

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Ljiljana M. Tolić

**ODREĐIVANJE ANIZOMICINA
TEČNOM HROMATOGRAFIJOM
SA TANDEM MASENOM
SPEKTROMETRIJOM I
ELEKTROHEMIJSKIM METODAMA
I PRIMENA NA ISPITIVANJE
STABILNOSTI LEKA I NJEGOVE
RASPODELE U TKIVIMA PACOVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2017

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Ljiljana M. Tolić

**DETERMINATION OF ANISOMYCIN BY
LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH
TANDEM MASS SPECTROMETRY AND
ELECTROCHEMICAL METHODS AND
APPLICATION TO INVESTIGATION OF
DRUG STABILITY AND ITS
DISTRIBUTION IN RAT TISSUES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017

Mentor:

dr Mila Laušević, redovni profesor u penziji
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Članovi komisije:

dr Svetlana Grujić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

dr Slobodan Petrović, profesor emeritus
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

dr Slavica Ražić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

dr Branislava Miljković, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Datum odbrane: _____

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u Laboratoriji za masenu spektrometriju Katedre za analitičku hemiju i kontrolu kvaliteta TMF-a, u Institutu za elektrohemiju i Centru za hemiju IHTM-a, kao i na Institutu za fiziologiju i biohemiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Posebnu zahvalnost dugujem prof. dr Mili Laušević, pod čijim sam mentorstvom uradila doktorsku disertaciju, za svestranu pomoć, korisne savete i uloženi trud i vreme tokom celokupnih doktorskih studija i same izrade doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Svetlani Grujić na zalaganju, pomoći i korisnim savetima koje mi je pružila tokom planiranja i realizacije istraživanja, oblikovanju radova i same doktorske disertacije.

Zahvaljujem se prof. dr Slobodanu Petroviću na pomoći prilikom planiranja i realizacije dela disertacije vezanog za elektrohemijska istraživanja, kao i na pomoći u oblikovanju ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se dr Slavici Ražić i dr Branislavi Miljković, profesorima Farmaceutskog fakulteta, na dragocenim savetima i korekcijama, koje su uticale na konačan izgled ove doktorske disertacije.

Iskreno se zahvaljujem dr Goranu Bačiću, profesoru Fakulteta za fizičku hemiju, na pomoći prilikom realizacije istraživanja u najbitnijim momentima. Takođe, veliku zahvalnost dugujem dr vet. med. Milošu Jovanoviću, glavnom veterinaru vivarijuma Biološkog fakulteta, za izvanrednu pomoć u eksperimentima sa životinjama, kao i dr Milošu Mojoviću, profesoru Fakulteta za fizičku hemiju, za pomoć prilikom obrade i tumačenja rezultata dobijenih u in vivo studiji.

Veliku zahvalnost dugujem dr Milki Avramov Ivić, naučnom savetniku IHTM-a, za prijatnu saradnju i svesrdnu pomoć tokom ispitivanja elektrohemijskog ponašanja anizomicina, kao i prilikom publikovanja dobijenih rezultata. Takođe se zahvaljujem i dr Jeleni Lović, naučnom saradniku IHTM-a, i prof. dr Dušanu Mijinu na pomoći prilikom ovih istraživanja.

Zahvaljujem se Dragici Nikolić, istraživaču saradniku Instituta za hemiju i tehnologiju mesa, na velikoj pomoći koju mi je pružila u početnoj fazi istraživanja vezanog za analiziranje lekova u biološkim uzorcima.

Zahvaljujem se koleginicama sa Katedre za analitičku hemiju i kontrolu kvaliteta na pomoći i kolegijalnosti. Posebno se zahvaljujem koleginicama iz Laboratorije za masenu spektrometriju, na svakodnevnoj prijatnoj saradnji, pomoći i podršci.

Nemerljivu zahvalnost dugujem mojim roditeljima, sestrama, bratu i Mirku na svesrdnoj pomoći, razumevanju i podršci.

Određivanje anizomicina tečnom hromatografijom sa tandem masenom spektrometrijom i elektrohemijskim metodama i primena na ispitivanje stabilnosti leka i njegove raspodele u tkivima pacova

Rezime

Lek anizomicin je potencijalni imunosupresor pri niskim dozama ($\leq 0,1 \mu\text{M}$). Takođe ima potencijalnu primenu kao psihofarmaceutik i antikancerogeni lek, a u novijim istraživanjima se pokazalo da je potencijalni radioprotektor. I pored višestruke potencijalne primene anizomicina, još uvek nema podataka o njegovoj kliničkoj primeni. Zbog toga je potrebno poznavanje farmakokinetičkih svojstava leka, pre svega poznavanje principa raspodele leka u organizmu i najznačajnijih farmakokinetičkih parametara. Takođe, da bi se utvrdio kvalitet leka i bezbednost njegovog korišćenja, potrebno je pratiti stabilnost i odrediti degradacione proizvode koji mogu nastati tokom proizvodnje, rukovanja ili čuvanja leka.

U ovom radu su opisani razvoj, optimizacija i validacija analitičke metode za analizu tragova anizomicina u biološkom materijalu, kao i u uzorcima dobijenim forsiranom degradacijom leka. U radu je izvršena optimizacija metode ekstrakcije leka iz bioloških materijala, kao i optimizacija metode prečišćavanja dobijenih ekstrakata. Razvijen je postupak forsirane degradacije anizomicina u skladu sa ICH smernicama. Razvijena je i optimizovana instrumentalna metoda tačne hromatografije sa tandem masenom spektrometrijom (LC-MS/MS). Takođe su primenjene i elektrohemijske metode za analizu procesa degradacije anizomicina.

Razvijena LC-MS/MS metoda je primenjena u *in vivo* studiji anizomicina na Wistar albino pacovima. Izmerena koncentracija anizomicina u serumu je bila dosta niža u poređenju sa koncentracijama leka izmerenim u analiziranim tkivima. Zaključeno je da anizomicin ima najveću raspodelu u mozgu, zatim u slezini, srcu, butnom mišiću i jetri, dok je najmanja raspodela u bubrezima. U studiji forsirane degradacije anizomicina zaključeno je da je ovaj lek izuzetno nestabilan u baznoj sredini i na povišenoj temperaturi (posebno u neutralnoj sredini), dok je najniži nivo degradacije leka postignut u prisustvu svetlosti i oksidacionog sredstva. Kao glavni degradacioni proizvod leka, pri svim testiranim uslovima, identifikovan je deacetilanizomicin, jedinjenje sa znatno manjom aktivnošću od anizomicina. Elektrohemijskim metodama je ustanovljeno da je oksidacija anizomicina nepovratan, difuziono kontrolisan proces.

Ključne reči: anizomicin, tečna hromatografija–tandem masena spektrometrija, elektrohemijske metode, biološki materijal, raspodela leka u tkivima, farmakokinetički parametri, forsirana degradacija

Naučna oblast: Hemijske nauke

UDK broj:

Determination of anisomycin by liquid chromatography with tandem mass spectrometry and electrochemical methods and application to investigation of drug stability and its distribution in rat tissues

Abstract

Drug anisomycin is a potential immunosuppressant in low doses ($\leq 0.1 \mu\text{M}$). It also has the potential use as a psychopharmaceutical and an anticancerous drug, and in the recent investigations it was shown that it is a potential radioprotector. Despite of multiple potential applications of anisomycin, its clinical use has not been reported yet. In that order, it is necessary to understand the pharmacokinetic properties of the drug, primarily its body distribution and the most important pharmacokinetic parameters. Also, in order to establish quality of the drug and safety of its use, it is required to monitor its stability and to determine its degradation products that may be formed during production, handling or storage.

In this work, development, optimization and validation of an analytical method for trace analysis of anisomycin in biological material, as well as in the samples obtained in forced degradation studies were described. In the study, optimization of the drug extraction from the biological material, as well as the optimization of the extract clean up procedure, were carried out. Procedure for forced degradation of anisomycin in accordance with ICH guidelines was developed. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) instrumental method was developed and optimized. Also, electrochemical methods were used for analysis of anisomycin degradation processes.

The developed LC–MS/MS method was applied in the *in vivo* study of anisomycin on Wistar albino rats. The anisomycin concentration found in serum was much lower than the concentrations found in observed tissues. It was concluded that anisomycin has the highest distribution in the brain, followed by the spleen, heart, femoral muscle and liver, and the lowest distribution was observed on the kidneys. In forced degradation study of anisomycin, it was concluded that the drug was highly unstable under alkaline conditions and at elevated temperature (especially under neutral conditions), while the lowest degradation level of anisomycin was observed in the presence of light and oxidizing agent. Deacetylanisomycin, compound that has significantly reduced activity compared to anisomycin, was identified as the main

degradation product under all tested conditions. Electrochemical methods showed that anisomycin oxidation is an irreversible and diffusion controlled process.

Keywords: anisomycin, liquid chromatography–tandem mass spectrometry, electrochemical methods, biological material, tissue distribution of the drug, pharmacokinetic parameters, forced degradation

Scientific Field: Chemical sciences

UDC number:

Sadržaj:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DEO	3
2.1. Antibiotici	3
2.1.1. Anizomicin	4
2.2. Farmakokinetika	6
2.2.1. Raspodela leka u organizmu	7
2.2.2. Odabrani farmakokinetički parametri	8
2.3. Praćenje stabilnosti leka	9
2.3.1. Studije forsirane degradacije	10
2.4. Analitičke metode	14
2.4.1. Priprema uzoraka biološkog materijala	14
2.4.1.1. Metoda ekstrakcije na čvrstoj fazi	18
2.4.2. Tečna hromatografija visokih performansi	21
2.4.2.1. Stacionarna faza	23
2.4.2.2. Mobilna faza	23
2.4.2.3. Detektori	24
2.4.3. Masena spektrometrija	24
2.4.3.1. Tehnike jonizacije	25
2.4.3.2. Maseni analizator	27
2.4.3.3. Detektori	29
2.4.4. Tandem masena spektrometrija	30
2.4.4.1. Načini skeniranja u tandem masenoj spektrometriji	31
2.4.5. Validacija metode	32
2.4.5.1. Uticaj matrice	34
2.4.6. Elektrohemijske metode za analizu lekova	35
2.4.6.1. Ciklična voltometrija	38
2.4.6.2. Voltometrija sa pravougaonim impulsima	40
3. EKSPERIMENTALNI DEO	41
3.1. Korišćene hemikalije	41
3.2. Snimanje masenih spektara anizomicina	41
3.3. Optimizacija hromatografskih parametara	42
3.4. Optimizacija LC–MS/MS parametara	43
3.5. LC–UV analiza	44
3.6. Određivanje anizomicina u uzorcima biološkog materijala	44
3.6.1. Optimizacija postupka pripreme uzoraka biološkog materijala	44
3.6.2. Validacija metode	46
3.6.3. Metoda kalibracije	49
3.6.4. Eksperimenti sa životinjama za <i>in vivo</i> studiju	49

3.7.	Studija forsirane degradacije.....	50
3.7.1.	Priprema uzoraka i postupak forsirane degradacije.....	50
3.7.2.	Validacija metode	54
3.8.	Elektrohemijska degradacija anizomicina	55
3.8.1.	Korišćeni instrumenti	55
3.8.2.	Priprema uzoraka anizomicina za elektrohemijsko ispitivanje cikličnom voltametrijom i voltametrijom sa pravougaonim impulsima	56
3.8.3.	Pripremanje uzoraka za analizu LC–MS/MS metodom	57
4.	REZULTATI I DISKUSIJA	58
4.1.	Maseni spektri anizomicina	58
4.2.	Optimizacija LC i LC–MS/MS parametara	60
4.3.	Određivanje anizomicina u uzorcima biološkog materijala.....	61
4.3.1.	Optimizacija postupka pripreme uzoraka biološkog materijala	61
4.3.2.	Validacija metode	65
4.3.3.	Ispitivanje raspodele i određivanje farmakokinetičkih parametara leka u <i>in vivo</i> studiji	70
4.4.	Studija forsirane degradacije.....	76
4.4.1.	Optimizacija hromatografskih parametara	76
4.4.2.	Validacija metode	77
4.4.3.	Put fragmentacije anizomicina	79
4.4.4.	Degradacija anizomicina	81
4.5.	Elektrohemijska degradacija anizomicina	94
4.5.1.	Ciklična voltometrija	94
4.5.2.	Voltometrija sa pravougaonim impulsima.....	96
4.5.3.	Dugotrajna ciklizacija potencijala praćena LC–MS/MS analizom	97
5.	ZAKLJUČAK	102
	LITERATURA	104
	OBJAVLJENI NAUČNI RADOVI IZ DOKTORSKE DISERTACIJE.....	117
	BIOGRAFIJA AUTORA	118

1. UVOD

Anizomicin je lek koji ima višestruko dejstvo, zbog čega se veliki broj istraživanja bavi ispitivanjem njegove potencijalne primene, ali se on još uvek ne koristi u terapiji. Mehanizam dejstva ovog antibiotika u organizmu je inhibicija sinteze proteina. S obzirom na to da anizomicin suzbija razvoj malignih ćelija, postoji mogućnost njegove primene kao citostatika. Imajući u vidu da je anizomicin imunosupresor moguća je njegova primena u lečenju autoimunih bolesti, kao i za sprečavanje odbacivanja presađenih organa. Takođe, anizomicin utiče na memoriju tako što sprečava formiranje novih sećanja, a može izazvati i amneziju. Najnovija istraživanja pokazuju da je anizomicin i potencijalni radioprotektor.

Prilikom izbora novog leka za kliničku primenu primarno je potrebno ispitivanje farmakokinetike, s obzirom na to da poznavanje kinetičkih procesa leka direktno utiče na potencijalnu kliničku primenu. S obzirom na to da lekovi ne prodiru ravnomerno u tkiva svih organa, za procenu efikasnosti i bezbednosti leka neophodno je utvrditi raspodelu leka u organima. Pored informacija o raspodeli leka u tkivima tokom vremena, razmatranje leka za kliničku primenu zahteva i poznavanje najbitnijih farmakokinetičkih parametara. Ispitivanje raspodele lekova u tkivima različitih organa i praćenje farmakokinetike lekova sprovodi se u *in vivo* predkliničkim studijama, najčešće na pacovima. Takođe, da bi se poboljšao kvalitet leka i utvrdila bezbednost njegovog korišćenja, potrebno je pratiti stabilnost i odrediti degradacione proizvode koji mogu nastati tokom proizvodnje, rukovanja ili čuvanja leka. S obzirom na to da prisustvo degradacionih proizvoda može da utiče na svojstva leka, poželjno je utvrditi identitet potencijalno prisutnih degradacionih proizvoda. Stabilnost lekova se može ispitivati sprovođenjem studije forsirane degradacije, pri čemu se uzorci obično podvrgavaju kiseloj, baznoj i neutralnoj hidrolizi, oksidaciji, termičkoj i fotodegradaciji, kao i elektrohemijskoj degradaciji. Na ovaj način se može proceniti stabilnost leka tokom određenog vremenskog perioda pod uticajem različitih faktora. Identifikovanjem degradacionih proizvoda može se pretpostaviti mogući mehanizam degradacije leka.

Cilj istraživanja ove doktorske disertacije je razvoj, optimizacija, validacija i primena nove bioanalitičke metode za određivanje tragova leka anizomicina u tkivima različitih organa (mozak, srce, slezina, jetra, bubrezi i butni mišić) i serumu, primenom metode tačne hromatografije sa tandem masenom spektrometrijom (LC–MS/MS, eng. *liquid chromatography–tandem mass spectrometry*), radi ispitivanja distribucije i određivanja farmakokinetičkih parametara leka u različitim tkivima i serumu nakon potkožnog injektovanja Wistar albino pacovima. Pored toga, cilj rada je i definisanje uslova za sprovođenje studije forsirane degradacije leka pod različitim uslovima (hidroliza, oksidacija, toplota i svetlost) u skladu sa ICH (eng. *International Conference on Harmonisation*) smernicama i u skladu sa svojstvima anizomicina. Nova LC–MS/MS metoda, biće validirana prema ICH smernici i primenjena u ispitivanju stabilnosti leka anizomicina u studiji forsirane degradacije, uz praćenje nastalih degradacionih proizvoda. Takođe, cilj ovog rada je i razvoj novih elektrohemijskih metoda (ciklične voltimetrije i voltimetrije sa pravougaonim impulsima) koje bi, pored LC–MS/MS metode, služile za praćenje degradacije i određivanje elektrohemijskog ponašanja anizomicina.

2. TEORIJSKI DEO

2.1. Antibiotici

Antibiotici se mogu definisati kao jedinjenja koja imaju sposobnost da spreče rast mikroorganizama ili da ih unište (Walsh, 2003). Prirodni antibiotici se definišu i kao jedinjenja malih molekulskih masa koja predstavljaju metabolite mikroorganizama i pri niskim koncentracijama mogu nepovoljno da utiču na rast i razvoj drugih mikroorganizama (Lancini *et al.*, 1995; Hardy, 2002). Više od 50% antibiotika proizvode pripadnici samo jednog bakterijskog reda *Actinomycetales*, tačnije jednog njegovog roda *Streptomyces*. Pored prirodnih antibiotika postoje i polusintetski antibiotici koji nastaju hemijskom modifikacijom prirodnih antibiotika ili drugih proizvoda metabolizma mikroorganizama (Lancini *et al.*, 1995). Postoji mali broj antibiotika koji se dobijaju sintetskim putem (Walsh, 2003). Antibiotici deluju na različite vrste mikroorganizama, kao što su bakterije, gljive i protozoe (Lancini *et al.*, 1995).

Prema funkciji koju imaju na mikroorganizme antibiotici se mogu svrstati u dve grupe (Lancini *et al.*, 1995; Walsh, 2003):

- bakteriostatski, koji usporavaju rast i razvoj bakterija i
- bakteriocidni, koji ubijaju bakterije.

S tim da ova podela nije apsolutna, jer njihovo dejstvo može zavisiti od primenjene doze. Tako da antibiotik pri manjim dozama može delovati kao bakteriostatik, a pri većim dozama kao bakteriocid (Walsh, 2003).

Mehanizam dejstva antibiotika se svodi na blokiranje rasta mikroorganizama. Zapravo, antibiotici inhibiraju dejstvo molekula, kao što je enzim ili nukleinska kiselina, koji je neophodan za umnožavanje ćelija i na taj način sprečavaju vršenje njegove osnovne funkcije. Tako se prema mehanizmu dejstva antibiotici mogu podeliti na (Lancini *et al.*, 1995):

- inhibitore sinteze ćelijskog zida,
- inhibitore sinteze proteina,

- inhibitore replikacije nukleinskih kiselina,
- antibiotike koji menjaju propustljivost ćelijske membrane i
- antibiotike koji utiču na izmenu metaboličkih puteva.

Univerzalno prihvaćena podela antibiotika ne postoji, pa se oni mogu podeliti i na osnovu hemijske građe na (Lancini *et al.*, 1995):

- β-laktamske antibiotike,
- tetracikline,
- aminoglikozide,
- makrolide,
- linkozamide,
- ansamicine,
- peptide i
- glikopeptide.

Postoje i antibiotici koji se prema svojoj hemijskoj strukturi ne mogu svrstati ni u jednu od navedenih grupa.

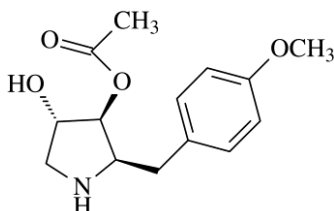
Prekomerna upotreba antibiotika dovodi do sve veće rasprostranjenosti rezistencije među mikroorganizmima. Bakterija je rezistentna na antibiotik ukoliko on nema uticaja pri niskim koncentracijama, a dejstvo je očekivano (Lancini *et al.*, 1995; Bonilla and Muniz, 2009).

2.1.1. Anizomicin

Anizomicin, poznat i pod komercijalnim nazivom flagecidin, je višefunkcionalni antibiotik. Anizomicin se prema hemijskoj strukturi ne svrstava ni u jednu od navedenih grupa. To je pirolidni antibiotik čija je empirijska formula $C_{14}H_{19}O_4$ (Sobin i Tanner, 1954) i hemijski naziv je 2-p-metoksifenilmetil-3-acetoksi-4-hidroksi-pirolidin (slika 1) (Beereboom *et al.*, 1964).

Anizomicin je dobijen izolovanjem iz dve bakterijske vrste *Streptomyces* identifikovane kao *Streptomyces gluceorus* i *Streptomyces roseochromogenes* (Sobin i Tanner, 1954).

To je beli prah rastvoran u metanolu (20 mg mL^{-1}), nižim alkoholima, estrima, ketonima i hloroformu, umereno rastvoran u vodi (2 mg mL^{-1}), benzenu, toluenu i heksanu, sa vrednošću pK_a 7,9 (Brann, 2003; Sigma Aldrich, 2017a).



Slika 1. Struktura anizomicina

Anizomicin je poznat kao jedan od najdelotvornijih inhibitora sinteze proteina (Grollman, 1967). Takođe, anizomicin može da izazove degradaciju proteina (Theodosiou i Ashworth, 2002; Ogawa *et al.*, 2004). On inhibira sintezu proteina tako što se vezuje za peptidil transferazu 60S ribozomalne podjedinice 80S ribozomalnog sistema eukariotskih ćelija i na taj način blokira formiranje peptidne veze, sprečava produžavanje i izaziva stabilizaciju ribozoma (Barbacid *et al.*, 1974). Anizomicin inhibira sintezu proteina u nekim protozoama, HeLa ćelijama, retikulocitima zečeva, kvascima i ekstraktima iz prethodno navedenih izvora, ali je neaktivan prema ekstraktima bakterije *Escherichia Coli*. Anizomicin je primarno aktivan prema protozoama, dok ima manju aktivnost prema bakterijama i gljivama (Grollman, 1967). Na osnovu ovih svojstava, prvobitno je smatrano da anizomicin ima potencijalnu kliničku upotrebu za tretiranje kandidate i amebijaze (Beereboom *et al.*, 1964; Macías-Silva *et al.*, 2010).

