eritromicina, azitromicina, klaritromicina, roksitromicina i midekamicina uočeno je da pod istim eksperimentalnim uslovima ispoljavaju potpuno različito elektrohemijsko ponašanje što je uslovljeno razlikama u strukturi.

Kao što je ranije navedeno osnovu molekula eritromicina čini aglikon *eritronolid* (makrociklični lakton od 14 atoma u ciklusu, od kojih 13C-atoma i 1 kiseonikov atom), pri čemu je aminošećer dezozamin vezan α -glikozidnom vezom za C-5 na prstenu, a L-kladinoza (*3-O-metilmikaroz*) α -glikozidnom vezom na C-3 na prstenu. (Slika 1). [8,14]

Azitromicin se razlikuje od ostalih makrolida po tome što ga karakteriše azalidna struktura (Slika 4). Predstavlja dibazan makrolidni antibiotik, a prisustvo drugog azota uslovljava dibaznost azitromicina. [8,14]

Klaritromicin nastaje metilovanjem hidroksi grupe na C6 atomu makrolidnog prstena. (Slika 3). Jedina razlika između klaritromicina i eritromicina što eritromicin ima slobodnu hidroksilnu grupu na C₆ atomu. [8,14]

Roksitromicin hemijski predstavlja 9-(2',5'-dioksaheksiloksiimino)-eritromicin A. Keto grupa u položaju C9 zamenjena sa eteroksimskim bočnim lancem (Slika 2). [8,14]

Midekamicin sadrži dienski konjugovani sistem, karbonilna grupa u položaju C9 je redukovana do 6 α -hidroksilne grupe, a u položaju C6 je formilmetil grupa. Specifični šećer (disaharid) je vezan u položaju C5 i sastoji se od 4'-hidroksidezozamina i *mikaroze*. Na šećeru mikarози nalazi se estarska grupa. (slika 5). [8, 14]

Na osnovu ispitivanja elektrohemijskog ponašanja eritromicina, azitromicina, klaritromicina, roksitromicina i midekamicina i uticaja njihove strukture može se zaključiti sledeće:

Eritromicin je kvalitativno određen u farmaceutskoj supstanci eritromicinu i komercijalnom obliku (Erythromycin® tablete).

Poređenjem elektrohemijske aktivnosti eritromicina i klaritromicina uočeno je da je elektrohemijaska aktivnost eritromicina izraženija što je potvrđeno rezultatima dobijenim FTIR i HPLC metodama. Pretpostavlja se da je aktivnost eritromicina izraženija zbog prisustva slobodne hidroksilne grupe. [104,106]

HPLC analizom elektrolita posle elektrohemijske reakcije uočeno je da su se u toku elektrohemijske oksidacije eritromicina desile promene u strukturi eritromicina. Početna koncentracija antibiotika se smanjila dok su koncentracije nečistoća porasle. Detektovani su i neki novi produkti. Proizvodi oksidacije eritromicina nisu samo protonovane soli i demetilovani eritromicin već dobijeni pikovi mogu odgovarati anhidro ili demetilovanim proizvodima, kao što su anhidro-N-demetileritromicin A i anhidroeritromicin C. Moguće formiranje eritromicina C ili D desilo bi se usled cepanja etarske veze. [104]

Azitromicin je kvalitativno i kvantitativno elektrohemijski određen u farmaceutskoj supstanci azitromicinu i komercijalnom obliku (Hemomycin® kapsule).

Vrednost jedinog oksidativnog strujnog pika i u čistom azitromicinu i komercijalnom je na 0,6V vs. SCE u 0.05 M NaHCO₃ pri promeni brzine potencijala 50mV s⁻¹ je linearna funkcija koncentracija u opsegu od 0,235 do 0,588 mg ml⁻¹. Pored toga oksidativni pik ekscipijensa laktoze monohidrata na 0,4 V vs. SCE ukazuje na to da se ovom elektrohemijском metodom može razdvojiti laktoza monohidrat od azitromicina. [105,115]

Farmaceutska supstanca *klaritromicin* kvalitativno je određen detekcijom reproduktivne četiri katodne (na 0,58 V, 0,31 V, 0,33 V i na 0,6–0,7 V vs. SCE) i jedne anodne reakcije (na 0,61 V vs. SCE), a komercijalni klaritromicin (Clathrocyn[®] tablete) jednom reproduktivnom anodnom reakcijom (0,60 do 0,80 V vs. SCE). Pored klaritromicina ekscipijens avicel pokazuje katodni pik na –0,90 V vs. SCE a prosolv pokazuje anodni pik na +0,33 V vs. SCE.

FTIR analizom glavnine elektrolita posle 4 sata držanja na potencijalu 0,61 V vs. SCE (katodni pik) uočene su promene estarske veze laktona i promene etarske i acetalne veze standarda klaritromicina.

HPLC analizom glavnine elektrolita posle 4 sata pod primenjenim elektrohemijским uslovima uočeno je značajno smanjenje koncentracije standarda klaritromicina.