Daljim ispitivanjem anizomicina utvrđeno je da on ima potencijalnu višestruku kliničku upotrebu. Kako je utvrđeno da je za formiranje memorije neophodna sinteza proteina, ispitivanje uticaja anizomicina na neurološke procese kod životinja je intenzivirano i anizomicin se pokazao kao potencijalni psihijatrijski lek (Cohen *et al.*, 2006). Direktnim injektovanjem anizomicina u amigdalnu i hipokampus, koji su glavni delovi mozga za skladištenje memorije, uklanja se memorija, što dovodi do amnezije (Nader *et al.*, 2000; Debiec *et al.*, 2002; Sadowski *et al.*, 2011; Gur *et al.*, 2014; Pena *et al.*, 2014). Dalja istraživanja su pokazala da se ovaj uticaj anizomicina može neutralisati korišćenjem

amfetamina, nikotina i kofeina, čak i u slučaju kada je došlo do više od 90% inhibicije sinteze proteina (Judge i Quartermain, 1982). Takođe se pokazalo da je anizomicin potencijalni imunosupresor, čak i pri niskim koncentracijama ($\leq 0,1 \mu\text{M}$), tako da se on može koristiti u tretmanu nekih autoimunih bolesti, kao i pri transplantaciji (Xing *et al.*, 2008). Dodatno, anizomicin se pokazao kao citotoksični lek, tj. lek koji izaziva smrt malignih ćelija tumora, tako da se potencijalno može koristiti kao antikancerogeni lek (Mawji *et al.* 2007; Xia *et al.*, 2007; Croons *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2012). S obzirom na to da mehanizam dejstva anizomicina nije u potpunosti poznat, potrebno je sprovesti dodatna ispitivanja da bi se anizomicin koristio u kliničkom lečenju u budućnosti (Macías-Silva *et al.*, 2010). Iako anizomicin ima višestruku potencijalnu kliničku primenu, još uvek ne postoji razvijena metoda za kvantitativno određivanje anizomicina koja bi se primenila u farmakokinetičkoj studiji, niti je ustanovljena njegova stabilnost pod uslovima koji su propisani zvaničnim smernicama.

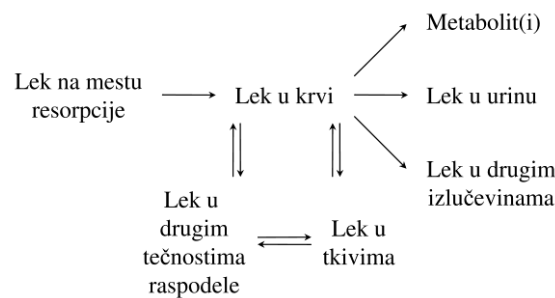
2.2. Farmakokinetika

Farmakokinetika je značajna u predkliničkim i kliničkim (I i II) fazama razvoja leka, kao i u postregistracionoj fazi. Reč „farmakokinetika” uveo je Fridrih H. Dost (Friedrich H. Dost) 1953. godine i ovu disciplinu definisao kao „nauku kvantitativne analize odnosa između organizma i leka” (Gladtko *et al.* 1988; Pokrajac, 2002). To je nauka koja opisuje kretanje leka u organizmu (Jang *et al.*, 2001). Farmakokinetika predstavlja matematičko proučavanje ponašanja lekova u organizmu u funkciji vremena (Pokrajac, 2002). Ona se zasniva na praćenju koncentracija lekova i/ili metabolita lekova u biološkim tečnostima (plazmi ili urinu, pre svega) u toku vremena. Podaci dobijeni praćenjem ove zavisnosti se obrađuju primenom matematičkog modela, tj. prostornom ili neprostornom analizom. Na taj način farmakokinetika proučava procese kojima lek u organizmu podleže, a to su procesi resorpcije (A, eng. *absorption*), raspodele (D, eng. *distribution*), metabolizma (M, eng. *metabolism*) i izlučivanja (E, eng. *excretion*) lekova (ADME sistem) (Jang *et al.*, 2001; Pokrajac, 2002). Predkliničke farmakokinetičke studije se najčešće izvode na glodarima (Jang *et al.*, 2001). Takođe je značajno poznavati obim raspodele leka u pojedinim organima.

2.2.1. Raspodela leka u organizmu

Raspodela leka u organizmu je povratna ili nepovratna distribucija leka na uređeni način, kada lek stigne u sistemska cirkulaciju, i to u jednom ili više prostora organizma. Pri čemu se u fiziološkom smislu prostorom smatra svako tkivo ili skup tkiva sa jednakim svojstvima raspodele, kao i pojedini organi i telesne tečnosti, a u farmakokinetičkom smislu, kinetičko područje ulaska i izlaska leka, okarakterisano odgovarajućom zapreminom, koncentracijom leka i brzinama raspodele (Pokrajac, 2002).

Po dolasku u sistemska cirkulaciju, nakon resorpcije ili intravenske injekcije, lek se raspoređuje u organizmu pomoću krvi ili limfe. Lek se u celokupnoj krvi rasporedi već u toku 1–2 min. Međutim, mesto interakcije lek–receptor obično nije u krvotoku, nego u tkivu. Zato, da bi pokazao svoje terapijsko delovanje, lek često mora da prođe kroz više membrana. Biološka tečnost je ta koja lek dovodi do membrane i, posle prolaza, ponovo ga odnosi, tako da postoji konstantna izmena tečnosti, i lekova rastvorenih u njoj, između cirkulatornog sistema i tkiva (Pokrajac, 2002). Odlazak leka u tkiva i povezanost procesa raspodele sa procesima resorpcije i eliminacije, prikazan je na slici 2.



Slika 2. Prikaz odnosa distribucije leka sa procesima resorpcije i eliminacije (Pokrajac, 2002)

Raspodela leka zavisi od fizičko-hemijskih svojstava leka, kao i od sastava membrana tkiva. Ovi faktori mogu dovesti do uniformne ili neujednačene raspodele lekova u različitim prostorima u telu, kao i u telesnim tečnostima (Pokrajac, 2002). U ekstremnim slučajevima može doći do akumulacije leka u određenim tkivima ili do

gotovo potpunog isključenja leka iz određenog dela organizma tokom određenog vremena. Mesto na koje treba posebno obratiti pažnju je mozak, koji je od kapilarnog sistema krvi odvojen krvno–moždanom barijerom čija membrana ima specifičnu strukturu (Seydel i Wiese, 2002).

2.2.2. Odabrani farmakokinetički parametri

Ispitivanje novog leka zahteva uspostavljanje zavisnosti koncentracije od vremena, kao i proučavanje glavnih farmakokinetičkih parametara. Ovi parametri omogućavaju kvantitativna tumačenja farmakokinetičkih procesa. Tako, da bi se raspodela leka u organizmu bliže objasnila, podaci se mogu obraditi neprostornom analizom koja je široko rasprostranjena u farmakokinetičkim istraživanjima (Shin *et al.*, 2003; Li i Bu, 2004; Urva *et al.*, 2009; Jin *et al.*, 2011; Rao *et al.*, 2012; Stariat *et al.*, 2014; Wyns *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2014; Bratkowska *et al.*, 2015). U tu svrhu se mogu koristiti različiti farmakokinetički softveri od kojih se najčešće primenjuje WinNonlin. Parametri koji se dobijaju ovom vrstom kinetičke analize su maksimalna koncentracija leka u tkivu i serumu (C_{\max}), kao i vreme koje je potrebno da se postigne maksimalna koncentracija leka (t_{\max}). Ovi parametri se očitavaju direktno sa krive zavisnosti koncentracije od vremena. Ostali farmakokinetički parametri na kojima se zasniva ova analiza su (Pokrajac, 2002):

- Konstanta brzine eliminacije (β): ukupna konstanta brzine prvog reda za jedan ili više procesa kojima se lek uklanja iz centralnog prostora organizma, izlučivanjem nepromenjenog leka i jednom ili više reakcija metabolizma, ili: konstanta koja predstavlja udeo leka koji će biti eliminisan iz organizma u jedinici vremena ili brzina kojom se smanjuje koncentracija leka tokom faze eliminacije (Bardal *et al.* 2011).
- Površina ispod krive koncentracije leka u krvi u funkciji vremena, PIK (AUC, eng. *area under the curve*): mera količine leka koja se nalazi u organizmu. Koristi se za izračunavanje stepena biološke raspoloživosti leka iz primenjenog farmaceutskog oblika ili frakcije resorbovanog leka. Najčešće se ova vrednost određuje tzv. trapezoidnim pravilom. Trapezoidno pravilo se koristi kod krivih koncentracija leka u funkciji vremena kod kojih nije vršeno fitovanje (eng. *fitting*) podataka ili kod

krivih koje nisu pravilne, ili pak ako nisu poznati farmakokinetički podaci na osnovu kojih se može izračunati PIK prema sledećoj jednačini (1):

$$\text{PIK} = \frac{D}{V_d \beta} (\text{mg h L}^{-1}) \quad (1)$$

U ovoj jednačini D je doza (mg), a V_d je zapremina raspodele.

Farmakokinetički parametri koji se dalje računaju su:

- Poluvreme eliminacije ($t_{1/2}$): vremenski interval tokom koga se koncentracija leka u centralnom prostoru (krvi) smanji na polovinu svoje početne vrednosti tokom eliminacionog procesa prvog reda, ili: to je vreme potrebno da se koncentracija leka u krvi (plazmi ili serumu) promeni za jednu polovinu posle postizanja dinamičke ravnoteže. Ovim parametrom se češće nego konstantom eliminacije izražava brzina eliminacije, odnosno dužina zadržavanja leka u organizmu, i to prema jednačini (2):

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{\beta} (\text{h}) \quad (2)$$

- Klirens (CL, eng. *clearance*): odnos date doze leka i ukupne površine ispod krive zavisnosti koncentracije od vremena (3), ili: hipotetička zapremina nekog prostora koja se potpuno očisti od nepromenjenog leka u jedinici vremena:

$$\text{CL} = \frac{D}{\text{PIK}} = \beta \times V_d (\text{L h}^{-1}) \quad (3)$$

- Srednje vreme zadržavanja, SVZ (MRT, eng. *mean residence time*): srednje vreme koje lek provede u organizmu od ulaska do eliminacije (Seydel i Wiese, 2002).

2.3. Praćenje stabilnosti leka

Da bi se pratio kvalitet leka i utvrdila bezbednost njegovog korišćenja, potrebno je ispitivanje stabilnosti i određivanje degradacionih proizvoda leka koji mogu nastati pod različitim uticajima. Stabilnost leka je definisana kao njegova sposobnost da u određenom vremenu, čuvan na određeni način, zadrži ista svojstva koja je imao kada je proizveden (FDA, 1998). Terapijska upotreba lekova se bazira na njihovoj efikasnosti i bezbednosti, tako da kvalitet mora biti održan pod različitim uslovima za vreme proizvodnje, pakovanja, transporta, čuvanja i upotrebe. Hemijska i fizička degradacija lekovitih supstanci mogu dovesti do promene efikasnosti leka i različitih toksikoloških

efekata. Tako se lek može razgraditi do toksične supstance, zbog čega nije dovoljno samo pratiti koliko se leka razgradilo, već i koji su degradacioni proizvodi nastali. Kako lekovi imaju različite strukture, oni se mogu razgraditi na različite načine. Neki od mogućih puteva degradacije lekova su hidroliza, dehidratacija, oksidacija, izomerizacija i racemizacija, kao i fotodegradacija. Stabilnost lekova i degradacioni procesi kojima lekovi podležu zavise od specifičnih strukturnih karakteristika koje zavise od prisutnih funkcionalnih grupa. Ako bismo na osnovu svojstava funkcionalnih grupa predvideli hemijsku stabilnost lekova, bilo bi olakšano planiranje studija stabilnosti i formulisanje lekova tako da se smanji degradacija (Yosioka i Stella, 2002). Studije stabilnosti mogu biti: dugoročna (eng. *long term*), srednja (eng. *intermediate*) i ubrzana (eng. *accelerated*) ispitivanja stabilnosti, kao i stres studije, tj. studije forsirane degradacije (ICH Q1A(R2), 2003).

2.3.1. Studije forsirane degradacije

Studije forsirane degradacije se izvode u cilju praćenja stabilnosti aktivne supstance, identifikacije potencijalnih degradacionih proizvoda i mogućih puteva degradacije leka, kao i razvoja i validacije metode za praćenje stabilnosti aktivne farmaceutske supstance ili farmaceutskog doziranog oblika (Alsante *et al.*, 2007). U ovim eksperimentima, uzorci se obično podvrgavaju kiseloj, baznoj i neutralnoj hidrolizi, oksidaciji, kao i termičkoj, foto- i elektrohemijskoj degradaciji. Na ovaj način se može proceniti stabilnost leka tokom određenog vremenskog perioda pod uticajem različitih faktora (Yosioka i Stella, 2002). Identifikovanjem degradacionih proizvoda može se predvideti mogući mehanizam degradacije leka. Uslovi pri kojima je neophodno ispitati stabilnost leka su propisani ICH (eng. *International Conference on Harmonisation*) smernicama (ICH Q1A(R2), 2003; Q1B, 1996). Ove smernice obezbeđuju generalna uputstva prema kojima je potrebno izvoditi eksperimente, a konkretne uslove za ispitivanje stabilnosti određenog leka je potrebno ustanoviti na osnovu njegovih karakteristika (Yosioka i Stella, 2002). Ono što je ICH Q1A(R2) i Q1B smernicama propisano je da studije forsirane degradacije moraju da obuhvate ispitivanje osetljivosti leka na hidrolizu (kiselu, baznu i neutralnu), oksidaciju, toplotu i svetlost. Studije forsirane degradacije se izvode na aktivnim farmaceutskim supstancama (API, eng. *active pharmaceutical*

ingredient) i farmaceutskim doziranim oblicima u čvrstom obliku, rastvoru ili suspenziji. Pregledom literature se mogu pronaći preporučeni i najčešće korišćeni uslovi pod kojima se izvode eksperimenti forsirane degradacije (tabela 1).

Ispitivanja osetljivosti na hidrolizu treba da obuhvate širok opseg pH vrednosti da bi se proverila mogućnost hidrolize u kiseljoj, neutralnoj i baznoj sredini, s obzirom na to da je hidroliza reakcija kojoj lekovi najčešće podležu (Yosioka i Stella, 2002). Za ispitivanja u kiseljoj sredini najčešće se koriste rastvori HCl ili H₂SO₄ u koncentraciji 0,1–1 mol L⁻¹ (WHO, 2005; Alsante *et al.*, 2007; Blessy *et al.*, 2014), dok se za baznu sredinu mogu koristiti NaOH, KOH ili LiOH u istoj koncentraciji (WHO, 2005; Alsante *et al.*, 2007; Blessy *et al.*, 2014). Kako povišena temperatura može da ubrzava reakcije hidrolize, uzorci se mogu grejati izvesno vreme na određenoj temperaturi (Blessy *et al.*, 2014). Prilikom ovih eksperimenata treba voditi računa o izboru rastvarača, jer pojedine alkohole, kao što je metanol, treba izbegavati u kiseljoj sredini zbog njihove reaktivnosti (Alsante *et al.*, 2007). Osetljivost na oksidaciju se može ispitati u atmosferi kiseonika ili u prisustvu peroksida. U slučaju vodonik-peroksida, najčešće se koristi koncentracija u opsegu 3–30% (Alsante *et al.*, 2007; Rao *et al.*, 2011; Kaushik *et al.*, 2016; Runje *et al.*, 2016). Ispitivanja termalne degradacije vrše se izlaganjem leka temperaturi iznad 50 °C (ICH Q1A(R2), 2003). Studije fotostabilnosti je neophodno izvoditi u skladu sa ICH smernicom Q1B prema kojoj je uzorak potrebno izlagati svetlosti, ukupnog zračenja ne manjeg od $1,2 \times 10^6$ lx h i integrisanoj bliskoj ultraljubičastoj energiji ne manjoj od 200 Wh m⁻² (ICH Q1B, 1996).

Elektrohemijska razgradnja lekova se vrši, pre svega, u cilju proučavanja procesa oksidacije i redukcije u različitim medijumima. Studija se izvodi u elektrohemijskoj ćeliji, u elektrolitu na koji se primenjuje određeni potencijal tokom vremena i prati se razgradnja leka i formiranje potencijalnih degradacionih proizvoda. Najčešće se kao elektrolit koriste fosfatni, BR (Britton-Robinson) i acetatni pufer, kao i natrijum-bikarbonat, a od elektroda se najčešće koriste elektroda od staklastog ugljenika, elektroda od zlata i kapljuća živina elektroda (HMDE, eng. *hanging mercury drop electrode*) (Avramov Ivić *et al.*, 2016).

Paralelno sa uzorkom, stres uslovima je potrebno podvrgnuti i slepu probu koja sadrži rastvarač i stres agens. Cilj svakog eksperimenta je da se postigne odgovarajući nivo degradacije aktivne farmaceutske supstance za relativno kratak vremenski period, izlaganjem uzorka ekstremnijim uslovima. Obično je potrebno da se postigne procenat degradacije u opsegu 5–20%. Degradacija manja od 5% otežava identifikaciju primarnih nečistoća, jer su one prisutne u maloj količini, dok veliki procenat degradacije povećava mogućnost stvaranja sekundarnih i tercijarnih degradacionih proizvoda, što otežava interpretaciju rezultata. Vremenski period izlaganja stres agensu zavisi od osetljivosti supstance. Izlaganje treba da traje dok se ne postigne željena degradacija, a ukoliko se supstanca ne razgradi ni nakon ovog perioda smatra se da je lek stabilan prema navedenom stres agensu (Baertschi, 2005; Alsante *et al.*, 2007).

Za praćenje stabilnosti leka u studijama forsirane degradacije koristi se prethodno razvijena analitička metoda. Ovom metodom treba da se kvantifikuje aktivna komponenta, kao i eventualno prisutni degradacioni proizvodi. Najčešće je korišćena metoda tečne hromatografije sa PDA detektorom (eng. *photodiode-array*) (Rao *et al.*, 2011, 2014; Ramesh *et al.*, 2014; Patel *et al.*, 2015; Bhandi *et al.*, 2016; Jafari-Nodoushan *et al.*, 2016; Runje *et al.*, 2016), kojom se mogu hromatografski razdvojiti i detektovati lek i njegovi degradacioni proizvodi. Korišćenjem tečne hromatografije u sprezi sa tandem masenom spektrometrijom (LC–MS/MS), pored hromatografskog razdvajanja i detekcije, omogućava se i pouzdana identifikacija degradacionih proizvoda sa ciljem da se predvide mogući putevi degradacije leka (Rao *et al.*, 2011, 2013, 2014; Ramesh *et al.*, 2014; Patel *et al.*, 2015; Bhandi *et al.*, 2016; Kaushik *et al.*, 2016).