FTIR analizom glavnine elektrolita posle 4 sata držanja na potencijalu 0,68 V vs. SCE (anodni pik) uočene su promene u strukturi molekula klaritromicina kada je u obliku komercijalnog klaritromicina. Promene se odnose na nestajanje laktonskog prstena i karbonilne grupe u položaju 9. [106,117]

Roksitromicin je kvalitativno i kvantitativno određen u farmaceutskoj supstanci, komercijalnom roksitromicinu (Runac[®] tablete) i uzorku urina koji je spajkovan sa roksitromicinom.

Elektrohemijским ispitivanjem cikličnom voltametrijom na elektrodi od zlata uočeno je da je vrednost oksidativnog pika čistog roksitromicina na 0,81 V vs. SCE linearna funkcija ispitivanih koncentracija u opsegu od 0,10006 do 0,654 mg ml⁻¹, a diferencijalnom pulsnom voltametrijom da pik gustine struje na 0,75 V vs. SCE pokazuje linearnu zavisnost ispitivanih koncentracija u opsegu od 0,10006 do 0,476 mg ml⁻¹.

Vrednost oksidativnog pika roksitromicina kao sadržaj čvrsto doziranog oblika na 0.85 V vs. SCE je linearna funkcija ispitivanih koncentracija u opsegu od 0,196 do 0,741

mg ml⁻¹, a vrednost oksidativnog pika uzorka urina koji je spajkovan sa roksitromicinom na 0,85 V vs. SCE linearna funkcija ispitivanih koncentracija u opsegu 2,5-10 µg ml⁻¹. [143]

Midekamicin je kvalitativno i kvantitativno određen u farmaceutskoj supstanci midekamicinu. Podleže dvema oksidativnim reakcijama između 0,1 V i 0,4 V vs. SCE i između 0,6 V i 1,0 V vs. SCE sa strujnim maksimumom (na 0,25 V i na 0,85 V vs. SCE) i jednoj redukcionoj reakciji na 0,30 V vs. SCE.

Vrednost oksidativnog strujnog pika midekamicina na 0,85 V vs. SCE i vrednost strujnog pika reakcije redukcije na 0,3 V vs. SCE pri promeni brzine potencijala 50 mV s⁻¹ je linearna funkcija koncentracija u opsegu od 0,11396 do 0,3802 mg ml⁻¹.

Poredjenjem svih dobijenih rezultata stiće se jasna slika o elektrohemijskom ponašanju ispitanih makrolidnih antibiotika, njihovim mogućim elektrohemijskim transformacijama kao i mogućnosti njihovog kvalitativnog i kvantitativnog određivanja. [144]

5. ZAKLJUČAK

Cilj ove disertacije bio je da se ispitivanjem elektrohemijske aktivnosti makrolidnih antibiotika roksitromicina i midekamicina i poredjenjem dobijenih rezultata sa rezultatima ranije ispitanih azitromicina, klaritromicina i eritromicina izvede opšti zaključak o elektrohemijskom ponašanju ispitanih makrolidnih antibiotika, njihovim mogućim elektrohemijskim transformacijama kao i o mogućnosti kvalitativnog i kvantitativnog određivanja. Posebno je razmatrana mogućnost primene novih voltametrijskih metoda za određivanja makrolidnih antibiotika koji su aktivne supstance farmaceutskih oblika i bioloških tečnosti.

Na osnovu detaljnog ispitivanja elektrohemijskog ponašanja roksitromicina metodama ciklične voltametrije i diferencijalne pulsne voltametrije i midekamicina metodom ciklične voltametrije na elektrodi od zlata simultano praćeno HPLC i LC/MS metodom može se zaključiti sledeće:

1. Elektrohemijskim ispitivanjem cikličnom voltametrijom na elektrodi od zlata uočeno je da je vrednost oksidativnog pika čistog roksitromicina na 0,81V vs. SCE u 0,05 M NaHCO₃ pri promeni brzine potencijala 50 mVs⁻¹ linearna funkcija ispitivanih koncentracija u opsegu 0,10006–0,654 mg ml⁻¹.
2. Diferencijalnom pulsnom voltametrijom na elektrodi od zlata uočeno je da je strujni pik roksitromicina na 0,75 V vs. SCE pri promeni brzine potencijala 2 mVs⁻¹, amplitude pulsa 25 mV i vremena pulsa 0,1s, pokazuje linearnu zavisnost ispitivanih koncentracija u opsegu 0,10006–0,476 mg ml⁻¹.
3. Elektrohemijskim ispitivanjem cikličnom voltametrijom vrednost oksidativnog pika roksitromicina kao sadržaj čvrsto doziranog oblika na 0,85V vs. SCE u 0,05 M NaHCO₃ pri promeni brzine potencijala 50 mVs⁻¹ je linearna funkcija ispitivanih koncentracija u opsegu 0,196–0,741 mg ml⁻¹.