Tabela 1. Literaturni pregled različitih stres uslova u studijama forsirane degradacije lekova

Analit	Kisela hidroliza	Bazna hidroliza	Neutralna hidroliza	Oksidacija	Termička degradacija	Fotodegradacija	Literatura
API	0,1 M HCl	0,1 M NaOH	/	3% H ₂ O ₂	60 °C	Metal halogena, živina, ksenon ili UV-B fluorescentna lampa	WHO, 2005
API	0,1 M HCl, 40 ili 60 °C	0,1 M NaOH, 40 ili 60 °C	H ₂ O, 40 ili 60 °C	3% H ₂ O ₂ , 25 ili 60 °C	60 ili 80 °C	Osvetljenje ≥ 1,2 × 10 ⁶ lx h, UV svetlost ≥ 200 Wh m ⁻²	Blessy <i>et al.</i> , 2014
API	0,1–1 M HCl ili H ₂ SO ₄	0,1–1 M NaOH ili LiOH ili KOH	/	3% H ₂ O ₂	> 50 °C	Osvetljenje ≥ 1,2 × 10 ⁶ lx h, UV svetlost ≥ 200 Wh m ⁻²	Alsante <i>et al.</i> , 2007
Abakavir sulfat	1 M HCl, 80 °C	1 M NaOH, 80 °C	H ₂ O, 80 °C	3% H ₂ O ₂ , 6% H ₂ O ₂ , 1,5 mM AIBN	100 °C	UV svetlost (320 nm)	Rao <i>et al.</i> , 2011
Fingolimod	3 M HCl	0,1 M NaOH	H ₂ O, 80 °C	30% H ₂ O ₂ , sobna t	90 °C	Osvetljenje ≥ 1,2 × 10 ⁶ lx h, UV svetlost ≥ 200 Wh m ⁻²	Patel <i>et al.</i> , 2015
Nepafenak	0,1 M HCl, 25 °C	0,1 M NaOH, 25 °C	/	30% H ₂ O ₂ , 25 °C	80 °C	Osvetljenje ≥ 1,2 × 10 ⁶ lx h, UV svetlost ≥ 200 Wh m ⁻²	Runje <i>et al.</i> , 2016
Zofenopril	1 M HCl, 80 °C	1 M NaOH, 80 °C	H ₂ O, 80 °C	3% H ₂ O ₂ , 6% H ₂ O ₂ , sobna t	100 °C	UV svetlost (320 nm)	Ramesh <i>et al.</i> , 2014
Ezetimib	0,1 M HCl, 80 °C	0,1 M NaOH, sobna t	H ₂ O, 80 °C	3% H ₂ O ₂	80 °C	4500 lx	Luo <i>et al.</i> , 2015
Darunavir	0,5 M HCl, 75 °C	0,1 M NaOH, 75 °C	H ₂ O, 75 °C	3% H ₂ O ₂ , 6% H ₂ O ₂ , sobna t	75 °C	UV svetlost (320 nm)	Rao <i>et al.</i> , 2014
Zolpidem-tartarat	1 M HCl, sobna t	0,1 M NaOH, sobna t	H ₂ O, sobna t	10% H ₂ O ₂ , sobna t	70 °C	Osvetljenje ≥ 1,2 × 10 ⁶ lx h, UV svetlost ≥ 200 Wh m ⁻²	Malešević <i>et al.</i> , 2014
Rabeprazol	0,01 M HCl, sobna t	2 M NaOH, 80 °C	H ₂ O, 80 °C	3% H ₂ O ₂ , sobna t	80 °C	Osvetljenje ≥ 1,2 × 10 ⁶ lx h, UV svetlost ≥ 200 Wh m ⁻²	Bhandi <i>et al.</i> , 2016
Doksofilin	0,1 M HCl, 65 °C	0,1 M NaOH, 65 °C	H ₂ O, 65 °C	3% H ₂ O ₂	65 °C	UV svetlost (254 nm)	Rao <i>et al.</i> , 2013
Azilsartan	0,1 M HCl, 85 °C	0,1 M NaOH, 85 °C	H ₂ O, 85 °C	30% H ₂ O ₂	50 °C	Osvetljenje ≥ 1,2 × 10 ⁶ lx h, UV svetlost ≥ 200 Wh m ⁻²	Kaushik <i>et al.</i> , 2016
Morfīn, naltrekson	0,5 M HCl, 40 °C	0,5 M NaOH, 40 °C	/	3% H ₂ O ₂ , 40 °C	80 °C	UV svetlost (254 nm)	Jafari-Nodoushan <i>et al.</i> , 2016

WHO: Svetska zdravstvena organizacija (eng. *World Health Organization*); AIBN: 2,2'-azobisisobutironitril

2.4. Analitičke metode

Kvalitativne analitičke metode obezbeđuju informacije o atomskim ili molekulskim vrstama ili o prisutnim funkcionalnim grupama, dok kvantitativne analitičke metode daju informacije o relativnoj količini jedne ili više komponenata (Skoog i West, 1980). Izbor analitičke metode zavisi od hemijskih svojstava analita i očekivanih koncentracija. Svaka analitička metoda se uglavnom sastoji od nekoliko stupnjeva kao što su: priprema uzorka, separacija, kvantifikacija i analiza podataka.

2.4.1. Priprema uzoraka biološkog materijala

Priprema uzorka je neophodna da bi se iz matrice, tj. biološkog materijala, izolovale komponente i prečistili i prekoncentrisali analiti. Materije neorganskog porekla, masnoće i druge materije koje se nalaze u uzorcima mogu da utiču na određivanje analita, tako da je neophodno pripremiti uzorak, tj. ukloniti sve komponente koje mogu da utiču na rezultat i ekstrahovati komponente od interesa. Metode pripreme tkiva se mogu svrstati u tri grupe: mehaničke, digestivne i ekstrakcione. Svaka metoda ima prednosti i mane i zato je obično potrebno koristiti njihovu kombinaciju za optimalnu ekstrakciju. Ekstrakcija analita iz biološkog materijala predstavlja ozbiljan izazov za analitičare zbog složenog sastava biološkog uzorka. Priprema uzoraka biološkog materijala je zahtevan i dugotrajan laboratorijski zadatak. Od momenta uzorkovanja, analitičari moraju da obrate pažnju na to kako se uzorak čuva, obrađuje (mehanički ili hemijski), ekstrahuje i analizira (Yu i Cohen, 2004). Način sakupljanja i čuvanja biološkog materijala zavisi od svojstava analita koji se određuje. Uzorci se moraju sakupljati u sudovima od materijala koji neće adsorbovati analite, niti će sadržati supstance rastvorne u biološkom uzorku. Ako se biološki materijal odmah ne ispituje, mora se čuvati na pogodan način. Najbolje je materijal čuvati zamrznut (na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) do ispitivanja. Takođe je bitno da se preparati jetre pripremaju i koriste uvek sveži (Pokrajac, 2001).

Prinos analita i njegova termička stabilnost, količina raspoloživog uzorka, raspoložive tehnike pripreme, zahtevana preciznost i tačnost, vreme i sigurnost operatera su samo

neki od parametara koje analitičari moraju da razmotre pri izboru optimalne metode pripreme uzoraka (Yu i Cohen, 2004). Koja će se metoda pripreme uzorka primeniti zavisi od fizičko-hemijskih svojstava analita (kiselo-baznih svojstava, stabilnosti, isparljivosti, rastvorljivosti u vodi i organskim rastvaračima), prirode uzorka (čistoće, sadržaja masti) i instrumentalne metode analize uzorka. Razvoj novih metoda za pripremu uzoraka je usmeren na brze, jednostavne i jeftine metode koje mogu biti izvedene u malim sistemima gde je potrošnja organskih rastvarača svedena na minimum.

Metode pripreme uzoraka za određivanje tragova analita uglavnom obuhvataju sledeće korake:

- homogenizacija;
- ekstrakcija: analit od interesa se prenosi iz biološkog uzorka u rastvarač koji može biti unet u merni instrument. Pod idealnim uslovima, analit se selektivno ekstrahuje iz biološkog uzorka, a sve nepoželjne komponente zaostaju;
- prečišćavanje: izolovanje analita od interesa od ostalih delova biološkog uzorka koji su koekstrahovani. Većina tehnika prečišćavanja koristi klasično gravitaciono prolaženje ekstrakta kroz kolonu pakovanu sa odgovarajućim adsorbensom (npr. aluminijum-oksidi, silika-gel i razne smole za prečišćavanje);
- prekoncentrisanje: povećanje koncentracije ekstrahovanih analita i, na taj način, poboljšanje ukupne osetljivosti analize.

Korišćenje laboratorijskog blendera je najpraktičniji način za homogenizaciju čvrstih uzoraka biološkog materijala tokom pripreme za kvalitativnu i kvantitativnu analizu (Yu i Cohen, 2004). Nakon homogenizacije uzorka, potrebno je izvršiti ekstrakciju analita odgovarajućim rastvaračem, a upravo je homogenizacijom povećana površina uzajamnog delovanja među fazama. Tokom ekstrakcije dolazi do prelaza analita iz biološkog materijala u rastvarač. Najčešće se za ekstrakciju antibiotika iz biološkog materijala koriste organski rastvarači kao što su metanol (Yamada *et al.*, 2006; Berrada *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2014; Stariat *et al.*, 2014; Montesano *et al.*, 2016) i acetonitril (Arnold *et al.*, 2004; Shao *et al.*, 2005; Yamada *et al.*, 2006; Dickson *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2012; Macarov *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2012; Bousova *et al.*, 2013; Lee *et*

al., 2016), kao i trihlorsirćetna kiselina (TCA, eng. *trichloroacetic acid*) (Cherlet *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2008; Kaufmann *et al.*, 2012; Bousova *et al.*, 2013) (tabela 2). Kako bi se ubrzao proces ekstrakcije i, na taj način, povećala njena efikasnost česta je primena ultrazvučne ekstrakcije koja omogućava veće prodiranje rastvarača u materijal.

Pri pripremi bioloških uzoraka potrebno je posebno posvetiti pažnju deproteinizaciji u cilju poboljšanja ekstrakcije analita iz biološkog materijala, jer može doći do vezivanja antibiotika za proteine plazme i tkiva, pa je potrebno razgraditi kompleks antibiotik-protein (Pokrajac, 2001). Taloženje proteina je uobičajeno u kvantitativnoj bioanalizi, kao veoma brz pristup. U postupku pripreme se prvo dodaje aditiv za taloženje proteina, posle čega je potrebno mešanje i centrifugiranje. Obično se koriste sledeći aditivi: TCA, cink(II)-sulfat, acetonitril, etanol ili metanol (Niessen, 2006; Zhu *et al.*, 2008; Tao *et al.*, 2012). Acetonitril, TCA i cink(II)-sulfat su se pokazali kao najefikasniji u procesu taloženja proteina. Međutim, TCA može znatno da utiče na supresiju jonizacije. U prisustvu TCA, u nekim slučajevima se postiže nizak prinos analita, verovatno zbog toga što se analiti uključuju u taloženje proteina (Niessen, 2006). Dodatni problem prilikom ekstrakcije iz tkiva, kao kompleksne matrice, predstavlja masnoća koja se može ukloniti upotrebom heksana (Kaufmann *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2012).

Za prečišćavanje ekstrakta uzoraka biološkog materijala obično se koristi tečno-čvrsta ekstrakcija. Kod tečno-čvrste ekstrakcije analit se raspodeljuje između tečnog uzorka i čvrstog adsorbensa. Jedna od najčešće korišćenih tečno-čvrstih ekstrakcija je ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE, eng. *solid-phase extraction*).

Tabela 2. Pregled primene korišćenih rastvarača za ekstrakciju i analitičkih metoda za određivanje različitih antibiotika u biološkim uzorcima

Analit	Biološki materijal	Rastvarač za ekstrakciju	Analitička metoda	Literatura
Dokсорubicin	Plazma, srce, bubrezi, jetra, slezina, mozak	35% perhlorna kiselina	LC-FLD	Urva <i>et al.</i> , 2009
Etambutol	Plazma	Metanol	LC-UV	Singh <i>et al.</i> , 2014
Dokсорubicin	Plazma, srce, jetra, slezina, mozak	5 mM amonijum-acetat i acetonitril	LC-ESI-MS	Arnold <i>et al.</i> , 2004
Tiosemikarbazoni	Plazma	Metanol	LC-ESI-MS	Stariat <i>et al.</i> , 2014
Aminoglikozidi	Mišići, bubrezi, jetra	5% TCA	LC-ESI-MS	Zhu <i>et al.</i> , 2008
Tetraciklini	Mišići, bubrezi, jetra	0,1 M sukćinska kiselina i 20% TCA	LC-ESI-MS	Cherlet <i>et al.</i> , 2003
Penicilini	Mišići	Voda i acetonitril	LC-TIS-MS	Macarov <i>et al.</i> , 2012
Aminoglikozidi, makrolidi	Mišići	Metanol	LC-ESI-MS	Berrada <i>et al.</i> , 2010
Aminoglikozidi	Mišići, bubrezi, jetra	5% TCA	LC-ESI-MS	Kaufmann <i>et al.</i> , 2012
Makrolidi	Bubrezi	Acetonitril i 0,3 M fosfatni pufer	LC-ESI-MS	Dickson <i>et al.</i> , 2012
Sulfonamidi	Mišići, bubrezi, jetra	Acetonitril i heksan	LC-ESI-MS	Shao <i>et al.</i> , 2005
Aminoglikozidi, makrolidi, linkozamidi, sulfonamidi, tetraciklini, hinoloni	Mišići	Acetonitril i 2% TCA	LC-ESI-MS	Bousova <i>et al.</i> , 2013
Veterinarski antibiotici	Mišići	Acetonitril, metanol i heksan	LC-ESI-MS	Yamada <i>et al.</i> , 2006
Sulfanilamidi, nitroimidazoli, hinoloni, makrolidi, linkozamidi, prazikvantel	Mišići	Acetonitril	LC-TIS-MS	Xie <i>et al.</i> , 2012
Tulatromicin	Plazma	Acetonitril	LC-ESI-MS	Huang <i>et al.</i> , 2012
Marbofloksacin	Plazma	Metanol	LC-API-MS	Montesano <i>et al.</i> , 2016
Levofloksacin, moksifloksacin	Serum	Acetonitril	LC-ESI-MS	Lee <i>et al.</i> , 2016

FLD: fluorescentni detektor (eng. *fluorescence detector*); UV: ultraljubičasto (eng. *ultraviolet*); ESI: elektrosprej jonizacija (eng. *electrospray ionization*); TIS: turbosprej (eng. *turbo ionspray*); API: jonizacija na atmosferskom pritisku (eng. *atmospheric pressure ionization*)

2.4.1.1. Metoda ekstrakcije na čvrstoj fazi

Ekstrakcija na čvrstoj fazi podrazumeva dovođenje tečnog uzorka u kontakt sa čvrstom fazom ili adsorbensom pri čemu se analit selektivno adsorbuje na površinu čvrste faze. Pažljivim odabirom adsorbensa analit se može selektivno zadržati u odnosu na druge komponente prisutne u uzorku.

Glavni razlozi za upotrebu metode ekstrakcije na čvrstoj fazi su (Dean, 2003):

- prekoncentrisanje analita od interesa (iz relativno velike zapremine uzorka u malu zapreminu ekstrakta) i
- prečišćavanje ekstrakta koji ne sadrži nepoželjne čestice iz biološkog uzorka.

Nakon izbora odgovarajuće SPE kolone, procedura najčešće podrazumeva četiri koraka (slika 3) (Niessen, 2006):

1. kondicioniranje adsorbensa (propuštanje male zapremine odgovarajućeg rastvarača radi pripreme adsorbensa za adsorpciju analita);
2. nanošenje tečnog uzorka na SPE kolonu (propuštanje uzorka kroz kolonu, pri čemu se analit adsorbuje na adsorbens);
3. ispiranje SPE kolone (propuštanje minimalne zapremine odgovarajućeg rastvarača kroz kolonu radi uklanjanja nečistoća iz uzorka koje su se zadržale na adsorbensu) i po potrebi sušenje kolone;
4. eluiranje analita (propuštanje odgovarajućeg rastvarača u kojem se analit dobro rastvara i desorpcija analita sa kolone).



Slika 3. Prikaz ekstrakcije na čvrstoj fazi

Za ekstrakciju na čvrstoj fazi se obično koriste špricevi ili kertridži (polipropilenski, stakleni ili politetrafluoroetilenski). Odgovarajući adsorbens, mase od 50 mg do 10 g, se postavlja između dve frite, obično teflonske ili polietilenske, veličine pora 20 µm. Protok rastvarača kroz kertridž se ostvaruje pomoću vakuuma, pri čemu se obično koristi komercijalno dostupan vakuum manifold za istovremenu analizu većeg broja uzoraka (Dean, 2003).

Najčešće se kao SPE adsorbensi koriste pakovanja na bazi silika-gela ili hemijski modifikovanog silika-gela, npr. C₁₈ ili C₈ materijal, gde se zadržavanje analita zasniva na hidrofobnim interakcijama, ali su dostupni i materijali na bazi etilbenzena, divinilbenzena i kopolimera stirena i divinilbenzena. Sve popularniji postaju mešoviti adsorbensi kao što je Oasis HLB (eng. *hydrophilic-lipophilic balance*), kopolimer divinilbenzena i *N*-vinilpirolidona (Waters, Milford, SAD). Hidrofilna svojstva su posledica prisustva *N*-vinilpirolidona, a lipofilna svojstva potiču od divinilbenzena. Upotreba kertridža sa uravnoteženim hidrofilnim i lipofilnim karakteristikama omogućava ekstrakciju kiselih, neutralnih i baznih analita u širokom opsegu pH vrednosti (Niessen, 2006).

Izbor adsorbensa za SPE jako zavisi od analita od interesa i sistema rastvarača koji će se koristiti za ekstrakciju. Na efikasnost SPE može da utiče i broj aktivnih mesta dostupnih na adsorbensu koji ne može biti manji od broja molekula analita, jer u suprotnom dolazi do „proboja”. Zato je bitno proceniti kapacitet SPE kertridža za određenu namenu, kao i brzinu protoka uzorka kroz adsorbens, jer previše brz protok ne obezbeđuje dovoljno vremena za kontakt između analita i adsorbensa. Takođe je bitno da se optimizuje zapremina izabranog rastvarača za eluiranje (Dean, 2003). Potrebno je utvrditi i odgovarajuću pH vrednost uzorka koji se nanosi na adsorbens. Podešavanje pH vrednosti vrši se kako bi se pojačalo zadržavanje antibiotika na kertidžu za prečišćavanje. Obično se kod analize antibiotika u biološkim uzorcima pH podešava na vrednost od 4,5 do 9 (Koesukwiwat *et al.*, 2007; McGlinchey *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2008; Macarov *et al.*, 2012).

Tabela 3. Pregled primene korišćenih kolona za ekstrakciju na čvrstoj fazi i i analitičkih metoda za određivanje različitih antibiotika u biološkim uzorcima

Analit	Biološki materijal	SPE kertridži	Analitička metoda	Literatura
Aminoglikozidi	Mišići, jetra, bubrezi	Oasis HLB	LC-ESI-MS	Zhu <i>et al.</i> , 2008
Makrolidi, β -laktami, linkozamidi, hinon	Mišići	Oasis HLB	LC-ESI-MS	Tang <i>et al.</i> , 2012
Makrolidi	Mišići, jetra, bubrezi	Oasis HLB	LC-ESI-MS	Dubois <i>et al.</i> , 2001
Tetraciklini	Mišići, jetra, bubrezi	Oasis HLB	LC-ESI-MS	Cherlet <i>et al.</i> , 2003
Kolistin	Plazma	Oasis HLB	LC-ESI-MS	Ma <i>et al.</i> , 2008
Aminoglikozidi	Mišići, jetra, bubrezi	Oasis HLB	LC-ESI-MS	Zhu <i>et al.</i> , 2016
Veterinarski lekovi	Mišići, jetra	Oasis HLB	LC-ESI-MS	Chen <i>et al.</i> , 2016
Amoksicilin	Mišići, jetra	Oasis HLB	LC-ESI-MS	Freitas <i>et al.</i> , 2012
Pramipeksol	Plazma, jetra, bubrezi, slezina, mozak	Strata X	LC-ESI-MS	Guo <i>et al.</i> , 2015
Hinoloni	Plazma	Strata X	LC-ESI-MS	Garcés <i>et al.</i> , 2006
Fluoksetin i olazapin	Plazma	Strata X	LC-ESI-MS	Gopinath <i>et al.</i> , 2011
Kortikosteroidi	Mišići, jetra, bubrezi	Strata XL	LC-ESI-MS	Tölgyesi <i>et al.</i> , 2012
Aminoglikozidi	Mišići, jetra, bubrezi	Oasis MCX	LC-ESI-MS	Kaufmann <i>et al.</i> , 2012
Hloramfenikol, florfenikol, florfenikol amin, tiamfenikol	Jetra	Oasis MCX	LC-ESI-MS	Fedeniuk <i>et al.</i> , 2015
Aminoglikozidi	Bubrezi	WCX Accell Plus CM	LC-ESI-MS	Kumar <i>et al.</i> , 2012
Aminoglikozidi	Mišići	Oasis WCX	LC-ESI-MS	Plozza <i>et al.</i> , 2011
Aminoglikozidi	Mišići, jetra, bubrezi	WCX CBA Bond Elute	LC-ESI-MS	Tao <i>et al.</i> , 2012
Veterinarski lekovi	Mišići	Superclean C ₁₈	LC-TIS-MS	Xie <i>et al.</i> , 2012
Makrolidi	Bubrezi	Bond Elut C ₁₈	LC-ESI-MS	Dickson <i>et al.</i> , 2012
Cefaleksin	Plazma	Sep-Pak C ₁₈	LC-UV	Davis <i>et al.</i> , 2005
Penicilini	Mišići	ENV + Isolute	LC-TIS-MS	Macarov <i>et al.</i> , 2012

Kao što je u tabeli 3 prikazano, za analizu tragova antibiotika prilikom pripreme bioloških uzoraka najčešće se koriste Oasis HLB, Strata X (Phenomenex, Torrance, SAD), Oasis MCX (Waters, Milford, SAD), razni WCX i C₁₈ kertridži. Strata X polimerni kertridži, koji predstavljaju kombinaciju modifikovanih stiren-divinilbenzena i *N*-vinilpirolidona, mogu da se koriste za ekstrakciju kiselih, baznih i neutralnih jedinjenja u širokom opsegu pH vrednosti (Phenomenex, 2017a; Phenomenex, 2017b). Takođe se za pripremu bioloških uzoraka koriste i kertridži sa jonoizmenjivačkim

adsorbensima, posebno katjonski izmenjivači kao što su MCX (eng. *mixed-mode cation exchange*) i WCX (eng. *weak cation exchange*) kertridži. Oasis MCX kertridži sadrže reverzno-fazno i jonoizmenjivačko pakovanje tako da predstavljaju mešovite adsorbense, koji imaju mogućnost ekstrakcije baznih komponenata (Waters, 2017a), dok WCX kertridži imaju mogućnost ekstrakcije jakih baza i kvaternernih amina (Waters, 2017b). C₁₈ kertridži se najčešće koriste za ekstrakciju nepolarnih analita (Agilent, 2017; Sigma Aldrich, 2017b; Waters, 2017c).