4. Elektrohemijским ispitivanjem cikličnom voltametrijom vrednost oksidativnog pika roksitromicina pri ispitivanju uzorka urina koji je spajkovan sa roksitromicinom na 0,85 V vs. SCE u 0,05 M NaHCO₃ pri promeni brzine potencijala 50 mVs⁻¹ je linearna funkcija ispitivanih koncentracija u opsegu 2,5-10 µg ml⁻¹
5. Anodni pik oksidacije roksitromicina kada je u obliku tableta ili u uzorku urina koji je spajkovan roksitromicinom uvek se detektuje na navedenoj vrednosti potencijala i kao takav je jednoznačan za kvalitativno određivanje roksitromicina bez obzira na koncentraciju prisutnu u elektrolitu
6. HPLC analiza glavnine elektrolita, u toku i posle elektrohemijske reakcije, potvrdila je rezultate dobijene analizom vrednosti struje pika koje odgovaraju koncentracijama standarda roksitromicina i roksitromicina kao sadržaj čvrsto doziranog oblika. Dokazana je korelacija između površina pikova roksitromicina i ispitivanih koncentracija.
7. Elektrohemijским ispitivanjem cikličnom voltametrijom uočeno je da midekamicin podleže dvema oksidativnim reakcijama između 0,1 V i 0,4 V i između 0,6 V i 1,0 V sa strujnim maksimumom (na 0,25 V i na 0,85 V) i jednoj redukcionoj reakciji na 0,30 V u povratnom sweep-u.

8. Vrednost oksidativnog pika čistog midekamicina na 0,85 V pri promeni brzine potencijala 50 mVs^{-1} je linearna funkcija ispitivanih koncentracija u opsegu 0,1693-0,3802 mg ml^{-1} , a vrednost pika reakcije redukcije na 0,3 V vs. SCE je linearna funkcija koncentracija u opsegu od 0,11396 do 0,3802 mg ml^{-1} .
9. Anodni pik oksidacije čistog midekamicina se uvek detektuje na navedenoj vrednosti potencijala i kao takav je jednoznačan za kvalitativno određivanje midekamicina bez obzira na koncentraciju prisutnu u elektrolitu
10. HPLC analiza glavnine elektrolita u toku i posle elektrohemijske reakcije je potvrdila rezultate dobijene analizom vrednosti struje pika koje odgovaraju koncentracijama midekamicina.
11. LC-MS analizom glavnine elektrolita u toku voltametrijskog kvantitativnog određivanja (svake ispitivane koncentracije) nisu nađeni degradacioni produkti midekamicina. Na osnovu dobijenih masenih spektara uočava se da maseni spektar ima samo jedan pik (m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 814,45787) koji se javlja na istom retencionom vremenu i odgovara midekamicinu.
12. Polikristalna elektroda od zlata se pokazala kao optimalna radna elektroda za ispitivanje makrolidnih antibiotika roksitromicina i midekamicina zato što je potpuno definisana i daje apsolutno reproduktivne ciklične voltamograme. Ovo je u skladu sa rezultatima ranije ispitivanih makrolidnih antibiotika.
13. Za razliku od elektroda na kojima su ranije ispitivani roksitromicin i midekamicin elektroda od zlata se ne mora čistiti pre svakog određivanja naredne koncentracije i sve ispitivane koncentracije se dodaju u kontinuitetu tokom trajanja eksperimenta.

14. Preciznost kvantitativnog određivanja roksitromicina i midekamicina je potvrđena analiziranjem cikličnih voltamograma iz 6 nezavisnih eksperimenata. Dobijena standardna devijacija i greška merenja su $6,08 \times 10^{-3}$ i $2,72 \times 10^{-4}$ mA cm⁻²
15. Svi dobijeni rezultati pokazuju da je elektrohemijska metoda za kvalitativno i kvantitativno određivanje midekamicina i roksitromicina na elektrodi od zlata i u 0,05 M NaHCO₃ brza, efikasna, jednostavna i bez uticaja štetnih rastvarača. Kao takva može u budućnosti da zauzme značajno mesto u analitici farmaceutskih jedinjenja.
16. Na elektrodi od zlata u 0,05 M NaHCO₃ pod identičnim eksperimentalnim uslovima kvalitativno i kvantitativno su određeni azitromicin, roksitromicin i midekamicin, pri čemu su azitromicin i roksitromicin određeni i u komercijalnom obliku, a roksitromicin i u biološkoj tečnosti, urinu. Eritromicin i klaritromicin su kvalitativno određeni pri čemu su različitim tehnikama ispitane njihove transformacije do kojih je došlo u toku elektrohemijskog eksperimenta. Kvalitativno su određeni i u određenim komercijalnim oblicima, ali zbog svoje strukture nisu bili pogodni za kvantitativno određivanje.

6. LITERATURA

1. Rade Injac, The analysis of pharmacologically active compounds and biomolecules in real samples 2009
2. <http://en.wikipedia.org/wiki/Antibiotic>.
3. <http://www.alumni.ca/~leema3m/bg/macrolide.html>
4. I. Kanfer, M. F. Skinner, R. B. Walker, *J Chromatogr A*, Vol. **812** (1998) 255
5. L. Mulazimoglu, P. M. Tulkens, F. Van Bambeke, *Macrolides*, ATV-book-relised, 2004
6. J. G. González-Piñera, J. B. Penié, M. A. Rodriguez, P. P. Pine, N. Alfonso, L. Alonso, *Acta Medica*, Vol. **8** (1998) 71
7. J. Retsema, W. Fu, *Int J Antimicrob Ag*, Vol. **18** (2001) S3
8. The Merck index on CD-ROM version 12.2 content copyright © 1997 by Merck & Co Inc., Whitehouse station, NJ USA Published on CD by Chapman & Hall EPD
9. W. S. Champney, R. Burdine, *Antimicrob Agents Ch*, Vol. **39** (1995) 2141
10. M. Gaynor, A. Mankin, *Medical Chemistry*, Vol. **3** (2003) 949
11. H. Takashima, *Medical Chemistry*, Vol. **3** (2003) 991
12. H. Ohtani, C. Taninaka, E. Hanada, H. Kotaki, H. Sato, Y. Sawada, T. Iga, *Antimicrob Agents Ch*, Vol. **44** (2000) 2630
13. <http://emc.medicines.org.uk>
14. S. Vladimirov, D. Živanović-Stakić, *Farmaceutska hemija*, Farmaceutski fakultet 2006
15. *Jugoslovenska farmakopeja*, 2000, V izdanje
16. <http://www.shimadzu.com.br/analitica/aplicacoes/LCMS/lcms005.pdf>
17. Z. Liu, H. Chang-Qin, *Chromatographia*, Vol. **57** (2003)
18. H. Vanderhaege, L. Kerremans, *J Chromatogr A*, Vol. **193** (1980) 119
19. http://www.drugs.com/MMX/Erythromycin_Ethylsuccinate.htm

20. P. Zubata, R. Ceresole, M. A. Rosasco, M. T. Pizorno, *J Pharmaceut Biomed*, Vol. **27** (2002) 833
21. E. Asakura, H. Nakayama, M. Sugie, Y.Lan Zhao, M. Nadai, K. Kitaichi, A. Shimizu, M. Miyoshi, K. Takagi, K. Takagi, T. Hasegawa, *Eur J Clin Pharmacol*, Vol. **484** (2004) 333
22. Registar lekova, Centar za informacije o lekovima, Apotekarska ustanova Beograd, Beograd 2006
23. <http://www.nzhpa.org.nz/Macrolides.pdf>
24. R. Gandhi, O. Pillai, R. Thilagavathi, B. Gopalakrishnan, C. Lal Kaul, R.Panchagnula, *Eur J Pharm Sci*, Vol. **16** (2002) 175
25. G. W. Amsden, *Int J Antimicrob Ag*, Vol. **18** (2001) S11
26. C. Kremer, *Antibiotics review*, Vol. **9** (2002) 174
27. R. Goldman, S. Fesik, C. Doran, *Antimicrob Agents Chemother*, Vol. **34** (1990) 426
28. S. Mabe, J. Eller, W.S. Champney, *Curr Microbiol*, Vol. **49** (2004) 248
29. J. M. Zuckerman, *Infect Dis Clin North Am*, Vol. **18** (2004) 621
30. D. Graham, A. Opekun, P. Klein, *J Clin Gastroenterol*, Vol. **16** (1993) 292
31. S. Khanal, B. S. Rao, Y. Sharma, G. M. Khan, R. Makaju, Kathmandy University *J. Sci. Eng.Technol.* Vol. **1** (2005)
32. A. Saltermann, A. Perrent, S. Schmid, F. Eigenmann, R. Guller, K.B. Weber, J. Meier, P. Eichenberger, P. Komminote, *Swiss Med Wkly*, Vol. **135** (2005) 327
33. W. Luman, *J. Coll. Physicians Edinb*, Vol. **35** (2005) 45
34. http://127.0.0.1:49152/LPBin22/lpext.dll/EP408E/11_monographs_q-z/roxithromycin
35. A. Bryskier, *J Antimicrob Chemoth* , Vol. **41** (1998), Suppl. B, 1–21
36. http://www.greatvistachemicals.com/pharmaceutical_intermediates/roxithromycin.htm
37. E. Rubinstein, *Int J Antimicrob Ag*, Vol. **18** (2001) S71

38. A. Markham, A. D. Faulds, *Drugs*, Vol. **48** (1994) 297
39. D. Zhong, X. Li, A. Wang, Y. Xu , S.Wu, *Drug Metab Dispos* Vol. **28** (2000) 552
40. N. Taro, T. Takashi, E. Norio, S. Takashi, A. Eiichi, I. Shigeharu, *J Antibiot*, Vol. **24** (1971) 319
41. A. Vilim, M. J. LeBelle, W. L. Wilson, K. C. Graham, *J Chromatogr A*, Vol. **133** (1977) 239
42. S. W. Husain, V. Ghoulipour, H. Sepahrian, *Acta Chromatogr*, Vol. **14** (2004) 102
43. I. Kanfer, M. F. Skinner, R. B. Walker, *J Chromatogr A*, Vol. **812** (1998) 255
44. J. S. Torano, H. J. Guchelaar, *J Chromatogr B*, Vol. **720** (1998) 89
45. http://www.drugs.com/MMX/Erythromycin_Ethylsuccinate.htm
46. F. Kees , S. Spangler, M. Wellenhofer, *J Chromatogr A*, Vol. **812** (1998) 287
47. R Gandhi, O Pillai, R Thilagavathi, B. Gopalakrishnan, C. Lal Kaul, R. Panchagnula, *Eur J Pharm Sci*, Vol. **16** (2002) 175
- 48.H. Chepkwony, F. Kamau, E. Rodriguez, E. Roets, J. Hoogmartens, *Chromatographia* Vol. **54** (2001) 725
49. G. Amsden, *Int J Antimicrob Ag*, Vol. **18** (2001) S11
50. M. Horie, H. Takegami, K. Toya, H. Nakazawa, *Anal Chim Acta*, Vol. **492** (2003) 187.
51. C. Taninaka, H. Ohtani, E. Hanada, H. Kotaki, H. Sato, T. Iga, *J Chromatogr B*, Vol. **738** (2000) 405.
52. F. Kees , S. Spangler, M. Wellenhofer, *J Chromatogr A*, Vol. **812** (1998) 287
53. A. Khedr , M. Sheha, *J Chromatogr Sci*, Vol. **41** (2003) 10
54. Femke de Velde, Jan-Willem C. Alffenaar, A. Mireille A. Wessels, B. Greijdanus, Donald, R.A. Uges, *J Chromatogr B*, Vol. **877** (2009) 1771
55. M. Dubois, D. Fluchard, E. Sior, Ph. Delahaut, *J Chromatogr B*, Vol. **753** (2001) 189
56. E. Wilms, H. Trumpie, W. Veenendaal, D. Touw, *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*, Vol. **814** (2005) 37