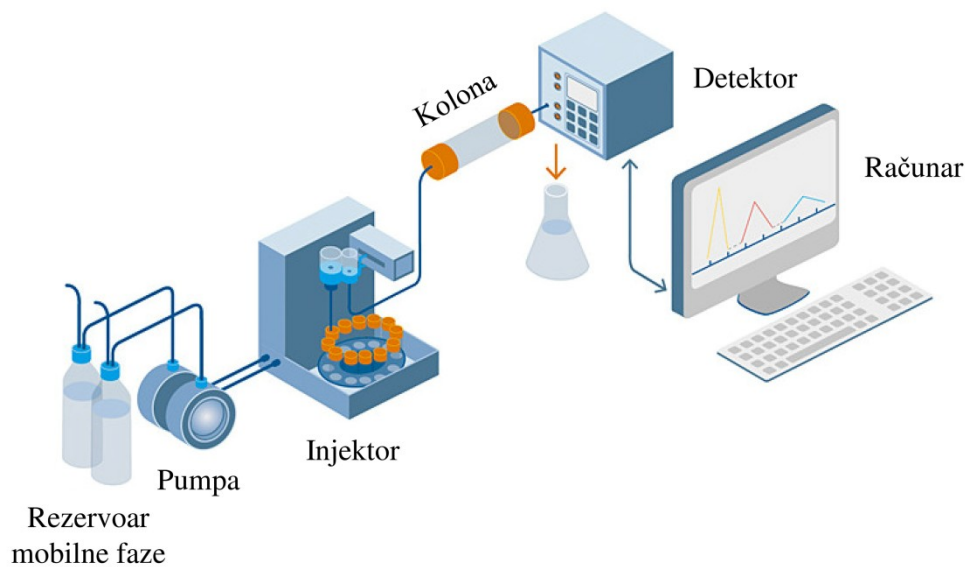
2.4.2. Tečna hromatografija visokih performansi

Najčešća analitička metoda koja se koristi za određivanje antibiotika iz bioloških materijala, prilikom određivanja zavisnosti koncentracije leka od vremena provedenog u biološkoj matrici i proračunavanja farmakokinetičkih parametara, kao i za analizu uzoraka dobijenih u eksperimentima forsirane degradacije lekova je tečna hromatografija. Ova metoda je pogodna za određivanje polarnih, termonestabilnih i neisparljivih jedinjenja. Značajna je i upotreba tečne hromatografije visokih performansi (HPLC, eng. *high performance liquid chromatography*) u sprezi sa tandem masenom spektrometrijom (MS/MS, eng. *tandem mass spectrometry*) kao osetljivom i selektivnom detekcionom metodom. HPLC–MS/MS ili samo LC–MS/MS metoda je posebno rasprostranjena u analizi antibiotika u biološkim uzorcima (tabele 2 i 3).

Do hromatografskog razdvajanja dolazi kada komponente u smeši interaguju na različit način sa mobilnom (pokretnom) i stacionarnom (nepokretnom) fazom, pa im je potrebno različito vreme da pređu put od mesta ulaza uzorka u sistem do mesta gde se detektuju (Ardrey, 2003). Međusobne interakcije između komponenata uzorka i mobilne faze, kao i stacionarne faze, određuju stepen migracije i separacije analita. Molekuli koji formiraju jače veze sa stacionarnom fazom nego sa mobilnom, sporije se eluiraju sa kolone i samim tim imaju veća retenciona vremena, dok molekuli koji formiraju jače veze sa mobilnom fazom imaju kraća retenciona vremena.

Osnovne komponente HPLC uređaja (slika 4) su (Ardrey, 2003):

- rezervoar mobilne faze;
- sistem za uvođenje uzorka (najčešće se koristi injektor sa petljom, kojim se tečni uzorak uvodi u tok mobilne faze);
- pumpa (ima zadatak da obezbedi konstantan protok mobilne faze između $10 \mu\text{L min}^{-1}$ i 2 mL min^{-1} u zavisnosti od korišćene kolone);
- stacionarna faza (kolona);
- detektor i
- sistem za snimanje i obradu podataka.



Slika 4. Prikaz HPLC sistema

Na osnovu prirode interakcija između komponenata uzorka i stacionarne faze razlikuje se više tipova hromatografije. Za analizu lekova najčešće se koristi hromatografija sa reverznom fazom, gde je mobilna faza polarnija od stacionarne faze, tako da se sa kolone brže eluiraju polarniji od manje polarnih analita (Ardrey, 2003).

2.4.2.1. Stacionarna faza

Svojstva koja stacionarna faza mora da poseduje su: nerastvorljivost u mobilnoj fazi, stabilnost na promene pritiska, temperature i pH, kao i što uniformnija raspodela čestica, do 10% odstupanja od srednje vrednosti (Ardrey, 2003). Stacionarna faza se pakuje u kolone. HPLC kolone su najčešće dužine 100–300 mm sa unutrašnjim prečnikom od 3–4,6 mm. Hromatografska kolona je izrađena od nerđajućeg čelika i ispunjena finim, hemijski modifikovanim silikatnim česticama (Niessen, 2006). Pakovanje hromatografske kolone se sastoji od čestica veoma malih dimenzija ujednačene veličine (3–10 µm), čime se obezbeđuje velika kontaktna površina, a time i visoki stepen razdvajanja analita (Pryde i Gilbert, 1979).

2.4.2.2. Mobilna faza

Kod tečne hromatografije analit mora da bude rastvoran u mobilnoj fazi. Da bi se rastvarači mogli koristiti kao mobilna faza, moraju da poseduju sledeća svojstva: visok stepen čistoće, dobra rastvorljivost analita, kompatibilnost sa detektorom, mala viskoznost, hemijska inertnost i prihvatljiva cena. Kako nije uvek moguće da se postigne odgovarajuća separacija korišćenjem mobilne faze koju čini jedan rastvarač, obično se koriste smeše rastvarača, a efikasnost hromatografskog razdvajanja zavisi od interakcija analita sa mobilnom i stacionarnom fazom (Rouessac i Rouessac, 2007). Separacija u kojoj je sastav mobilne faze konstantnog sastava (nezavisno od broja komponenata koje sadrži) naziva se izokratsko eluiranje, dok se ona kod koje se menja sastav mobilne faze naziva gradijentno eluiranje. U reverzno-faznoj hromatografiji mobilna faza se najčešće sastoji od vode i organskog rastvarača (npr. metanol, acetonitril). Kod HPLC metode mobilna faza je pod visokim pritiskom (do oko 400 bara ili 4×10^7 Pa), da bi se ostvario neprekidan protok mobilne faze i reproduktivna hromatografija. Pri tom se mora obratiti pažnja na degasiranje, tj. na uklanjanje mehurića vazduha iz mobilne faze koji bi doveli do ometanja rada instrumenta (Ardrey, 2003).

2.4.2.3. Detektori

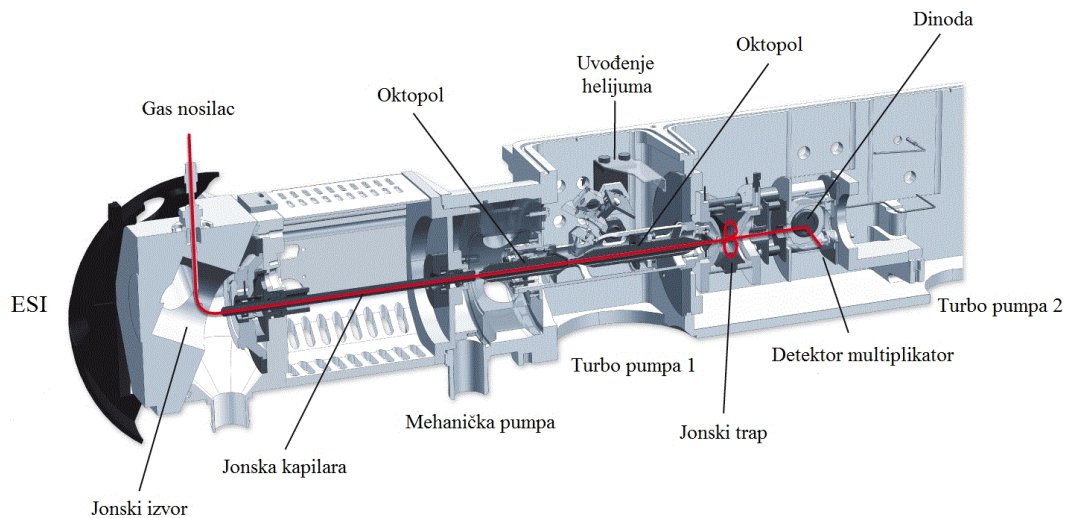
Izbor detektora je obično ključni korak za uspešnu hromatografsku analizu. Koriste se različiti detektori: ultraljubičasti (UV, eng. *ultraviolet*), fluorescentni, elektrohemijski, refrakcioni i maseni, i svaki od njih ima prednosti i nedostatke. Prednost masenog spektrometra kao detektora je što može da razdvaja komponente sličnih retencionih karakteristika ili može da vrši identifikaciju i/ili kvantifikaciju komponenata koje su samo delimično razdvojene hromatografski ili čak koje su potpuno nerazdvojene. Na ovaj način se može skratiti vreme potrebno za razvoj metode. Detektor koji se najčešće koristi u tečnoj hromatografiji i onaj koji, posle masenog spektrometra, daje najbolji uvid u identifikaciju analita, je UV detektor, mada UV spektri retko omogućavaju nedvosmislenu identifikaciju. UV detektor omogućava identifikaciju grupe komponenata i zajedno sa retencionim karakteristikama analita obezbeđuje uvid u identitet analita. Ipak, primenom UV detektora se ne može postići identifikacija sa potpunom sigurnošću (Ardrey, 2003).

2.4.3. Masena spektrometrija

Identifikacija jedinjenja pomoću hromatografije se zasniva na poređenju retencionih vremena nepoznatih sastojaka i standardnih supstanci pod istim eksperimentalnim uslovima. Ipak, identična retencionna vremena nisu siguran pokazatelj da je u pitanju isto jedinjenje. Međutim, kako su maseni spektri većine supstanci dovoljno specifični da omoguće njihovu identifikaciju sa velikom sigurnošću, kombinovanjem separacionih mogućnosti hromatografije sa identifikacionim mogućnostima masenog spektrometra omogućeno je razlikovanje supstanci sa istim ili sličnim retencionim vremenima na osnovu njihovih različitih masenih spektara (Ardrey, 2003). Masena spektrometrija je pogodna zbog svoje osetljivosti, brzine analize, mogućnosti automatizacije i kompatibilnosti sa metodom kao što je HPLC (Pokrajac, 2001).

Masena spektrometrija je analitička metoda kojom se razdvajaju naelektrisane čestice prema odnosu mase i naelektrisanja (m/z). Osnovne komponente masenog spektrometra su (slika 5):

- sistem za unos uzorka koji se analizira,
- jonski izvor (vrši jonizaciju uzorka),
- jedan ili više masenih analizatora (razvrstavanje jona prema odnosu mase i naelektrisanja),
- detektor (registracija jona koji dolaze iz analizatora),
- vakuum (sprečava da se joni na svom putu od jonskog izvora do detektora sudaraju) i
- sistem za obradu podataka (daje maseni spektar, koga čini skup pikova pri čemu svaki odgovara jednoj jonskoj vrsti, kao krajnji rezultat analize).



Slika 5. Prikaz masenog spektrometra

Maseni spektrometar vrši sledeće procese (de Hoffman i Stroobant, 2007):

- formiranje jona iz uzorka u jonskom izvoru,
- razdvajanje jona u masenom analizatoru u zavisnosti od vrednosti odnosa m/z ,
- fragmentacija odabranih jona i analiziranje fragmenata,
- detektovanje nastalih jona i merenje količine detektorom koji jone konvertuje u električni signal i
- obrada rezultata.

2.4.3.1. Tehnike jonizacije

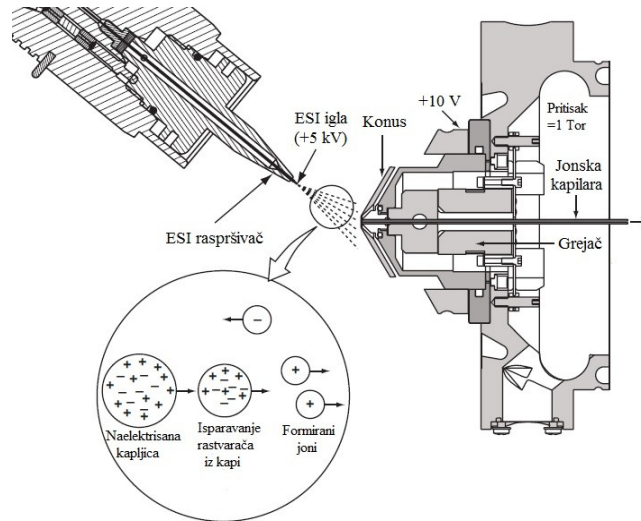
U masenoj spektrometriji se koriste različite jonizacione tehnike. Neke tehnike jonizacije su vrlo energične i izazivaju obimnu fragmentaciju. Druge tehnike su mekše i

izazivaju samo jonizaciju molekulskih vrsta. Neke od jonizacionih tehnika koje se koriste su: jonizacija elektronskim udarom (EI, eng. *electron impact ionization*), termosprej jonizacija (TS, eng. *thermospray ionization*), hemijska jonizacija (CI, eng. *chemical ionization*), hemijska jonizacija na atmosferskom pritisku (APCI, eng. *atmospheric pressure chemical ionization*), elektrosprej jonizacija (ESI, eng. *electrospray ionization*), MALDI (eng. *matrix-assisted laser desorption/ionization*), itd. Tehnike elektronske jonizacije i hemijske jonizacije mogu da se koriste samo u slučaju kada su analiti u gasovitom stanju. Termosprej, elektrosprej i hemijska jonizacija na atmosferskom pritisku su pogodne za jonizaciju neisparljivih i termonestabilnih jedinjenja (Ardrey, 2003).

Elektrosprej jonizacija je najčešće korišćena tehnika jonizacije prilikom LC-MS analize tragova antibiotika u tkivima i biološkim tečnostima (tabele 2 i 3), kao i prilikom analiziranja uzoraka nastalih u eksperimentima forsirane degradacije antibiotika (Rao *et al.*, 2011, 2013, 2014; Ramesh *et al.*, 2014; Patel *et al.*, 2015; Bhandi *et al.*, 2016; Kaushik *et al.*, 2016). ESI se najčešće koristi za analizu polarnih analita, ali i u analizi manje polarnih jedinjenja.

Elektrosprej jonizacija (slika 6) se odvija u četiri koraka: formiranje kapi iz tečnog uzorka, naelektrisanje kapi, desolvacija kapi i formiranje jona analita. Za razliku od većine drugih jonizacionih tehnika koje se koriste u masenoj spektrometriji, ESI se odvija na atmosferskom pritisku. Princip rada ESI tehnike se zasniva na propuštanju tečnog uzorka, u kome je rastvoren analit, kroz čeličnu kapilaru na čiji se vrh primenjuje visok napon (3–4 kV). Pod uticajem visokog napona, dolazi do preraspodele naelektrisanja u uzorku tako da se na vrhu kapilare formira tzv. Tejlorova kupa. Kada na vrhu Tejlorove kupe pozitivno naelektrisanje prevaziđe površinski napon, tečnost se raspršuje formirajući sprej naelektrisanih kapi. Formirane kapi podležu desolvaciji u izvoru masenog spektrometra na atmosferskom pritisku. Usled isparavanja rastvarača dolazi do smanjivanja kapi. U momentu kada površinski napon ne može da izdrži nagomilano naelektrisanje dolazi do eksplozije kapi, pri čemu se formiraju manje kapljice. Zatim se ponavlja niz takvih eksplozija sve dok se ne formiraju joni oslobođeni od rastvarača. Joni dobijeni na ovaj način se prenose dalje u maseni

spektrometar. Ovom tehnikom dobijaju se protonovani ili deprotonovani molekuli ($[M+H]^+$, odnosno $[M-H]^-$), u zavisnosti od električnog polja. Elektrosprej jonizacionom tehnikom se često formiraju i višestruko naelektrisani joni ($[M+nH]^{n+}$) (Pramanik *et al.*, 2002; Ardrey, 2003; de Hoffman i Stroobant, 2007).



Slika 6. Prikaz elektrosprej jonizacije

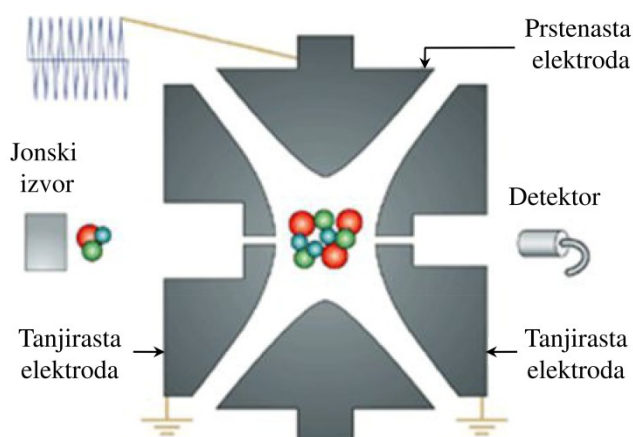
2.4.3.2. Maseni analizator

Maseni analizatori koriste statičko, dinamičko, električno ili magnetno polje, ili njihovu kombinaciju da razdvoji jone na osnovu odnosa m/z . Osnovne karakteristike performansi masenog analizatora su granični opseg merenja masa, brzina analize, transmisija, tačnost i rezolucija. U masenoj spektrometriji se koriste različiti analizatori: trostruki kvadrupol, jonski trap, analizator vremena preleta jona (TOF, eng. *time of flight*), kao i njihove kombinacije (de Hoffman i Stroobant, 2007).

2.4.3.2.1. Jonski trap

Jonski trap je uređaj koji koristi oscilirajuće električno polje za skladištenje jona. Jonski trap koristi radiofrekventno (RF) kvadrupolno polje koje čuva jone u tri ili dve dimenzije. Tako se jonski trapovi mogu podeliti na 3D jonski trap i 2D jonski trap.

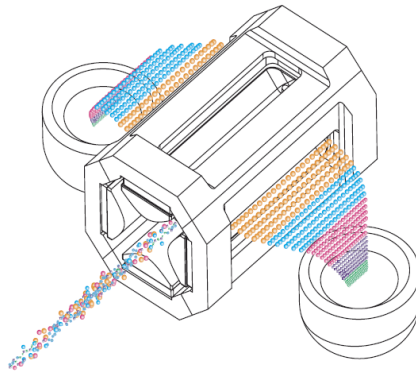
3D (Polov) jonski trap se sastoji od prstenaste elektrode, na koju se primenjuje RF napon, i dve tanjiraste elektrode (slika 7). Na tanjirastim elektrodama se nalaze otvori za uvođenje jona u trap i za izbacivanje jona iz trapa do detektora. U LC–MS sistemima, joni se formiraju u eksternom jonskom izvoru, odakle se usmeravaju kroz skimer i dva oktopola do analizatora. Izvor je pod atmosferskim pritiskom, dok u analizatoru vlada vakuum. Joni uvedeni u trap se skladište primenom odgovarajućeg RF napona na prstenastu elektrodu i analiziraju u zavisnosti od njihove mase. Joni u centralnom delu trapa imaju ograničeno kretanje u aksijalnom pravcu, međutim u radijalnom pravcu oni bivaju ubrzani prema tanjirastim elektrodama i nisu zadržani. Gas helijum je prisutan u trapu kako bi jone držao u stabilnim putanjama. Postupak se završava podešavanjem RF napona tako da se joni iz trapa izbacuju prema redosledu koji odgovara odnosu m/z (Niessen, 2006; de Hoffman i Stroobant, 2007). Glavni nedostatak 3D masenog analizatora je ograničen dinamički opseg usled ograničenog broja jona koji mogu biti prisutni u trapu.



Slika 7. 3D jonski trap

2D (linearni) jonski trap (LIT, eng. *linear ion trap*) je analizator koji se sastoji od dva para elektroda (slika 8) na čijim krajevima se nalaze sočiva koja usmeravaju jone ka unutrašnjosti trapa. U centralnom delu dve naspramno postavljene elektrode se nalaze prorezi za izlaz jona iz trapa. Naspramno postavljene elektrode su podeljene u tri segmenta. U trapu su joni u radijalnom pravcu zarobljeni kvadrupolnim poljem, a u aksijalnom pravcu statičkim električnim poljem. Da bi LIT funkcionisao kao maseni spektrometar, na elektrode je potrebno primenjivati tri različita jednosmerna napona na

različite segmente trapa (0 do ± 100 V). U trap se uvodi inertni gas (helijum) da bi se smanjila kinetička energija jona i obezbedile stabilne putanje. Povećanjem RF napona joni se izbacuju iz trapa kroz proreze na elektrodama prema odnosu m/z . Joni se iz trapa mogu selektivno izbacivati primenom odgovarajućeg jednosmernog napona duž ose (aksijalno izbacivanje) ili normalno na osu (radijalno izbacivanje) (Niessen, 2006; de Hoffman i Stroobant, 2007).



Slika 8. Linearni jonski trap

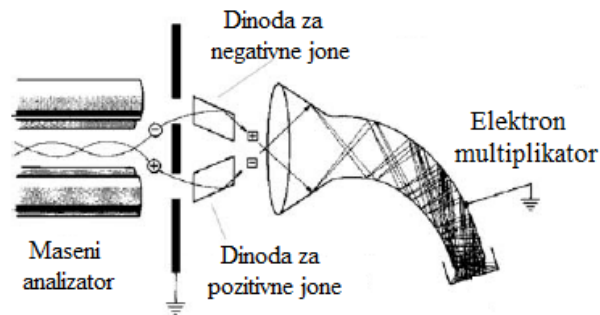
Velika prednost LIT analizatora u odnosu na Polov jonski trap je više od 10 puta veći kapacitet skladištenja jona. Veći kapacitet skladištenja dolazi od veće zapremine trapa i toga što se joni ne skladište samo u jednoj tački u centru trapa, već po centralnoj liniji trapa. Druga prednost 2D u odnosu na 3D jonski trap je veća efikasnost zadržavanja jona. Kod 2D trapa efikasnost zadržavanja unetih jona je 50%, dok je kod 3D trapa 5%. Obe ove prednosti povećavaju osetljivost i dinamički opseg 2D jonskog trapa (Niessen, 2006; de Hoffman i Stroobant, 2007).