57. O. A. El-Moaty Farghaly, N.A.L. Mohamed, *Talanta*, Vol. **62** (2004) 531
58. J. I. D. Wibawa, P. N. Shaw, D. A. Barrett, *J Chromatogr B*, Vol. **783** (2003) 359
59. P. O. Erah, D .A. Barrett, P. N. Shaw, *J Chromatogr B*, Vol. **682** (1996) 73
60. H. Amini, A. Ahmadiani, *J. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, Vol. **817** (2005) 193
61. G. Bahrami, B. Mohammadia, *J Chromatogr B*, Vol. **850** (2007) 417
62. M. Lohitnavy, O. Lohitnavy, S. Wittaya-areekul, K. Sareekan, S. Polnok W. Chaiyaput, *Drug Dev Ind Pharm*, Vol. **29** (2003) 653
63. O. Lohitnavy, M. Lohitnavy, K. Sareekan, S. Polnok, P. Taytiwat, *Biopharm Drug Dispos*, Vol. **24** (2003) 229
64. Y.G. Kim, H. J Kim, J. W. Kwon, W. B. Kim, M.G. Lee, *Int J Clin Pharmacol Ther*, Vol. **39** (2001) 356
65. W. Li, J .Rettig, X. Jang, D. T. Francisco, W. Naidong, *Biomed Chromatogr*, Vol. **20** (2006) 1242
66. P. Benninger, A. Cooper, R. Moisan, P. Patel, A. Elvin, J. Thiessen, *A Int J Clin Pharmacol Ther*, Vol. **42** (2004) 342
67. A. P Ruenis, R. A Moreno, E. Abib-Junior, R. P Simoes, L. M. Franco, F. C. Groppo, S. Baglie, G. C. Franco, P.L. Rosalen, *Int J Clin Pharmacol Ther*, Vol. **43** (2005) 399
68. G. F Van Rooyen, M J Smit, A. D de Jager, H. K. L. Hundt, K. J. Swart, A. F Hundt, *J Chromatogr B*, Vol. **768** (2002) 223
69. S. J. Choi, S. B. Kim, H. Y. Lee, D. H. Na, Y. S. Yoon, S. S. Lee, J. H. Kim, K .C. Lee, H. S. Lee, *Talanta*, Vol. **54** (2001) 377
70. I. Niopas, A. C. Daftsios, *Biomed Chromatogr*, Vol. **15** (2001) 507
71. H. K. Chepkwony, E. Rodriguez , F. N. Kamau, E .Roets, J. Hoogmartens, *Chromatographia*, Vol. **54** (2001) 725

72. A. Kaufmann, P. Butcher, K. Maden, M. Widmer, *Anal Chim Acta*, Vol. **586** (2007) 13
73. C. Govaerts, H. K. Chepkwony, A. Van Schepdael, E. Adams, E. Roets, J Hoogmartens, *J Mass Spectrom*, Vol. **39** (2004) 437
74. D. Liui, W. Jin, *J Chromatogr B*, Vol. **783** (2003) 509
75. H. He, R. Yu, G. Yang, Q. H. Yu, , X. H. Wang, *Yaoxue Xuebao*, Vol. **26** (1991) 156
76. Y. Yuan, J. Zhou, F. Zhao, *Chin J Pharm Anal*, Vol. **13** (1993) 116
77. L. Ying, H. Chang-qin, *Chromatographia*, Vol. **57** (2003) 143
78. T. Tosti, K. Drljević, Ž. Tesic, D. Milojković-Opsenica, *J Planar Chromatogr*, Vol. **18** (2005) 415
79. Ti. Hong, T. Xinghui, L. Xinzhong, X. Pingsheng, D. Zhiyong. Hunan Zhongguo Ganran Kongzhi Zazhi, Vol. **3** (2004) 314
80. Z. Jing, W. Jinlong, J. Jianguo, Y. Liang, *Zhongguo Yaoye*, Vol. **17** (2008) 16
81. C. Yiding, *Zhongguo Redai Yixue*, Vol. **8** (2008) 1239
82. Zhu, Zhihong, Liang, Shenghua, Hunan Jiudian, *Zhongnan Yaoye*, Vol. **5** (2007) 105
83. H. A Alghamdi, M. A. Alshadokhy, A. A. Alwarthan, *Jordan Journal of Chemistry*, Vol. **1** (2006) 171
84. M. Skinner, I. Kanfer, *J Chromatogr A*, Vol. **459** (1988) 261
85. Chang, Yiding, *Zhongguo Redai Yixue*, Vol. **8** (2008) 1239
86. Nong, Yining. *Yaowu Fenxi Zazhi*, Vol. **13** (1993) 386
87. M. Rasha Youssef, M. Maher Hadir, *Drug Testing and Analysis*, Vol. **2** (2010) 392
88. Zhang, Wen-li, Bao, En-dong, *Yangzhou Daxue Xuebao, Nongye Yu Shengming Kexueban*, Vol. **31** (2010) 20
89. Wang, Hai-tao; Zhang, Rui; Duan, Hong-an; Yao, Yan-lin, *Fenxi Shiyanshi* Vol. **27** (2008) 98

90. T. Friederike, G. Rainer, Z. Markus, G. Wolfgang, M. Markus, J.Christian, *J Chromatogr B*, Vol. **822** (2005) 133.
91. A. Despić, *Elektrohemijske tehnike i tehnologije*, Srpska akademija nauka i umetnosti, Beograd 2005
92. C. M. A. Brett, A. M. O. Brett, *Electrochemistry Principles, Methods, and Applications*, 1994, Oxford University Press, New York,
93. A. Scoog, D. M. West, F. J. Holler, *Analytical Chemistry*, 1991, Saunders College Publishing
94. J. Wang, *Analytical Electrochemistry 2d Ed*, 2000, Wiley-VCH
95. A. Bard, L. Faulkner, *Electrochemical Methods Fundamentals and Applications*, 2001, J. Wiley & Sons
96. V. S. Bagotsky, *Fundamentals of Electrochemistry 2nd Edition* (2006), John Wiley & Sons Ltd, A. N. Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry Russian Academy of Sciences
97. F.G. Thomas, G. Henze, *Introduction to Voltammetric Analysis-Theory and Practice* (2001), CSIRO Publishing, Australia
98. A. Despić, *Elektrohemijska, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva*, Beograd, 2003
99. H. Toreson, B. M. Eriksson, *J Chromatogr B*, Vol. **673** (1995) 81
100. E. Dreeassi, P. Corti, F. Bezzini, S. Furianetto, *Analyst*, Vol. **125** (2000) 1077
101. H. Wang, A. Zhang, H. Cui, D. Liu, R. Liu, *Microchem J*, Vol. **64** (2000) 67
102. L. M. Yudi, A. M. Baruzzi, V. Solis, *J Electroanal Chem*, Vol. **369** (1993) 211
103. N.H.S. Ammida, G. Volpe, R. Draisci, F. Delli Quadri, L. Palleschi, G. Palleschi, *Analyst*, Vol. **129** (2004) 15.
104. M. L. Avramov Ivić, S. D. Petrović, D. Ž. Mijin , F. Vanmoosa, D. Z. Orlović, D. Z. Marjanović, V. V. Radović, *Electrochim Acta*, Vol. **54** (2008) 649.

105. M. L. Avramov Ivic, S. D. Petrovic, D. Ž. Mijin, P. M. Živkovic, I. M. Kosovic, K. M. Drljevic, M. B. Jovanovic, *Electrochim Acta*, Vol. **51** (2006) 2407
106. M. L. Avramov Ivić, S. D. Petrović, F. Vonmoos, D. Ž. Mijin, P. M. Živković, K. M. Drljević, *Electrochem commun*, Vol. **9** (2007) 1643
107. O. A. El-Moaty Fargahaly, N. A. L. Mohamed, *Talanta* Vol. **62** (2004) 531.
108. B. Nigovic, *Anal Sci*, Vol. **20** (2004) 639
109. B. Nigović, B. Simunić, *J Pharmaceut Biomed Anal*, Vol. **32** (2003) 197.
110. Y. Wu, X. Ji, S. Hu, *Bioelectrochem*, Vol. **64** (2004) 91.
111. S. Komorski-Lovrić, B. Nigovic, *J Pharm Biomed Anal*, Vol. **36** (2004) 81
112. R. A. Shawabkeh, M. F. Tutunji, *Sensors*, Vol. **2** (2002) 436.
113. R. Gandhi, C.L. Kaul, R. Panchagnula, *J Pharm Biomed Anal*, Vol. **23** (2000) 1073
114. R. L. Ortiz, J. Araujo, O. P. Marquez, J. Marquez, Proceedings of the 2001 Joint International Meeting—The 200th Meeting of the Electrochemical Society Inc. and the 52nd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, San Francisco, CA, 2–7 September, 2001 (Abs# 1192).
115. Patentna prijava M. L. Avramov Ivić, S. D. Petrović, D. Ž. Mijin, K.M.Drljević, Postupak elektrohemijskog određivanja azitromicina P-1161/04 podneta 30.12.2004. Priznat patent br.51045 od 11.06.2010., Glasnik intelektualne svojine, 5(2010)4542-3 Beograd
116. Z. Mandić, Z. Weitner, M. Ilijać, *J Pharmaceut Biomed Anal*, Vol. **33** (2003) 647
117. M. L. Avramov-Ivić, S. D. Petrović, F. Vonmoos, D. Ž. Mijin, P. M. Živkovic K. M. Drljević, *Russ J Electrochem*, Vol. **44** (2008) 931
118. F. M. Demotes-Mainard, G. A. Vincon, C. H. Jarry, H. C. Albin, *J Chromatogr*, Vol. **490** (1989) 115
119. N. Grgurinovich, A. Matthews, *J Chromatogr*, Vol. **433** (1988) 298
120. D. Croteau, F. Vallee, M. G. Bergeron, M. Lebel, *J Chromatogr*, Vol. **419** (1987) 205.
121. J. Macek, P. Ptacek, J. Klima, *J Chrom B Biomed Sci Appl*, Vol. **723** (1999) 233.