2.4.3.3. Detektori

Detektor može da proizvede električni signal nasumičnog jona koji je proporcionalan njegovoj količini. Izbor detektora zavisi od dizajna instrumenta i analitičke primene za koju će se koristiti. Detekcija jona se zasniva na naelektrisanju, masi ili brzini jona.

Najčešće korišćen detektor u masenoj spektrometriji je elektron multiplikator (EM, eng. *electron multiplier*). U ovom detektoru se joni iz analizatora ubrzavaju do velikih brzina kako bi se povećala efikasnost detekcije. Ovo se postiže upotrebom elektrode pri

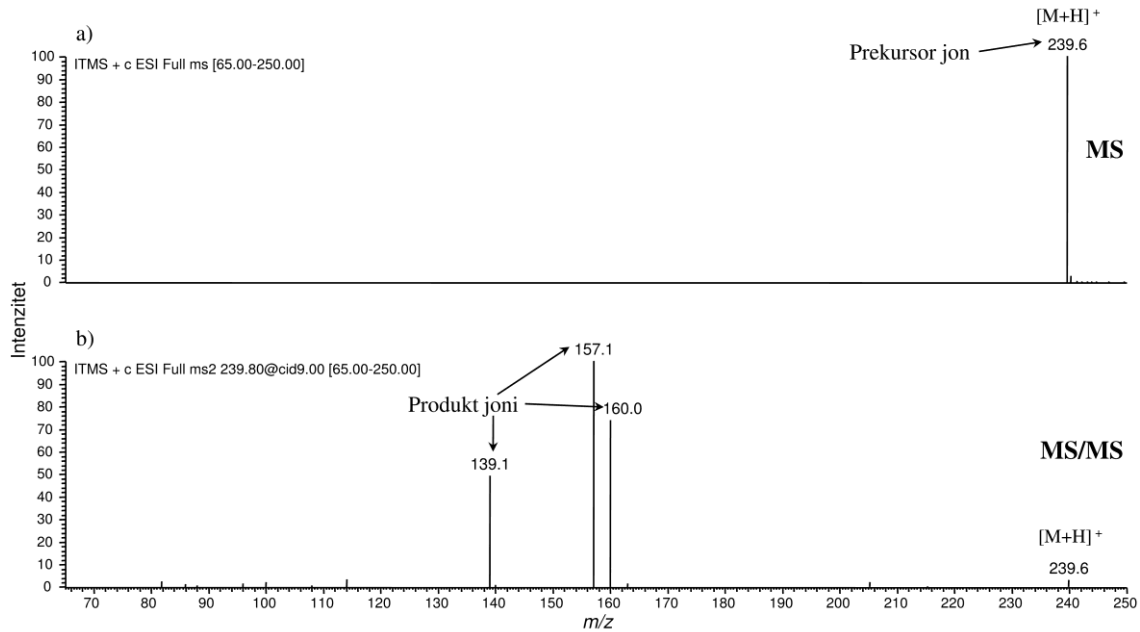
velikom potencijalu (od ± 3 do ± 30 kV) na izlazu jona iz masenog analizatora. Pozitivni ili negativni joni udaraju u elektrodu i dolazi do emisije nekoliko sekundarnih čestica, koje mogu da budu pozitivni ili negativni joni, elektroni i neutralne čestice. Kada negativni joni udare u elektrodu nastaju sekundarni joni. Sekundarni joni se prevode u elektrone na prvoj dinodi. Oni se zatim pojačavaju kaskadnim efektom u elektron multiplikatoru kako bi se proizvela struja (slika 9) (de Hoffman i Stroobant, 2007). Grafički prikaz odziva masenog detektora u toku vremena predstavlja maseni hromatogram.



Slika 9. Elektron multiplikator

2.4.4. Tandem masena spektrometrija

Tandem masena spektrometrija (MS/MS) omogućava identifikaciju i kvantifikaciju analita koji imaju istu molekulsku masu, ali različite produkt (fragmentne) jone, kao i onih jedinjenja koja nisu potpuno hromatografski razdvojena. Ipak, određeni stepen razdvajanja je potreban radi smanjenja uticaja matrice i poboljšanja odnosa signala i šuma, čime se postiže povećanje signala analita (de Hoffman i Stroobant, 2007). Prvo se izoluje prekursor jon određenog odnosa m/z (slika 10a), koji zatim podleže fragmentaciji pomoću helijuma i primenom RF napona koji im povećava energiju, pri čemu dolazi do formiranja produkt jona i neutralnog fragmenta (slika 10b). Poslednji korak je analiziranje nastalih produkt jona. Može se povećati broj stupnjeva masene analize tako što se jon ponovo fragmentiše, tako da se izvode MS^n eksperimenti, pri čemu n predstavlja broj generacija jona koji se analiziraju.



Slika 10. Maseni spektri molekuskog jona i fragmentnih jona gentamicina

Tandem masena analiza može se vršiti u vremenu (eksperimenti se izvode u istom prostoru, ali u različito vreme) i u prostoru (dva masena spektrometra su vezana serijski i eksperimenti se simultano izvode, ali su prostorno razdvojeni) (Niessen 2006).

2.4.4.1. Načini skeniranja u tandem masenoj spektrometriji

Četiri osnovna načina skeniranja koja se koriste u tandem masenoj spektrometriji su (Ardrey, 2003; de Hoffman i Stroobant, 2007):

1. Skeniranje produkt jona: sastoji se od odabira prekursor jona određene vrednosti m/z i određivanja svih produkt jona koji nastaju fragmentacijom;
2. Skeniranje prekursor jona: sastoji se od odabira produkt jona i određivanja prekursor jona. Na ovaj način se detektuju svi prekursor joni koji daju produkt jone odabrane mase;
3. Skeniranje neutralnog gubitka: služi za detekciju prekursor jona koji daju isti neutralni fragment;
4. Praćenje odabrane reakcije (SRM, eng. *selected reaction monitoring*): sastoji se od odabira reakcija fragmentacije. Ovde se prati fragmentacija odabranog prekursor jona u odabrani produkt jon.

2.4.5. Validacija metode

Da bi se pokazalo da odabrana metoda odgovara nameni, potrebno je izvršiti validaciju analitičke metode. Validacija analitičke metode koja se koristi za analiziranje lekova u uzorcima biološkog porekla (krv, serum, plazma, urin, tkivo, koža, itd.), tj. bioanalitičke metode, vrši se prema preporukama pravilnika Agencije za hranu i lekove (FDA, eng. *Food and Drug Administration*) SAD-a (FDA, 2001). Prilikom validacije potrebno je odrediti selektivnost, tačnost, preciznost, prinos i osetljivost predložene analitičke metode, kao i stabilnost analita. Za analizu lekova u biološkim uzorcima se koriste kalibracioni i kontrolni (QC, eng. *quality control*) uzorci.

Traženi validacioni parametri za bioanalitičku metodu se prema FDA pravilniku definišu na sledeći način:

- Selektivnost analitičke metode predstavlja mogućnost metode da identifikuje i kvantitativno odredi traženi analit u prisustvu drugih komponenata u uzorku. Da bi se odredila selektivnost metode potrebno je porediti hromatograme slepe probe, standarda i uzorka pri koncentraciji koja odgovara donjoj granici kvantifikacije (LLOQ, eng. *lower limit of quantification*), kako bi se utvrdilo da ne postoje interferentni pikovi na retencionom vremenu analita.
- Tačnost analitičke metode predstavlja bliskost srednje vrednosti određene koncentracije pravoj vrednosti koncentracije analita. Vrednost tačnosti treba da bude $\leq 15\%$, dok pri LLOQ ova vrednost ne bi trebalo da bude veća od 20%.
- Preciznost analitičke metode opisuje bliskost više individualnih merenja analita u većem broju alikvota dobijenih iz homogenog biološkog uzorka. Preciznost se predstavlja kao relativno standardno odstupanje (RSD, eng. *relative standard deviation*). Vrednost RSD ne bi trebalo da bude veća od 15%, sem u slučaju LLOQ kada ova vrednost ne bi trebalo da bude veća od 20%.
- Prinos analitičke metode predstavlja odnos intenziteta signala instrumenta dobijenog za analit koji je dodat biološkom uzorku, a zatim ekstrahovan iz njega, i intenziteta signala instrumenta dobijenog za čist standard. Prinos opisuje efikasnost ekstrakcije analitičke metode.

- Kalibraciona kriva predstavlja vezu između intenziteta signala instrumenta i poznate koncentracije analita.
- Osetljivost analitičke metode se opisuje pomoću donje granice kvantifikacije (LLOQ) i granice detekcije (LOD, eng. *limit of detection*). LLOQ i LOD se najčešće određuju kao minimalne koncentracije koje je moguće detektovati, pri čemu se dobija odnos signala i šuma 10:1, odnosno 3:1 (Pang *et al.*, 2016).
- Stabilnost leka u biološkom uzorku zavisi od načina skladištenja, hemijskih svojstava leka i od prirode biološkog materijala. Treba imati u vidu da stabilnost leka u određenom biološkom materijalu i na određenom mestu skladištenja važi samo pod tim uslovima i ne sme se prenositi na druge biološke materijale i druge uslove skladištenja. Stabilnost je obično potrebno ustanoviti tokom prikupljanja i korišćenja uzorka, nakon dugotrajnog (zamrzavanje) i kratkotrajnog (radni uslovi) čuvanja, nakon ciklusa zamrzavanja i odmrzavanje, kao i nakon analitičkog postupka, tako da se oponašaju uslovi kojima su uzorci izloženi tokom njihovog čuvanja, korišćenja i analize.

Validacija analitičke metode koja se koristi za ispitivanje stabilnosti lekova vrši se prema ICH smernici Q2(R1) (ICH Q2(R1), 1994). Validacioni parametri koje je potrebno odrediti su: tačnost, preciznost, specifičnost, granica detekcije, granica kvantifikacije, linearnost, opseg i robusnost.

ICH Q2(R1) smernicom se definišu traženi validacioni parametri na sledeći način:

- Tačnost analitičke metode pokazuje slaganje između vrednosti koja je prihvaćena kao prava ili referentna vrednost i određene vrednosti.
- Preciznost analitičke metode predstavlja slaganje serija merenja dobijenih višestrukim uzorkovanjem homogenog uzorka pod propisanim uslovima i izražava se kao relativna standardna devijacija (RSD).
- Specifičnost analitičke metode je mogućnost metode da nedvosmisleno identifikuje analit u prisustvu drugih komponenata koje se mogu nalaziti u uzorku.
- Granica detekcije je najniža vrednost koncentracije analita u uzorku koja se može detektovati, ali ne obavezno i kvantifikovati kao tačna vrednost.

- Granica kvantifikacije je najniža koncentracija analita u uzorku koja se može kvantitativno odrediti sa odgovarajućom tačnošću i preciznošću.
- Linearnost analitičke metode predstavlja mogućnost metode da (u određenom opsegu) dobije rezultate koji su direktno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku.
- Opseg analitičke metode je interval između najveće i najmanje koncentracije analita u uzorku za koji se postiže odgovarajuća tačnost, preciznost i linearnost.
- Robusnost analitičke metode je mera kapaciteta metode da ostane nepromenjena pri malim, ali namernim promenama parametara metode i ukazuje na pouzdanost metode tokom regularne upotrebe.

2.4.5.1. Uticaj matrice

Iako se LC–ESI–MS/MS tehnika uspešno koristi u kvantitativnoj analizi tragova analita, njen veliki nedostatak je pojava uticaja matrice koja može dovesti do pogrešne kvantifikacije. Pod uticajem matrice ili matriks efekta (ME, eng. *matrix effect*) prilikom LC–ESI–MS/MS analize organskih jedinjenja dolazi do smanjenja ili povećanja signala analita u prisustvu drugih jedinjenja u matrici. Pri ekstrakciji antibiotika treba obratiti pažnju na svaki od bioloških materijala pojedinačno, jer svaki od njih ima različit sadržaj proteina, lipida i soli.

Supresija (smanjenje), kao i pojačanje intenziteta signala je obično praćeno smanjenjem preciznosti analitičke metode. Neisparljive komponente uzorka sprečavaju nastanak jona analita u gasovitoj fazi. Zato je izuzetno važno uklanjanje neisparljivih sastojaka u toku pripreme uzorka. Komponente velike površinske aktivnosti mogu da potisnu jonizaciju analita, dok komponente koje formiraju jonske parove sa jonima analita, npr. trifluorosirćetna kiselina, mogu da smanje intenzitet signala analita (Niessen 2006).

Postoji nekoliko načina da se utvrdi uticaj matrice u kvantitativnoj analizi LC–MS metodom. Najbolji način da se proceni ME je da se uporedi signal analita u čistom rastvaraču sa signalom analita u standardu koji odgovara matrici uzorka (MMS, eng. *matrix-matched standard*) prema sledećoj jednačini (4):

$$\text{Utica j matrice (\%)} = \frac{A_{\text{matrica}}}{A_{\text{standard}}} \times 100 - 100 \quad (4)$$

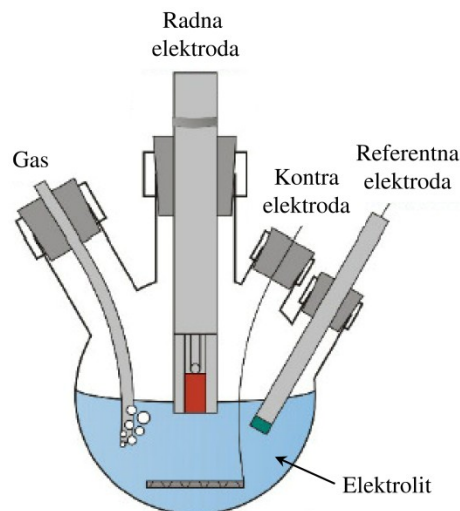
Površina pika analita u standardu koji odgovara matrici uzorka (A_{matrica}) se podeli sa površinom pika analita u odgovarajućem standardu u rastvaraču (A_{standard}). Od dobijene vrednosti (u %) oduzima se vrednost 100 kako bi se odredilo smanjenje (negativna vrednost) ili povećanje (pozitivna vrednost) signala usled prisustva komponenata biološkog materijala. Razlika u intenzitetu signala ukazuje da postoji uticaj matrice. Selektivniji proces ekstrakcije analita ili poboljšano prečišćavanje uzorka mogu da smanje broj komponenata biološkog materijala koje se unose u analitički sistem. Jedan od najefikasnijih načina da se redukuje uticaj matrice je pažljiv izbor odgovarajuće kalibracione tehnike. Najčešće korišćene kalibracione tehnike su eksterna kalibracija, metoda unutrašnjeg standarda i metoda standardnog dodatka (Niessen 2006). Kod eksterne kalibracije se koriste MMS, koji se dobijaju tako što se u ekstrakte uzoraka nakon pripreme dodaju standardni rastvori poznate koncentracije i konstruiše se kalibraciona kriva. Za kvantifikaciju, intenzitet signala uzorka se poredi sa intenzitetom signala MMS. Metoda unutrašnjeg standarda se koristi kada je osetljivost instrumentalne metode promenljiva sa vremenom, kod značajnog uticaja matrice na signal analita, kada je moguć gubitak uzorka za vreme određivanja i kod nestabilnog rada instrumenta, tako da ona eliminiše sve uticaje eksperimentalnih uslova. Unutrašnji standard je jedinjenje poznate i konstantne koncentracije koje se dodaje uzorku, a takođe je poznat i signal koji odgovara unutrašnjem standardu za određenu koncentraciju. Metoda standardnog dodatka je pogodna za kompleksne matrice, kao što je biološki materijal, gde je značajan uticaj matrice ili kada su koncentracije analita u uzorku vrlo blizu granici određivanja. Ona podrazumeva dodavanje različitih zapremina standardnog rastvora poznate koncentracije u više alikvota uzorka iste zapremine, nakon čega se svi uzorci dopunjavaju do iste zapremine (Gužvanj, 2011).

2.4.6. Elektrohemijske metode za analizu lekova

Elektrohemijske tehnike, posebno voltometrija, se koriste za ispitivanje velikog broja lekova. Prednost voltometrijskih metoda je to što su osetljive i brze, priprema uzoraka je jednostavna i matrica nema velikog uticaja na merenje (Avramov Ivić *et al.*, 2016).

Voltometrija obuhvata skup elektroanalitičkih metoda kod kojih se merenjem jačine struje, koja se javlja kao posledica oksidacionih i redukcionih procesa, u zavisnosti od zadanog potencijala na stacionarnoj radnoj elektrodi, dobijaju podaci o analitu koji procesom difuzije dospeva na elektrodu (Despić, 2005; Skoog *et al.*, 2013). Potencijal elektrode je pokretačka sila elektrohemijske reakcije. Intenzitet redukcije ili oksidacije zavisi od primenjenog potencijala. Elektrohemijska redukcija ili oksidacija molekula se odvija na graničnoj površini elektroda–rastvor. Tako da se u ovom procesu elektroni transportuju do granične površine elektroda–rastvor kako bi došlo do reakcije redukcije ili oksidacije. Cilj elektrohemijskih eksperimenata kod kojih se kontroliše potencijal jeste da se dobije struja koja je povezana sa koncentracijom posmatranog analita (Ozkan, 2012). Tako se kod voltometrijskih metoda do saznanja o ispitivanom analitu dolazi na osnovu snimljene krive zavisnosti struje i potencijala (Gužvanj, 2011).

Elektroanalitička merenja se izvode u elektrohemijskoj ćeliji (slika 11), koja sadrži elektrode koje su u kontaktu sa rastvorom elektrolita. Izbor korišćenih materijala elektrohemijske ćelije zavisi od karakteristika uzorka i uslova eksperimenta. Za elektroanalitičke eksperimente se obično koriste elektrohemijske ćelije sa tri elektrode. Zapremina korišćene ćelije je obično 5–50 mL i izrađena je najčešće od stakla, a ređe od kvarca, teflona ili polietilena (Ozkan, 2012).



Slika 11. Prikaz elektrohemijske ćelije

Elektroda na kojoj dolazi do oksidacije ili redukcije analita naziva se radna elektroda. Uglavnom je izrađena od inertnih metala, kao što su zlato ili platina, od staklastog ugljenika, pirolitičkog grafita, dijamanta ili ugljeničnih vlakana. Na njoj se održava konstantan potencijal ili se menja sa vremenom. Potencijal radne elektrode se određuje u odnosu na standard, tj. referentnu elektrodu (Ozkan, 2012; Skoog *et al.*, 2013).

Referentna elektroda obezbeđuje stabilan potencijal sa kojim se poredi radna elektroda. Referentna elektroda proizvodi isti potencijal bez obzira na rastvor. Zbog toga, potencijal referentne elektrode ostaje konstantan tokom reakcije i primenjeni napon je jednak potencijalu radne elektrode. Referentna elektroda se u elektrohemijisku ćeliju uvodi preko elektrolitičkog mosta sa Luginovom kapilaram. Vrh kapilare treba da se postavi na što je moguće kraće rastojanje od radne elektrode kako bi otpornost elektrolita između elektrode i vrha kapilare mogla da se svede na zanemarljivu vrednost. Ovo je važno s obzirom na to da, na tom rastojanju kada teče struja, javlja se pad potencijala koji se sabira sa potencijalom elektrode, te mereni potencijal ne odgovara vrednosti elektrodnog potencijala koji se želi meriti ili primeniti na elektrodi. Najčešće korišćene referentne elektrode su zasićena kalomelova elektroda (SCE, eng. *saturated calomel electrode*) i Ag/AgCl elektroda (Despić, 2005; Ozkan, 2012).

Kontra (pomoćna) elektroda obezbeđuje prenos struje od izvora kroz elektrolit do radne elektrode, tako da samo mala količina struje prolazi kroz referentnu elektrodu, jer bi u suprotnom moglo da dođe do neželjene promene potencijala. Kontra elektroda može biti različitih oblika i od različitih materijala (platina, zlato, živa). Poželjno je da površina kontra elektrode bude što veća (ne manja od radne elektrode) (Ozkan, 2012; Skoog *et al.*, 2013).

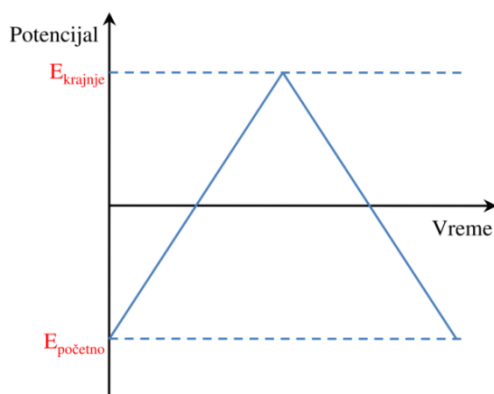
Obično se kao elektrolit koriste kiselina, baza, so ili rastvor pufera. Koncentracija elektrolita treba da bude barem 100 puta veća od koncentracije ispitivanog analita (obično 0,1–1 M). Pre merenja je potrebno ukloniti kiseonik iz rastvora, što se postiže uvođenjem gasa (azota ili helijuma) (Ozkan, 2012).