122. A. Pappa-Louisi, A. Papageorgiou, A. Zitrou, S. Sotiropoulos, E. Georganakis, F. Zougrou, *J Chromatogr B*, Vol. **755** (2001) 57
123. R. Fan, Y. Chang, *J Electroanal Chem*, Vol. **256** (1988) 207
124. R. Fan, S. Li, W. Huang, *Chinese J Anal Chem*, (1990) Vol. **18**
125. Z. Yu, Y. Zhao, D. Guo, E. Wang, Chinese, *J Appl Chem*, Vol. **8** (1991) 33.
126. R. Fan, F. Ji, J. Qian, Q. Wu, C. Bian, Y. Yang, *Acta Pharmacol Sin*, Vol. **30** (1995) 34.
127. Y. Yang, S. L. Chin. *J Anal Chem*, Vol. **28** (2000) 974
128. Pharmacopoeia Japan, JP XV 2006
129. European pharmacopoeia, Ph EUR 7.0
130. British Pharmacopoeia (BP 7.0)
131. United States Pharmacopoeia USP 31-NF 26-Second Supplement
132. C. Taninaka, H. Ohtani, E. Hanada, H. Kotaki, H. Sato, T. Iga, *J Chromatogr B*, Vol. 738 (2000) 405
133. British Pharmacopoeia, Addendum, Published by HMSO Electronical publication sales, London, 1999, 533
134. R. Greaf, R. Peat, R. L. Peter, D. Pletcher, J. Robinson, *Instrumental Methods in Electrochemistry*, Ellis Horwood, Chichester, 1985, 178
135. J. Grimshaw, *Electrochemical Reactions, Mechanisms in Organic Chemistry*
136. A. V. Tomasević, M. L. Avramov Ivić, S. D. Petrović, M. B. Jovanović, D. Ž. Mijin, *J. Serb Chem Soc*, Vol. **74** (2009) 573
137. P. J. Smith, C. K. Mann, *J Org Chem*, Vol. **34** (1969) 1821
138. A. M. Castro Luna, M. F. L. de Mele, A. J. Arvia, *J Electroanal Chem*, Vol. **323** (1992) 149
139. B. Lertanantawong, A. P. O' Mullane, W. Surareungchai, M. Somasundrum, L.D. Burke, A. M. Bond, *Langmuir*, Vol. **24** (2008) 2856.

140. Z. Song, Y. Liu, X. Xie, *Curr Drug Metab*, Vol. **7** (2006) 389
141. M. L. Avramov Ivić, S. D. Petrović, D. Ž. Mijin, *J. Serb Chem Soc*, Vol. **72** (2007) 1427
142. M. L. Avramov Ivić, S. D. Petrović, P. M. Živković, D. Ž. Mijin, K. M. Drljević, *Ciceq*, Vol. **16** (2010) 111
143. K. M. Drljević-Đjurić, V. D. Jović, U. C. Lačnjevac, M. L. Avramov Ivić, S. D. Petrović, *Electrochim Acta*, Vol. **56** (2010) 47
144. K. M. Drljević-Đurić, M. L. Avramov Ivić, S. D. Petrović, D. Ž. Mijin, M. B. Jadranin, *Russ J Electrochem*, Vol. **47** (2011) 781
145. Y. H Kim, J. V. Pothuluri, C. E. Cerniglia, *J Pharma Ceut Biomed*, Vol. **38** (2005) 390

BIOGRAFIJA

Katica M. Drljević-Đurić rođena je 15.09.1973. godine u Cetinju, Crna Gora. Osnovnu i srednju školu završila je u Podgorici. Na Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala se 1992/93. godine. Diplomirala 1998. godine na Katedri za Neorgansku hemiju. Poslediplomske studije na Katedri za analitičku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu upisala je 2001/2002 godine. Ispite sa poslediplomskih studija položila je sa prosečnom ocenom 10. Magistrirala je 2008 godine na Katedri za analitičku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Doktorsku disertaciju upisala je na Katedri za organsku hemiju Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu 2008/2009 godine.

U periodu od oktobra 1998. godine do novembra 2007. godine bila je zaposlena je u farmaceutske hemijskoj industriji Hemofarm Koncernu. Od novembra 2007. godine zaposlena je u Agenciji za lekove i medicinska sredstva Srbije.

Spisak objavljenih naučnih radova i saopštenja:

T. Tosti, K. Drljević, Ž. Tešić, D. Milojković-Opsenica, Solting-Out Thin Layer Chromatography of Some Macrolide antibiotics, Journal of Planar Chromatography, Vol. 18 (2005) 415-418.

M. V. Avramov Ivić, S. D. Petrović, D. Ž. Mijin, P. M. Živković, I. M. Kosović, K. M. Drljević, M. B. Jovanović, Studies on electrochemical oxidation of azithromycin and Hemomycin at gold electrode i neutral electrolyte, Electrochimica Acta, Vol. 51 (2006) 2407-2416.

M. L. Avramov Ivić, S. D. Petrović, F. Vonmoos, D. Ž. Mijin, P. M. Živković, K. M. Drljević, The qualitative electrochemical determination of clarithromycin and spectroscopic detection of its structural changes at gold electrode, Electrochemistry Communications, Vol. 9 (2007) 1643–1647.

M. L. Avramov-Ivić, S. D. Petrović, F. Vonmoos, D. Ž. Mijin, P. M. Živkovic K. M. Drljević, The Electrochemical Behavior of Commercial Clarithromycin and Spectroscopic Detection of Its Structural Changes, Russian journal of electrochemistry, Vol. 44 (2008) 1004–1009.

M. L. Avramov-Ivić, S. D. Petrović, D. Ž. Mijin, K. M. Drljević, The Qualitative determination of oseltamivie phosphate in Tamiflu®capsule by cyclic voltmetry, Chemical Industry, Vol. 65 (2011) 87–91.

K. M. Drljević-Djurić, V. D. Jović, U. Č. Lačnjevac, M. L. Avramov Ivić, S. D. Petrović, D. Ž. Mijin, S. B. Djordjević, "Voltammetric and differential pulse determination of roxithromycin", *Electrochimica Acta*, Vol. 56 (2010) 47-52 (IF=3.325) ISSN 0013-4686

K. M. Drljević-Đurić, M. L. Avramov-Ivić, S. D. Petrović, D. Ž. Mijin, M. B. Jadranin, "A voltammetric method for quantitative determination of midecamycin compared to its simultaneous HPLC determination", *Russian Journal of Electrochemistry*, Vol. 47 (2011) 781–786.

M. L. Avramov-Ivić, S. D. Petrović, P. M. Živković, D. Ž. Mijin, K. M. Drljević, "A study of the catalytic role of the gold electrode in the electrochemical activation of four macrolide antibiotics in sodium bicarbonate solution", *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*, Vol. 16 (2010) 111-116.

M. L. Avramov-Ivić, K. M. Drljević-Đurić, S. D. Petrović, D. Ž. Mijin, S. B. Đorđević, V. D. Jović, U. Č. Lačnjevac, "Voltammetric determination of roxithromycin in human urine and runac tablets compared to its simultaneous HPLC determination", The 61st Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, Nice, France, 2010.

K. M. Drljević, M. L. Avramov Ivić, S. D. Petrović, D. Ž. Mijin, "Elektrohemijska aktivnost roksitromicina na elektrodi od zlata u neutralnom elektrolitu analiziranom HPLC metodom", XLVII Savetovanje srpskog hemijskog društva, Zbornik radova, EH-04, str.35, 21.03.2009., Beograd.

K. M. Drljević, M. L. Avramov Ivić, S. D. Petrović, D. Ž. Mijin, "Kvantitativno određivanje roksitromicina na elektrodi od zlata u neutralnom elektrolitu", VIII simpozijum "Savremene tehnologije i privredni razvoj", Zbornik izvoda radova str.100, 23-24.10.2009, Leskovac

M. L. Avramov Ivić, S. D. Petrović, D. Ž. Mijin, M. Jadranin, *Nova voltametrijska metoda za kvantitativno određivanje midekamicina simultano praćena HPLC metodom*, XLVIII savetovanje Srpskog Hemijskog Društva, Novi Sad, 17-18. april 2010., str. 40.

M. L. Avramov Ivić, S. D. Petrović, D. Ž. Mijin, K. M. Drljević, »*Novi postupak elektrohemijskog određivanja azitromicina*«, Yu-pat. prijava P- 1161/04, od 30.12.2004. god. Priznat patent br. 51045 od 11.06.2010., Glasnik intelektualne svojine, 5(2010) 4542-3, Beograd

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Изјављујем да је докторска дисертација под насловом

PROUČAVANJE ELEKTROHEMIJSKE AKTIVNOSTI I TRANSFORMACIJA MAKROLIDNIH ANTIBIOTIKA

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис

У Београду, 04.07.2014.

K. Djemić

Прилог 2.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

PROUČAVANJE ELEKTROHEMIJSKE AKTIVNOSTI I TRANSFORMACIJA MAKROLIDNIH ANTIBIOTIKA

која је моје ауторско дело.

Сагласан/на сам да електронска верзија моје дисертације буде доступна у отвореном приступу.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци дат је на следећој страници.)

Потпис



У Београду, 04.07.2014.

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.