Elektrohemijske metode koje se najčešće koriste u elektroanalitici lekova su (Brett i Brett, 1994; Skoog *et al.*, 2013):

- voltometrija sa linearnom promenom potencijala,
- ciklična voltometrija,
- „stripping” voltometrija sa taloženjem i rastvaranjem,
- diferencijalna pulsna voltometrija i normalna pulsna voltometrija,
- voltometrija sa pravougaonim impulsima.

2.4.6.1. Ciklična voltometrija

Ciklična voltometrija (CV, eng. *cyclic voltammetry*) je metoda pogodna za praćenje redoks reakcija organskih i neorganskih jedinjenja. Ovom metodom se vrši ispitivanje elektrohemijskog sistema u celini i svih procesa koji se u njemu odigravaju u datom opsegu koncentracija. CV metoda se zasniva na kontinuiranoj promeni potencijala radne elektrode (E) tokom vremena i merenju dobijene struje. Koristi se jednostruko ili višestruko ponavljanje trougaonog pulsa potencijala. Testiranje se vrši počevši od potencijala pri kome ne dolazi do reakcije na elektrodi, pa do potencijala pri kome dolazi do oksidacije ili redukcije ispitivanog jedinjenja, a nakon toga se potencijal reverzibilno menja do početne vrednosti potencijala (slika 12) (Despić, 2005; Ozkan, 2012).



Slika 12. Promena potencijala sa vremenom tokom CV eksperimenta

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 ukoliko se nije dostigao potencijal započinjanja sledećeg procesa (Despić, 2005).

Za snimanje procesa oksidacije sistemu se zadaje početni elektrodni potencijal na kome se ne odigrava proces oksidacije, a u toku snimanja se menja prema pozitivnijim vrednostima. Za proces redukcije se zadaje početni elektrodni potencijal na kome se ne odigrava proces redukcije, a zatim se elektrodni potencijal menja prema negativnijim vrednostima. Elektrodni potencijal, u toku promene od početne do krajnje vrednosti, u datom trenutku se može opisati jednačinom:

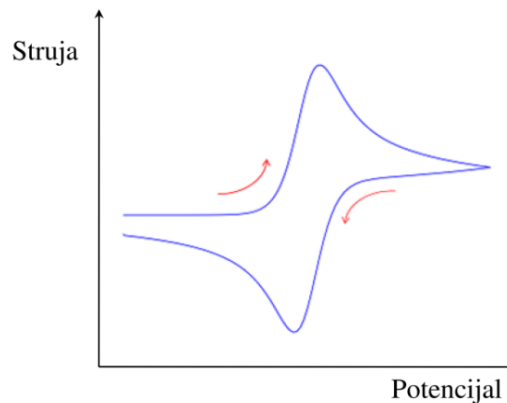
$$E_{(t)} = E_i + vt \quad (5)$$

pri čemu je $E_{(t)}$ potencijal elektrode u vremenu t , E_i je početni potencijal, a v je brzina promene potencijala.

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 (6):

$$E_{(t)} = E_i - vt \quad (6)$$

Prilikom povratka potencijala redukuje se deo vrste koja je oksidovana u direktnom snimanju. Uobičajeno je da reduktivnom procesu odgovara negativna struja, a oksidacionom pozitivna. Obično se merenje vrši u opsegu brzina promene potencijala $10\text{--}100 \text{ mVs}^{-1}$ (Despić, 2005; Ozkan, 2012). Dobijena grafička zavisnost potencijala i struje naziva se voltamogram (slika 13).

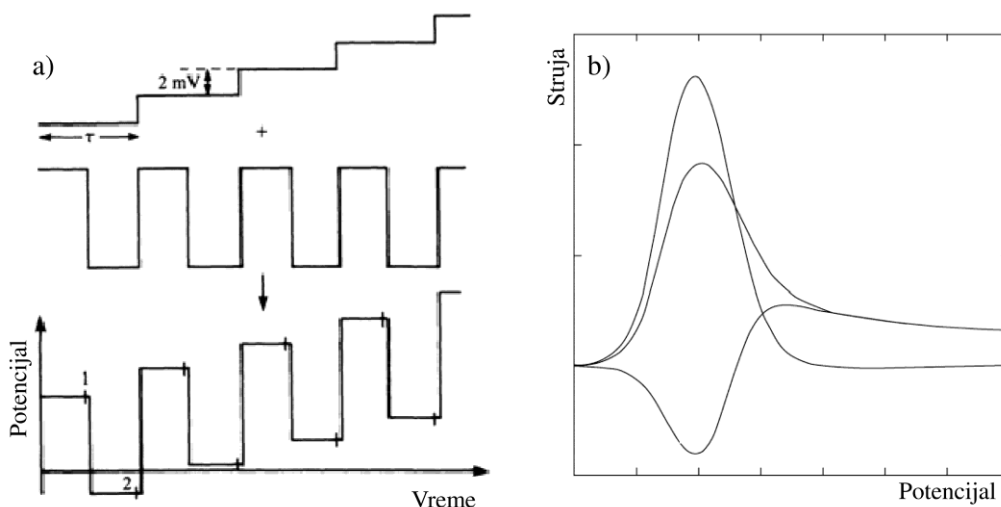


Slika 13. Voltamogram CV eksperimenta

Tokom CV eksperimenata se mogu javiti povratni i nepovratni procesi. Povratnim procesom smatra se proces koji ima dovoljnu vrednost konstante brzine da se za korišćenu brzinu promene potencijala na svakom postignutom potencijalu uspostavlja ravnoteža između reaktanta i produkta u prielektrodnom sloju čija je koncentracija određena isključivo difuzijom. Pri nepovratnom procesu, brzina prenosa elektrona je nedovoljna da omogući površinsku ravnotežu. Najvidljiviji efekat ovakvog nepovratnog ponašanja je povećanje razlike potencijala katodnog i anodnog pika sa povećanjem brzine polarizacije (Despić, 2005).

2.4.6.2. Voltometrija sa pravougaonim impulsima

Voltometrija sa pravougaonim impulsima (SWV, eng. *square wave voltammetry*) je osetljiva i brza metoda. Kod ove metode se potencijal menja na radnoj elektrodi i oblik promene potencijala predstavlja stepeničastu formu. Trajanje potencijalnog stepena odgovara trajanju pulsa pravougaonog talasa. Oblik ukupnog potencijala predstavlja superpoziciju pravougaonog talasa sa relativno velikom amplitudom i stepena potencijala (Brett i Brett, 1994). Struja se meri dvaput u toku svakog ciklusa, jednom na početku polaznog pulsa i drugi put na kraju pulsa suprotnog smera, u tačkama 1 i 2 (slika 14a). Polazni puls proizvodi katodnu struju, a povratni puls stvara anodnu struju. Razlika tih struja prikazuje se u zavisnosti od potencijala i dobija se kriva struja–potencijal (slika 14b) koja je srazmerna koncentraciji analita u elektrolitu (Wang, 2000).



Slika 14. a) Šema promene potencijala, b) Zavisnost struja–potencijal kod SWV metode

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Korišćene hemikalije

Standard anizomicina (čistoće $\geq 98\%$) je nabavljen od proizvođača Fermentek (Jerusalim, Izrael). Osnovni standardni rastvor leka pripremljen je u metanolu pri koncentraciji od $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Da bi se pripremili standardni rastvori različitih koncentracija ($1\text{--}2500 \text{ ng mL}^{-1}$) vršeno je razblaživanje osnovnog standardnog rastvora metanolom. Svi rastvori su čuvani na 4°C . Svi korišćeni rastvarači (metanol, acetonitril, sirćetna kiselina, heptafluorobuterna kiselina, heksan i trihlorsirćetna kiselina) su bili HPLC čistoće i nabavljeni su od proizvođača J. T. Baker (Center Valley, SAD) ili Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD). Korišćene su i supstance analitičke čistoće, kao 35% hlorovodonična kiselina, natrijum-hidroksid, 30% vodonik-peroksid (Lach-Ner, Neratovica, Češka) i natrijum-hidrogenkarbonat (Merck, Darmstadt, Nemačka). Dejonizovana voda je dobijena propuštanjem destilovane vode kroz GenPure sistem (TKA, Niederelbert, Nemačka). Za podešavanje pH vrednosti korišćene su hemikalije analitičke čistoće: sirćetna kiselina proizvođača Sigma-Aldrich i amonijak proizvođača NRK inženjering (Beograd, Srbija).

3.2. Snimanje masenih spektara anizomicina

Za snimanje masenih spektara anizomicina korišćeni su LCQ Advantage (Thermo Scientific, Waltham, SAD) 3D jonski trap i LTQ XL (Thermo Scientific, Waltham, SAD) 2D jonski trap, kao maseni spektrometri. Elektrosprej jonizacija je korišćena kao jonizaciona tehnika. Spektri su snimani u pozitivnom režimu rada jonskog izvora. Direktnim unošenjem standardnog rastvora analita koncentracije $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ u maseni spektrometar snimljeni su maseni spektri u opsegu m/z 50–1000. Utvrđeno je da su za detektovanje anizomicina optimalni sledeći parametri jonskog izvora: temperatura kapilare (300°C), protok azota (47 au (eng. *arbitrary units*) na skali opsega 0–100 koji je definisan LCQ, odnosno LTQ XL sistemom) i napon izvora (5,0 kV).

U snimljenom masenom spektru je odabran najintenzivniji jon, protonovani molekul, kao prekursor jon. Zatim je izvršena optimizacija kolizione energije, tj. energija sudara sa atomima helijuma u jonskom trapu, kako bi se dobili intenzivni i stabilni fragmentni joni. Najintenzivniji fragmentni jon je izabran za reakciju fragmentacije. Takođe su dobijeni joni dalje fragmentisani u MSⁿ reakcijama, uz optimizaciju kolizionih energija.

Praćenje i identifikacija degradacionih proizvoda nastalih u studiji forsirane degradacije vršeno je MSⁿ analizom, upotrebom 2D jonskog trapa kao masenog detektora sa elektrosprej jonizacijom, analiziranjem pozitivnih jona. Identifikacija dobijenih degradacionih proizvoda je izvršena snimanjem masenih spektara uzoraka u opsegu m/z 50–1000 i praćenjem molekulskih i fragmentnih jona i njihove relativne zastupljenosti, kao i praćenjem dalje fragmentacije nastalih fragmenata.

3.3. Optimizacija hromatografskih parametara

Za tačno-hromatografsku analizu korišćeni su Surveyor (Thermo Scientific, Waltham, SAD) i Dionex UltiMate 3000[®] (Thermo Scientific, Waltham, SAD) HPLC sistemi. Za reverzno-faznu hromatografiju je korišćena Zorbax Eclipse[®] XDB-C₁₈ kolona (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD), dimenzija 4,6 mm × 75 mm i veličine čestica 3,5 μm. Ispred hromatografske kolone postavljena je predkolona istog proizvođača, dimenzija 4,6 mm × 12,5 mm × 5 μm. Kao mobilna faza korišćeni su dejonizovana voda (A), metanol (B) i 10% (v/v) rastvor sirćetne kiseline (C). Sirćetna kiselina je korišćena kako bi se poboljšala jonizacija analita. Tabelarno su predstavljeni optimalni sastav i protok mobilne faze za određivanje anizomicina iz bioloških uzoraka (tabela 4), za analiziranje uzoraka dobijenih tokom ispitivanja stabilnosti anizomicina pri elektrohemijskim uslovima (tabela 4), kao i za analiziranje uzoraka dobijenih tokom studije forsirane degradacije anizomicina (tabela 5). Zapremina od 10 μL konačno dobijenog ekstrakta je injektovana u HPLC sistem. Obrada rezultata izvršena je pomoću softverskog paketa Xcalibur v. 2.2 (Thermo Scientific, Waltham, SAD) pri korišćenju Surveyor HPLC sistema, odnosno Chromeleon 6.8 (Thermo Scientific, Waltham, SAD) pri korišćenju Dionex UltiMate 3000[®] HPLC sistema.

Tabela 4. Sastav i protok mobilne faze: a) za određivanje anizomicina iz bioloških uzoraka; b) za analiziranje uzoraka dobijenih pri elektrohemijском ispitivanju anizomicina

Vreme (min)	A (%)	B (%)	C (%)	a) Protok (mL min ⁻¹)	b) Protok (mL min ⁻¹)
0,00	69	30	1	0,5	0,4
5,00	69	30	1	0,5	0,4
5,01	0	100	0	0,5	0,4
9,00	69	30	1	0,5	0,4
14,00	69	30	1	0,5	0,4

Tabela 5. Sastav i protok mobilne faze za određivanje anizomicina u uzorcima dobijenih tokom studije forsirane degradacije

Vreme (min)	A (%)	B (%)	C (%)	Protok (mL min ⁻¹)
0,00	79	20	1	0,9
5,00	79	20	1	0,9
5,01	0	100	0	1,0
11,00	0	100	0	1,0
11,01	79	20	1	0,9
17,00	79	20	1	0,9

3.4. Optimizacija LC–MS/MS parametara

Nakon izbora optimalnih hromatografskih uslova, ponovo je podešena osetljivost masenog spektrometra i optimizovani su instrumentalni uslovi za nedvosmislenu identifikaciju tragova anizomicina. Standardni rastvor analita koncentracije 10 µg mL⁻¹ unet je u tok mobilne faze, uz protok od 0,5 mL min⁻¹ (biološki uzorci), 0,4 mL min⁻¹ (elektrohemijски eksperimenti), odnosno 0,9 mL min⁻¹ (studija degradacije). Prilikom analize leka iz bioloških uzoraka i onih dobijenih u elektrohemijским eksperimentima mobilna faza sastojala se od 69% vode (A), 30% metanola (B) i 1% rastvora sirćetne kiseline koncentracije 10% (C), dok je prilikom analiziranja degradacije leka sastav mobilne faze bio 79:20:1 (A:B:C). Reakcija fragmentacije protonovanog molekula anizomicina u najintenzivniji fragmentni jon je izabrana za kvantifikaciju u SRM režimu skeniranja u konačno razvijenoj LC–MS/MS metodi.

3.5. LC–UV analiza

Surveyor detektor sa nizom fotoćelija (PDA, eng. *photodiode array*) proizvođača Thermo Scientific je korišćen za LC–UV analizu uzoraka dobijenih u studiji forsirane degradacije. Identifikacija supstanci na PDA detektoru je vršena prema retencionim vremenima i UV spektrima, poređenjem rastvora uzorka sa standardnim rastvorom ispitivane supstance.

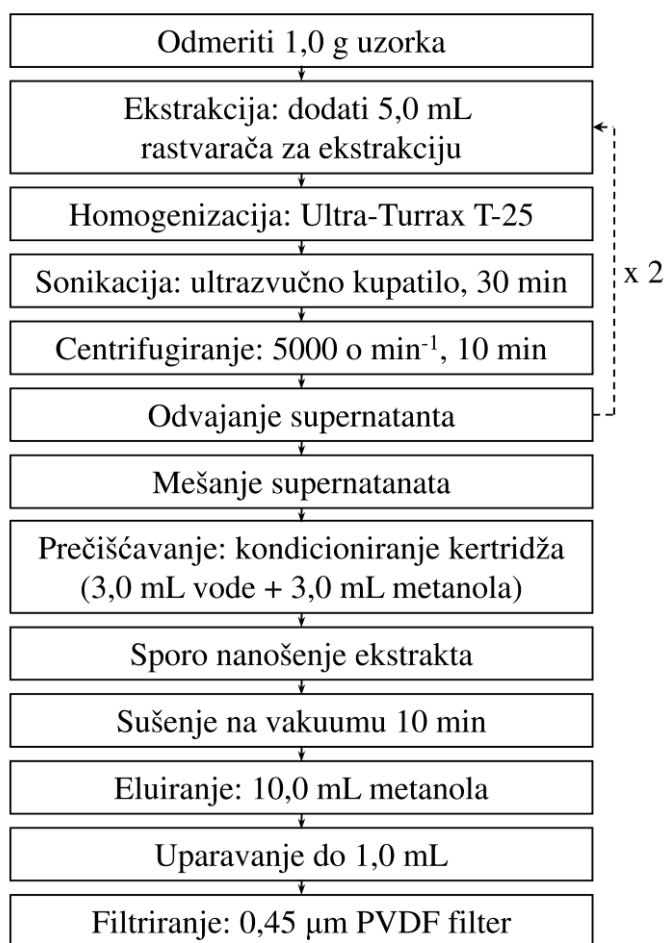
3.6. Određivanje anizomicina u uzorcima biološkog materijala

3.6.1. Optimizacija postupka pripreme uzoraka biološkog materijala

Optimizacija postupka pripreme bioloških uzoraka vršena je na uzorku svinjskog srca. Prvi korak u pripremi uzoraka biološkog materijala je homogenizacija. Usitnjavanje i homogenizacija 200 g organa, tj. svinjskog srca, izvršeno je korišćenjem blendera (Robert Bosch GmbH, Stuttgart, Nemačka). Ekstrakcija analita iz uzoraka je optimizovana testiranjem različitih parametara. Testirani ekstrakcioni parametri su rastvarač za ekstrakciju i pH vrednost ekstrakta pre prečišćavanja.

Na osnovu pregleda literature koja se bavi određivanjem različitih lekova u biološkom materijalu (tabela 2) za testiranje su odabrana sledeća tri rastvarača za ekstrakciju: metanol (Yamada *et al.*, 2006; Berrada *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2014; Stariat *et al.*, 2014; Montesano *et al.*, 2016), 5% rastvor TCA (Cherlet *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2008; Kaufmann *et al.*, 2012; Bousova *et al.*, 2013) i acetonitril (Arnold *et al.*, 2004; Shao *et al.*, 2005; Yamada *et al.*, 2006; Dickson *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2012; Macarov *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2012; Bousova *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2016). Postupak optimizacije rastvarača za ekstrakciju je izvođen na sledeći način: u plastičnu kivetu zapremine 50 mL odmeren je 1 g tkiva srca. U kivetu je zatim dodato 5 mL rastvarača za ekstrakciju. Za homogenizaciju uzorka tkiva sa rastvaračem za ekstrakciju korišćen je Ultra-Turrax T-25 (IKA[®]-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Nemačka). Da bi se ubrzao i poboljšao proces ekstrakcije, uzorak je postavljen na ultrazvučno kupatilo tokom 30 min. U cilju odvajanja tečne faze (supernatanta), uzorak je centrifugiran

tokom 10 min pri brzini od 5000 o min^{-1} . Postupak ekstrakcije je ponovljen još jedanput nakon odvajanja supernatanta. Dobijeni supernatanti su pomešani i dalje prečišćeni primenom SPE metode. Da bi se adsorbens pripremio za nanošenje ekstrakta, SPE kertriži su kondicionirani smešom vode i metanola. Nakon nanošenja ekstrakta, adsorbens je sušen na vakuumu, a zatim je vršeno eluiranje analita metanolom u staklene kivete. Kivete su zatim prenete u vodeno kupatilo, gde je prikupljeni ekstrakt uparen u struji azota do 1 mL. Nakon toga je ekstrakt profiltriran kroz poli(viniliden fluorid) (PVDF) filter (Roth, Karlsruhe, Nemačka), veličine pora $0,45 \mu\text{m}$, i analiziran. Na slici 15 je prikazan postupak pripreme uzorka tkiva prilikom izbora rastvarača za ekstrakciju za koji se dobijaju najveći prinosi analita.



Slika 15. Shematski prikaz postupka pripreme uzorka za izbor rastvarača za ekstrakciju anizomicina iz bioloških uzorka

Nakon izbora odgovarajućeg rastvarača za ekstrakciju, postupku je dodat još jedan korak radi uklanjanja masti iz bioloških uzoraka, tako što je dobijenom ekstraktu dodavan heksan, pre prečišćavanja na SPE kolonama. Prikupljen ekstrakt je prebačen u levak za odvajanje gde je dodat heksan. Nakon ručnog mešanja vršeno je odvajanje donje faze koja sadrži ekstrakt sa analitom, od gornjeg dela koji predstavlja heksan u kome su rastvorene masti iz uzorka. Nakon odvajanja ekstrakta vršeno je njegovo nanošenje na SPE kolone radi daljeg prečišćavanja.

U metodi gde su korišćeni metanol i acetonitril kao rastvarači za ekstrakciju dodavan je 5% rastvor TCA radi deproteinizacije. Prikupljeni ekstrakt je nakon odvajanja masti uparen do suva, a zatim rekonstituisan u rastvoru TCA, nakon čega je dobijeni uzorak nanošen na SPE kolone za prečišćavanje.

Nakon izbora optimalnog rastvarača za ekstrakciju vršen je odabir optimalne pH vrednosti ekstrakta. Podešavanje pH vrednosti ekstrakta vršeno je nakon ekstrakcije analita organskim rastvaračem i pre prečišćavanja ekstrakta na SPE kolonama. Vršeni su eksperimenti bez podešavanja pH (1,7), kao i eksperimenti sa kontrolisanim pH (7,0 i 8,0) bliskim pK_a vrednosti anizomicina (Koesukwiwat *et al.*, 2007).

Naknadno su testirani i kertridži za prečišćavanje uzoraka sa različitim pakovanjima. Na osnovu pregleda literature (tabela 3), za testiranje su odabrana dva komercijalna pakovanja: Oasis HLB (200 mg/6 mL, Waters, Milford, SAD) (Dubois *et al.*, 2001; Cherlet *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2008, 2016; Freitas *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2016) i Strata X (200 mg/6 mL, Phenomenex, Torrance, SAD) (Garcés *et al.*, 2006; Stolker *et al.*, 2008; Gopinath *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2015).

3.6.2. Validacija metode

Prethodno razvijena i optimizovana metoda za određivanje prisustva anizomicina u tkivu svinjskog srca je testirana korišćenjem drugih svinjskih tkiva i organa, kao što su mozak, slezina, bubrezi, jetra, butni mišić, masno tkivo, kao i serum. Validacija je izvedena određivanjem selektivnosti, tačnosti, preciznosti, prinosa, kalibracione krive,

uticaja matrice i stabilnosti leka u skladu sa FDA pravilnikom za validaciju bioanalitičkih metoda objavljenog od strane Agencije za hranu i lekove SAD-a (FDA, 2001).

U postupku validacije, za određivanje validacionih parametara kao što su selektivnost, tačnost, preciznost, prinos i stabilnost anizomicina, korišćeni su kontrolni uzorci (QC). QC uzorci su pripremani tako što je homogenizovanom uzorku tkiva (1 g) ili seruma (1 mL) dodat 1 mL odgovarajućeg standardnog rastvora u opsegu koncentracija LLOQ–2500 ng g⁻¹ za tkiva, odnosno LLOQ–2500 ng mL⁻¹ za serum, a zatim su uzorci pripremani u skladu sa razvijenim postupkom pripreme bioloških uzoraka. Za određivanje validacionih parametara kao što su prinos i uticaj matrice su korišćeni MMS, koji su pripremani tako što je ekstrakt na samom kraju procedure pripreme nakon prečišćavanja rekonstituisan u 1 mL standardnog rastvora anizomicina odgovarajuće koncentracije.

Za određivanje selektivnosti pripremljena je slepa proba, tj. biološki materijal bez dodatka analita, za šest ispitivanih tkiva i serum, kao i svaki biološki materijal sa dodatkom standardnog rastvora (kontrolni uzorci, QC) tako da se dobije koncentracija koja odgovara donjoj granici kvantifikacije (LLOQ). Dobijeni hromatogrami su upoređeni kako bi se utvrdilo prisustvo ili odsustvo nepoželjnih pikova na retencionom vremenu anizomicina.

Tačnost i preciznost metode su testirani analizom po pet uzoraka za svaku od četiri testirane koncentracije, za svako ispitivano tkivo i serum. Pripremani su kontrolni uzorci pri LLOQ, kao i pri niskoj (50 ng g⁻¹), srednjoj (500 ng g⁻¹) i visokoj (2500 ng g⁻¹) koncentraciji. Tačnost, koja predstavlja bliskost određene vrednosti pravo vrednosti koncentracije analita, se izračunava kao relativna greška i izražava se u procentima (RE %, eng. *relative error*). Preciznost predstavlja bliskost individualnih merenja analita. Izračunava se kao relativna standardna devijacija (RSD). Za određivanje intra- i interdnevne tačnosti i preciznosti izvođeni su eksperimenti istog dana i tokom tri uzastopna dana.

Prinos metode je određivan sa šest koncentracija (50, 100, 250, 500, 1000 i 2500 ng g⁻¹), u triplikatu za svako ispitivano tkivo i serum. Prinos je izračunavan poređenjem površine pika anizomicina ekstrahovanog iz QC uzorka i površine pika analita dobijene za ekstrakt slepe probe kome je dodat standardni rastvor odgovarajuće koncentracije na kraju pripreme, tj. za standard koji odgovara matrici uzorka.

Kalibracioni standardi korišćeni za konstrukciju kalibracione krive su pripremani dodatkom 1 mL odgovarajućeg standardnog rastvora homogenizovanom tkivu (1 g) ili serumu (1 mL) i dalje tretirani prema optimizovanom postupku pripreme bioloških uzoraka. Eksperiment je izveden na sedam koncentracija, u duplikatu, u opsegu koncentracija LLOQ–2500 ng g⁻¹, za svaki tip tkiva i serum. Kalibraciona kriva je dobijena konstruisanjem krive zavisnosti površine pika kalibracionih standarda od određene koncentracije analita. Linearna regresija je izvedena kako bi se odredili odsečak i nagib kalibracione krive, kao i korelacioni koeficijent (R^2), tj. kako bi se ustanovila linearnost metode.

Osetljivost metode je procenjena određivanjem donje granice kvantifikacije (LLOQ) i granice detekcije (LOD) za svih šest tipova tkiva i serum. LLOQ i LOD su određeni kao minimalne detektovane koncentracije analita koje daju odnos signala i šuma 10:1, odnosno 3:1.

Stabilnost leka je ispitivana pri uslovima kojima su uzorci izloženi tokom skladištenja, pripreme i analize. Dugoročna stabilnost anizomicina je testirana tokom 15 dana na –80 °C, što predstavlja uslove pod kojima su uzorci tkiva i seruma bili skladišteni. Stabilnost leka tokom pripreme uzoraka je bila testirana nakon 12 h stajanja u HPLC uređaju na 20 °C. Eksperimenti su izvođeni na tri koncentracije (niska, srednja i visoka) u triplikatu. Takođe je testirana stabilnost standardnih rastvora anizomicina koji su čuvani na 4 °C tokom 15 dana.

Uticaj matrice, tj. smanjenje ili povećanje signala analita u prisustvu sastojaka biološkog materijala, je određen za svaki tip tkiva i serum korišćenjem standarda koji odgovara matrici uzorka i standardnog rastvora anizomicina na tri koncentracije (50,

500 i 2500 ng g⁻¹). Uticaj matrice je izračunat na osnovu jednačine 4 (poglavlje 2.4.5.1.).

3.6.3. Metoda kalibracije

Za eksperimente optimizacije metode pripreme uzoraka biološkog porekla kao kalibraciona metoda korišćena je metoda eksterne kalibracije sa standardima koji odgovaraju matrici uzorka (MMS). MM standardi su pripremljeni tako što je prema opisanoj proceduri ekstrahovan uzorak tkiva ili seruma, a zatim je u poslednjoj fazi eksperimenta, nakon prečišćavanja, ekstrakt rekonstituisan u standardnom rastvoru odgovarajuće koncentracije u opsegu LLOQ–2500 ng g⁻¹ za tkiva, odnosno LLOQ–2500 ng mL⁻¹ za serum.

Prilikom analize realnih uzoraka za kalibraciju je korišćena metoda standardnog dodatka. U dve odmerene probe ispitivanog uzorka, tj. 1 g tkiva ili 1 mL seruma, dodati su standardni rastvori dve različite koncentracije koje su očekivane u uzorku. Očekivane koncentracije su procenjene na osnovu preliminarnih eksperimenata. Dalje su uzorci pripremljeni prema optimizovanoj proceduri i analizirani.

3.6.4. Eksperimenti sa životinjama za *in vivo* studiju

S obzirom na to da je farmakokinetička studija leka neophodna u predkliničkoj fazi ispitivanja leka, razvijena analitička metoda je primenjena u *in vivo* studiji za određivanje raspodele anizomicina u tkivima i serumu, kao i za određivanje farmakokinetičkih parametara. U ovoj studiji su za analizu odabrani sledeći farmakokinetički parametri: maksimalna koncentracija leka, vreme potrebno da se postigne maksimalna koncentracija leka, konstanta brzine eliminacije, površina ispod krive koncentracije leka u funkciji vremena, poluvreme eliminacije, klirens i srednje vreme zadržavanja. Navedeni farmakokinetički parametri su dobijeni neprostornom analizom koja je vršena korišćenjem Matlab softvera (Math-Works, Natick, SAD). Eksperimenti sa životinjama za *in vivo* studiju su izvođeni na mužjacima Wistar albino pacova težine 200 g (\pm 5%). Životinje su dobijene iz matične kolonije koja je uzgajana

u odgajalištu. Životinje su čuvane u kavezima na sobnoj temperaturi (20–30 °C) i relativnoj vlažnosti vazduha $50 \pm 10\%$, po dve u kavezu, u ciklusima svetlosti i mraka (12/12 h) tokom 2 meseca pre početka eksperimenata. Hranu i vodu životinje su dobijale *ad libitum*. Svi eksperimenti sa životinjama su izvođeni u skladu sa Zakonom o dobrobiti životinja Republike Srbije i procedurama vivarijuma Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.[§] Pacovi nisu bili izloženi nijednom antibiotiku niti bilo kom drugom leku tokom ove studije. Doza od 150 mg kg^{-1} anizomicina je potkožno injektovana životinjama. Rastvor za injektovanje je pripremljen rastvaranjem anizomicina u fiziološkom rastvoru i podešavanjem pH vrednosti na 7,3. Za injektovanje je korišćen 1 mL pripremljenog rastvora. Pacovi su žrtvovani u prethodno određenim vremenima (0,25, 0,5, 1, 3, 7, 12 i 24 h) nakon injektovanja antibiotika. U svakoj vremenskoj tački su sakupljeni uzorci od tri životinje. Uzorci tkiva (srce, mozak, slezina, bubrezi, jetra i butni mišić) su sakupljeni i brzo secirani, a zatim čuvani zaleđeni na -80 °C do analize. Uzorci seruma su dobijeni centrifugiranjem uzoraka krvi, od kojih je odvojen koagulat, pri 3000 o min^{-1} tokom 10 min, nakon čega je serum izdvojen i čuvan zaleđen do analize. Uzorci tkiva i seruma su pripremani po optimizovanoj i validiranoj metodi pripreme bioloških uzoraka.

3.7. Studija forsirane degradacije

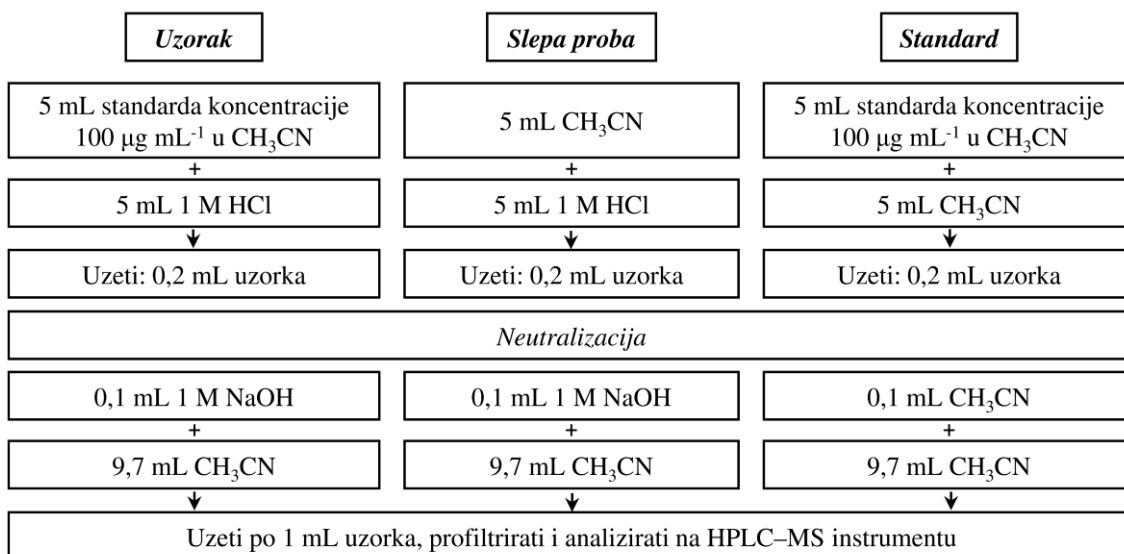
3.7.1. Priprema uzoraka i postupak forsirane degradacije

Za studiju forsirane degradacije korišćen je osnovni rastvor anizomicina koncentracije $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Za svaki eksperiment je zapremina od 10 mL sveže pripremljenog standardnog rastvora podeljena na dva dela, pri čemu je jedan korišćen kao uzorak kome je dodavan stres agens, a drugi je razblaživan sa istom zapreminom metanola i korišćen kao standard za poređenje. Kako se u nekim ranijim istraživanjima stres degradacije lekova pokazalo da metanol kao rastvarač treba izbegavati u kiseloj sredini zbog reaktivnosti (Alsante *et al.*, 2007; Malešević *et al.*, 2014), osnovni rastvor anizomicina za studiju forsirane degradacije u kiseloj sredini je pripreman u acetonitrilu.

[§] Eksperimenti sa životinjama su odobreni od strane Etičke komisije Biološkog fakulteta (broj dozvole EK-BF-2013/04, izdata 6. 5. 2013.).

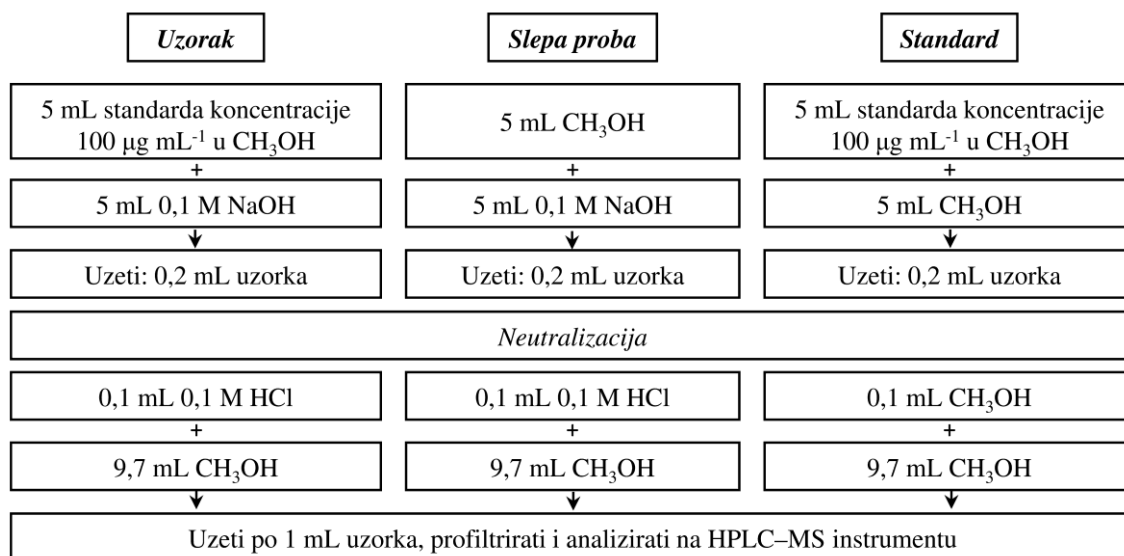
Uzorci su nakon izlaganja stres agensu prvo analizirani korišćenjem PDA detektora, a zatim su razblaženi za analizu pomoću masenog spektrometra. U slučaju kisele i bazne hidrolize uzorci su nakon izlaganja stres agensu nakon određenog vremena neutralisani odgovarajućom zapreminom baze, odnosno kiseline, kako bi se reakcija zaustavila pre analiziranja na instrumentu.

U eksperimentima ispitivanja hidrolize u kiseljoj sredini (slika 16), 5 mL 1 M rastvora HCl je dodato u 5 mL standardnog rastvora anizomicina u acetonitrilu na sobnoj temperaturi. U prethodno isplaniranim vremenskim tačkama, tokom 30 dana, uzimano je po 0,2 mL uzorka, neutralisano odgovarajućom zapreminom NaOH i analizirano LC–UV metodom. Za analizu LC–MS/MS metodom uzorci su razblaživani do koncentracije $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Uzorci su filtrirani kroz $0,45 \mu\text{m}$ PVDF filtere i analizirani. Takođe je testiran i uticaj toplote u kiseljoj sredini tako što su isti eksperimenti izvođeni na $60 \text{ }^\circ\text{C}$ u vodenom kupatilu tokom 48 h.



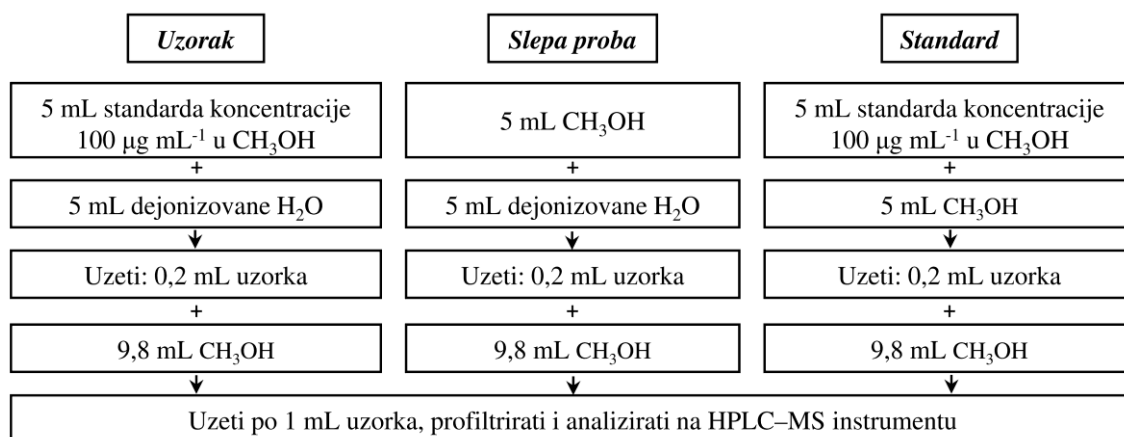
Slika 16. Priprema uzoraka za ispitivanje hidrolize u kiseljoj sredini

Ispitivanje hidrolize u baznoj sredini (slika 17) izvođeno je mešanjem 5 mL standardnog rastvora sa 5 mL 0,1 M NaOH na sobnoj temperaturi. U određenim vremenskim tačkama uzorci su uzimani i neutralisani odgovarajućom zapreminom HCl. Nakon toga, uzorci su filtrirani kroz $0,45 \mu\text{m}$ PVDF filtere i analizirani.



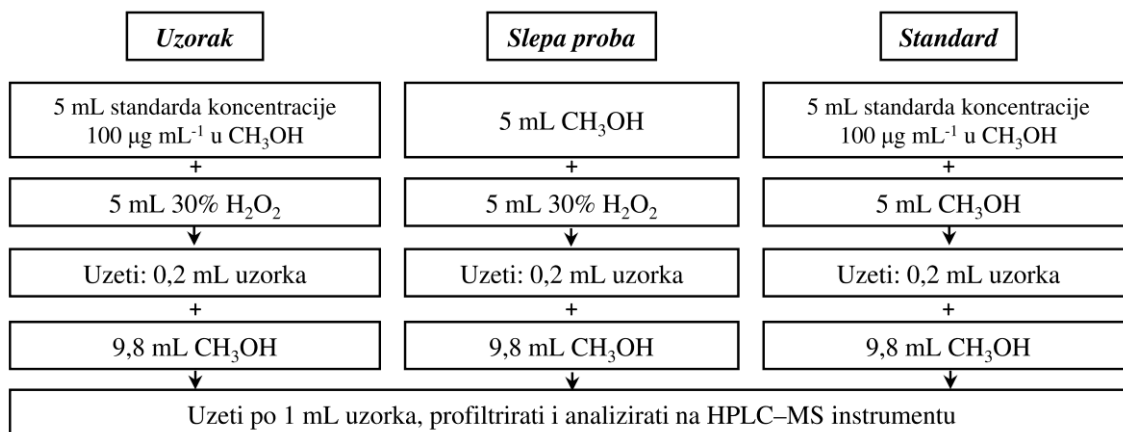
Slika 17. Priprema uzoraka za ispitivanje hidrolize u baznoj sredini

Neutralna hidroliza (slika 18) je izvedena dodavanjem 5 mL dejonizovane vode u 5 mL standardnog rastvora anizomicina na sobnoj temperaturi. Praćena je degradacija tokom 16 dana, a uzorci su filtrirani i analizirani u prethodno isplaniranim vremenskim tačkama. Takođe je ispitivan i uticaj toplote u neutralnim uslovima testiranjem na 60 °C u vodenom kupatilu tokom 48 h.



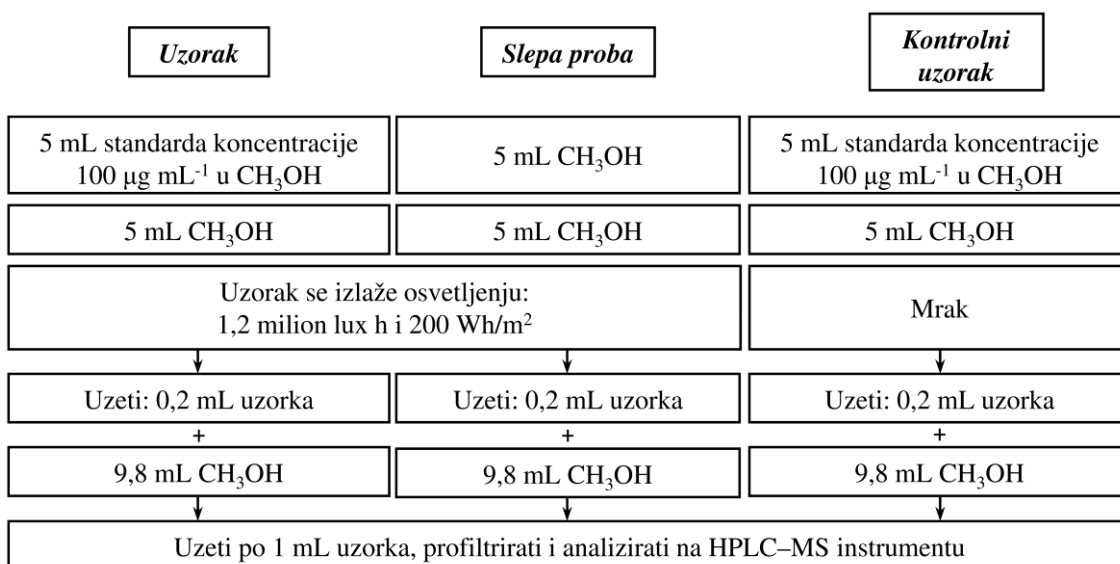
Slika 18. Priprema uzoraka za ispitivanje hidrolize u neutralnoj sredini

Kod oksidativne degradacije anizomicina (slika 19), 5 mL 30% H₂O₂ je dodato u 5 mL standardnog rastvora leka na sobnoj temperaturi. U prethodno planiranim vremenskim tačkama uzorci su profiltrirani i analizirani. Oksidacija anizomicina je praćena tokom 30 dana.



Slika 19. Priprema uzoraka za ispitivanje oksidacije

Fotodegradacija (slika 20) je izvedena izlaganjem standardnog rastvora leka osvetljenju koje proizvodi lampa Ultra Vitalux[®] 300 W (Osram, Minhen, Nemačka). Lampa je postavljena na udaljenosti od 40 cm. Uzorak je osvetljavao tokom 6 h kako bi se postiglo ukupno zračenje od najmanje 1,2 milion lx h i ukupna energija od 200 Wh m⁻² UV svetlosti (ICH Q1B, 1996) u komori za ispitivanje fotostabilnosti. Nakon svakog sata je uziman uzorak, filtriran i analiziran. Na isti način je pripremljen i kontrolni uzorak koji je čuvan u mraku.



Slika 20. Priprema uzoraka za ispitivanje fotodegradacije

Tokom studije forsirane degradacije u svim eksperimentima su uporedo sa stresiranim uzorcima pripremani i analizirani kontrolni uzorci u vremenu nula i slepe probe.

Kontrolni uzorci u vremenu nula su pripremani na isti način kao i stresirani uzorci, ali su analizirani sveži, odmah nakon pripremanja. Slepa proba je sadržavala sve komponente kao i stresirani uzorak, osim samog leka. Slepa proba je pripremana na isti način i analizirana u istim vremenskim tačkama kao i stresirani uzorak. U slučaju ispitivanja fotodegradacije, pripremana je i analizirana i tamna kontrola koja je služila za poređenje sa uzorkom koji je bio izložen fotodegradaciji. Ovi uzorci su pripremani na isti način i analizirani u istim vremenskim tačkama kao i stresirani uzorci, ali su tokom eksperimenta čuvani zaštićeni od svetlosti, da bi se sprečila fotodegradacija.

3.7.2. Validacija metode

Prethodno optimizovana LC–MS/MS metoda korišćena za analiziranje uzoraka dobijenih u studiji forsirane degradacije je validirana u skladu sa ICH Q2(R1) smernicom (ICH Q2(R1), 1994) za validaciju analitičkih metoda. Ispitivani su sledeći validacioni parametri: specifičnost, tačnost, preciznost, granica detekcije, granica kvantifikacije, linearnost, opseg i robusnost.

Specifičnost metode je određena izlaganjem leka stresu pod različitim uticajima (kiselina, baza, neutralna sredina, oksidacija, toplota i svetlost) i praćenjem dobijenih rezultata, tj. posmatrano je da li je lek hromatografski razdvojen od proizvoda degradacije. Pored stresiranog uzorka analizirani su i slepa proba i standardni rastvor leka da bi se ustanovilo da li se na retencionim vremenima analita i njegovih degradacionih proizvoda javljaju smetnje (Rao *et al.*, 2011; Patel *et al.*, 2015; Runje *et al.*, 2016).

Za određivanje tačnosti eksperiment je izveden u triplikatu na tri koncentracije (700, 1000 i 1300 ng mL⁻¹), što pokriva opseg 70–130% od testirane koncentracije u eksperimentima (ICH Q2(R1), 1994), a zatim je izračunat prinos dobijen poređenjem određene i tačne vrednosti koncentracije.

Preciznost metode je određena u istom eksperimentu zajedno sa tačnošću. Intra- i interdnevna preciznost metode su određene analiziranjem stresiranih uzoraka tri puta u toku istog dana, odnosno tokom tri uzastopna dana, i izračunavanjem RSD vrednosti.

Granica detekcije (LOD) i granica kvantifikacije (LOQ) su određene injektovanjem serije standardnih rastvora anizomicina u opsegu koncentracija $1\text{--}50\text{ ng mL}^{-1}$ i određivanjem koncentracija analita kojima odgovara vrednost odnosa signala i šuma 3:1, odnosno 10:1 (Luo *et al.*, 2015; Runje *et al.*, 2016).

Za određivanje linearnosti i opsega metode pripremljeno je sedam standardnih rastvora anizomicina različitih koncentracija u opsegu $700\text{--}1300\text{ ng mL}^{-1}$. Analiza je izvedena u triplikatu (Ramesh *et al.*, 2014; Rao *et al.*, 2014). Konstruisana je kalibraciona kriva kao zavisnost dobijene površine pika od odgovarajuće koncentracije. Koeficijent korelacije (R^2), odsečak i nagib kalibracione krive određeni su primenom linearne regresije.

Za utvrđivanje robusnosti metode varirani su sledeći parametri: sastav (udeo organskog rastvarača, $20 \pm 5\%$), protok ($0,8\text{--}1,0\text{ mL min}^{-1}$) i pH vrednost ($3,3 \pm 0,1$) mobilne faze, kao i temperatura kolone ($35 \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$). Eksperimenti su izvođeni u triplikatu na tri koncentracije ($700, 1000$ i 1300 ng mL^{-1}).

3.8. Elektrohemijska degradacija anizomicina

3.8.1. Korišćeni instrumenti

Za elektrohemijska merenja je korišćen PGZ 402 Volta Lab (Radiometer Analytical, Lyon, Francuska) potenciostat i staklena elektrohemijska ćelija sa tri elektrode. Kao radna elektroda je korišćena polikristalinična elektroda od zlata (površine $0,07\text{ cm}^2$), kao pomoćna elektroda je korišćena žica od zlata, dok je zasićena kalomelova elektroda (SCE) korišćena kao referentna elektroda. Svi potencijali su dati prema zasićenoj kalomelovoj elektrodi (*vs.* SCE). Polikristalinična elektroda od zlata je pre upotrebe polirana dijamantskom pastom i čišćena smešom sumporne kiseline i dejonizovane vode, a zatim čišćena dejonizovanom vodom u ultrazvučnom kupatilu. Pre svakog

eksperimenta radna elektroda je proveravana tako što je menjan potencijal u opsegu od $-0,45$ do $1,1$ V u elektrolitu natrijum-bikarbonatu ($0,05$ M NaHCO_3 ; $\text{pH} = 8,4$) pri brzini skeniranja od 50 mV s^{-1} dok se ne postignu stabilne CV karakteristike za elektrodu od zlata. Nakon čišćenja se elektroda prebacuje u elektrohemijsku ćeliju u kojoj se nalazi lek, a zatim se izvode eksperimenti. Elektroda je čišćena kako je prethodno opisano između snimanja svake od testiranih koncentracija leka. Pre dodavanja ispitivanih standardnih rastvora leka u ćeliju je uveden azot radi stvaranja inertne atmosfere. Svi eksperimenti su izvođeni na sobnoj temperaturi. Ciklična voltometrija je ispitivana u opsegu koncentracija anizomicina 1 – 250 ng mL^{-1} tokom 20 ciklusa i promenom brzine skeniranja od 20 do 140 mV s^{-1} . Takođe je vršena i dugotrajna ciklizacija tokom četiri sata pri brzini skeniranja 50 mV s^{-1} . Strukturna identifikacija anizomicina i proizvoda degradacije u $0,05$ M NaHCO_3 prilikom ciklizacije potencijala je vršena pomoću LC–MS/MS analize.

Voltometrija sa pravougaonim impulsima (SWV) je korišćena za kvantifikaciju leka u uzorcima sa i bez dodatka biološkog uzorka, tj. urina. Radni parametri koji su korišćeni da bi se dobio SWV voltamogram su: potencijal stepena 5 mV, amplituda pulsa 100 mV, frekvencija 2 Hz, brzina skeniranja 10 mV s^{-1} i vreme akumulacije 200 ms pri $0,0$ V. Kao komparativna metoda za identifikaciju i kvantifikaciju anizomicina korišćena je LC–MS/MS metoda. Za analizu su korišćeni Surveyor HPLC sistem i LTQ XL maseni spektrometar sa 2D jonskim trapom uz korišćenje ESI jonizacione tehnike u pozitivnom režimu rada.

3.8.2. Priprema uzoraka anizomicina za elektrohemijsko ispitivanje cikličnom voltametrijom i voltametrijom sa pravougaonim impulsima

Elektrohemijsko ispitivanje anizomicina je vršeno tako što je pripremljen svež osnovni rastvor leka u metanolu koncentracije 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a zatim su odgovarajuće zapremine rastvora leka dodavane u elektrolit (100 mL; $0,05$ M NaHCO_3) kako bi se dobile koncentracije u opsegu 1 – 250 ng mL^{-1} . Koncentracioni opseg anizomicina korišćen u elektrohemijskom eksperimentu je odabran na osnovu prethodno pronađenih koncentracija antibiotika u biološkim tečnostima (Cazorla-Reyes *et al.*, 2014).

Takođe je ispitivana elektrohemijska aktivnost anizomicina SWV metodom u prisustvu urina, tako što je u elektrolit dodavan 1 mL urina, a zatim je dodavan standard anizomicina i vršena je analiza kao u prethodnom eksperimentu. Za eksperimente sa dodatkom biološkog materijala, urin je sakupljen od 10 zdravih volontera. Ukupna koncentracija metanola u elektrohemijskoj ćeliji nije prelazila 4%. Elektrohemijska razgradnja anizomicina je izvedena cikličnim ponavljanjem potencijala u elektrolitu na elektrodi od zlata tokom različitih intervala vremena upotrebom aparature koja je opisana.

3.8.3. Pripremanje uzoraka za analizu LC–MS/MS metodom

Uzorak (5 mL) dobijen u elektrohemijskom eksperimentu je prečišćen korišćenjem Oasis HLB kertridža, prethodno kondicioniranog smešom dejonizovane vode i metanola. Nakon nanošenja uzoraka kertridži su sušeni na vakuumu 10 min, nakon čega je analit eluiran sa 5 mL metanola, uparen i rekonstituisan metanolom do 1 mL. Svaki uzorak je filtriran kroz 0,45 µm PVDF filter i analiziran LC–MS/MS metodom.

Uzorak (1 mL) dobijen u elektrohemijskom eksperimentu gde je dodat urin je pripreman tako što je 10 mL 5% rastvora TCA dodato uzorku. Nakon toga je smeša mešana tokom 2 min i centrifugirana 10 min na 5000 rpm . Dobijeni supernatant je prebačen na kertridž za prečišćavanje (Oasis HLB) prethodno kondicioniran 5% rastvorom TCA i metanolom. Kertridž je nakon nanošenja uzorka ispran sa 2 mL 5% rastvora TCA, osušen, a zatim je analit eluiran sa 10 mL metanola. Dobijeni eluat je uparen, rekonstituisan do 1 mL metanolom, profiltriran kroz 0,45 µm PVDF filter i analiziran LC–MS/MS metodom.

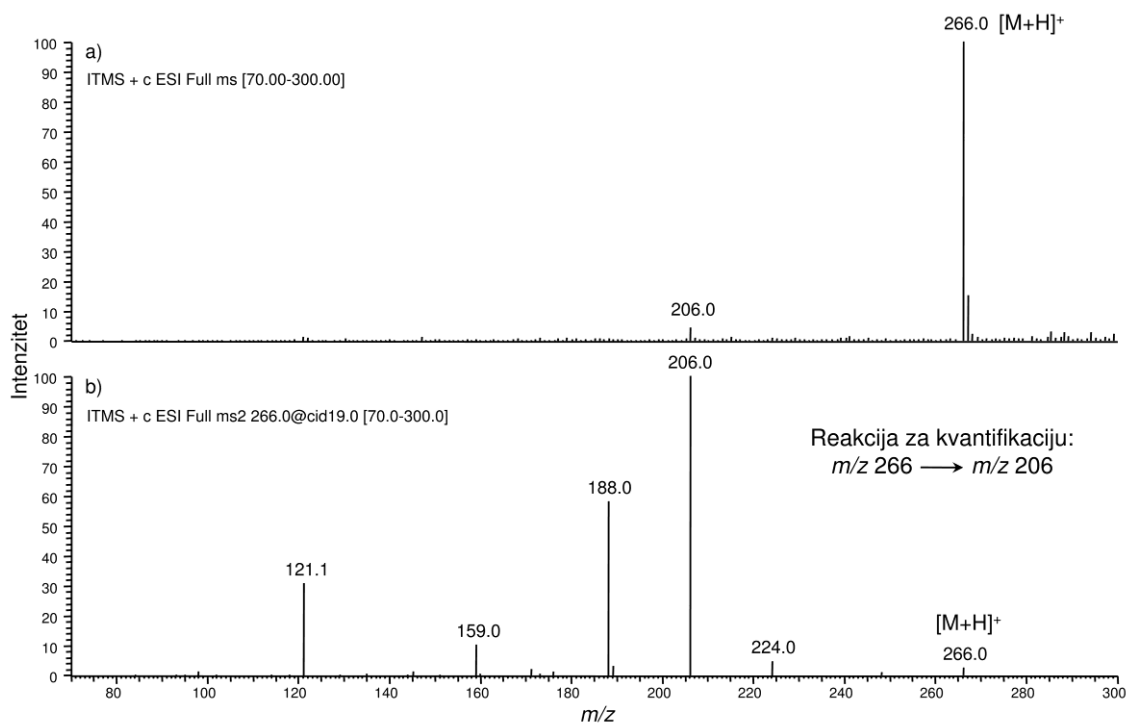
4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Maseni spektri anizomicina

Maseni spektri anizomicina snimljeni su korišćenjem LCQ Advantage 3D jonskog trapa i LTQ XL 2D jonskog trapa kao masenih spektrometara uz korišćenje ESI jonizacione tehnike u pozitivnom režimu rada. Korišćenjem LCQ Advantage jonskog trapa dobijeni su maseni spektri anizomicina na kojima se kao najintenzivniji jon izdvaja protonovani molekul anizomicina ($[M+H]^+$). Na osnovu MS analize je utvrđeno da je anizomicin potrebno analizirati kao pozitivan jon i da njegova identifikacija i kvantifikacija treba da se zasniva na izolovanju protonovanog molekula kao prekursor jona za dalju MS^n analizu. Dakle, najintenzivniji jon u spektru, protonovani molekul anizomicina sa vrednošću m/z 266 je odabran za prekursor jon (slika 21a).

Nakon odabira prekursor jona, u daljoj MS^n analizi je optimizovana kolizijska energija, tj. energija sudara sa atomima helijuma, za dobijanje stabilnih i intenzivnih fragmentnih jona. Dobijeni MS/MS spektar prikazan je na slici 21b, a rezultati ESI- MS^n analize su sumarno dati u tabeli 6. Kao što se na spektru može videti, fragmentacijom prekursor jona anizomicina nastaju fragmentni joni sa sledećim m/z vrednostima: 224, 206, 188, 159 i 121. Joni nastali MS/MS fragmentacijom se dalje fragmentišu (MS^3 analiza), pri čemu se dobijaju stabilni fragmenti, dok se MS^4 analizom ne može postići stabilna fragmentacija (tabela 6). Identični maseni spektri su dobijeni i korišćenjem LTQ XL jonskog trapa.

Na osnovu dobijenih rezultata, predložena je karakteristična reakcija fragmentacije prekursor jona u najintenzivniji i najstabilniji fragmentni jon. Dodatne MS^n reakcije mogu se koristiti za potvrdu prisustva anizomicina, tj. za potvrdu pozitivnih rezultata u realnim uzorcima.



Slika 21. a) Maseni spektar anizomicina i

b) MS/MS spektar anizomicina sa reakcijom fragmentacije odabranom za kvantifikaciju

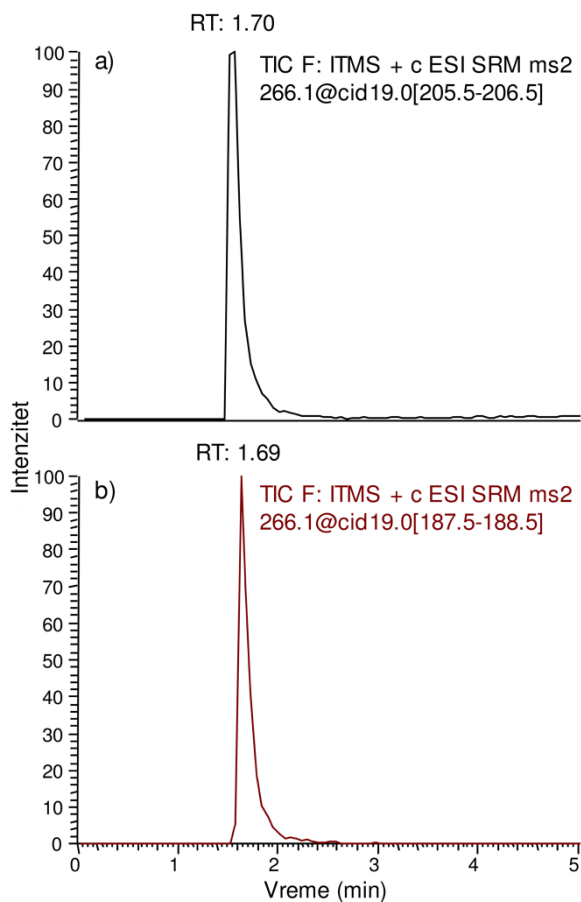
Tabela 6. MSⁿ reakcije fragmentacije anizomicina u jonskom trapu

MS	Koliziona energija (%)	MS ²	Koliziona energija (%)	MS ³	Koliziona energija (%)	MS ⁴					
266	19	206	30	121	33	93					
				188	—	—					
				159	—	—					
		188	31	121	33	93	—	—			
									159	—	—
									121	—	—
		159	—	224	24	206	30	121			
						188	31	121			
						121	33	93			
						159	—	—			

4.2. Optimizacija LC i LC–MS/MS parametara

Za optimizaciju hromatografske metode ispitivani su različiti sastavi mobilne faze sačinjene od dejonizovane vode, metanola ili acetonitrila, kao i od 10% vodenog rastvora sirćetne kiseline. Zbog polarnosti ispitivanog leka dolazi do brzog eluiranja ove komponente sa C₁₈ kolone. Uočeno je da ispitivani lek, bez obzira na sastav mobilne faze, ispoljava slab afinitet prema Zorbax Eclipse[®] XDB-C₁₈ hromatografskoj koloni i da se eluira sa kolone sa kratkim retencionim vremenom. Kako bi se povećalo retenciono vreme testirana je heptafluorobuterna kiselina, kao aditiv koji pospešuje stvaranje jonskih parova, u koncentraciji od 0,1% u mobilnoj fazi. Međutim, primena ovog reagensa nije uticala na zadržavanje analita na koloni. Takođe su pored Zorbax Eclipse[®] XDB-C₁₈ kolone (4,6 mm × 75 mm × 3,5 μm), testirane još dve hromatografske kolone: duža LiChrospher RP-18 EC kolona sa većim česticama (4,6 mm × 250 mm × 5 μm; Merck, Darmštat, Nemačka) i kraća Hypersil GOLD kolona sa manjim česticama (2,1 mm × 50 mm × 1,9 μm; Thermo Scientific, SAD). Ipak, najbolji rezultati su dobijeni sa Zorbax Eclipse[®] XDB-C₁₈ hromatografskom kolonom. Na pomeranje retencionog vremena najviše je uticalo povećanje sadržaja vode u mobilnoj fazi i smanjivanje protoka mobilne faze. Konačan sastav i protok mobilne faze prikazani su u tabeli 4 u poglavlju 3.3.

LC-MS/MS analizom dobijeni su SRM hromatogrami, tj. maseni hromatogrami odabranih reakcija fragmentacije. Karakteristični maseni hromatogrami dobijeni LC-MS/MS analizom standardnog rastvora leka anizomicina prikazani su na slici 22. Na osnovu masenih spektara snimljenih u struji optimalne mobilne faze predložena je reakcija fragmentacije prekursor jona u najintenzivniji fragmentni jon (m/z 206) za kvantifikaciju anizomicina u SRM načinu skeniranja (slika 22a). Praćenje fragmentacije prekursor jona u produkt jon m/z 188 (slika 22b), drugi po intenzitetu, je korišćeno za potvrdu prisustva leka. Kvantifikacija leka je vršena na osnovu površine pika analita na masenom hromatogramu.



Slika 22. a) SRM hromatogram za identifikaciju i kvantifikaciju anizomicina i
b) SRM hromatogram za potvrdu prisustva leka

4.3. Određivanje anizomicina u uzorcima biološkog materijala

4.3.1. Optimizacija postupka pripreme uzoraka biološkog materijala

Prilikom optimizacije metode pripreme za određivanje anizomicina iz bioloških uzoraka testirani su različiti rastvarači za ekstrakciju, pH vrednost ekstrakta, kao i kertridži za prečišćavanje uzorka. Rezultati optimizacije su predstavljeni na slici 23. Prilikom izbora optimalnog rastvarača za ekstrakciju anizomicina iz bioloških uzoraka testirana su tri rastvarača (metanol, 5% rastvor TCA i acetonitril) na tkivu srca. Najveći prinos je postignut korišćenjem metanola kao rastvarača za ekstrakciju (106%, slika 23), sa vrednošću RSD od 7%. Rastvor TCA se pokazao kao nešto manje efikasan u ekstrakciji anizomicina iz bioloških uzoraka (89%, RSD 3%) u poređenju sa metanolom. Acetonitril se pokazao kao najmanje efikasan pri ekstrakciji anizomicina iz bioloških

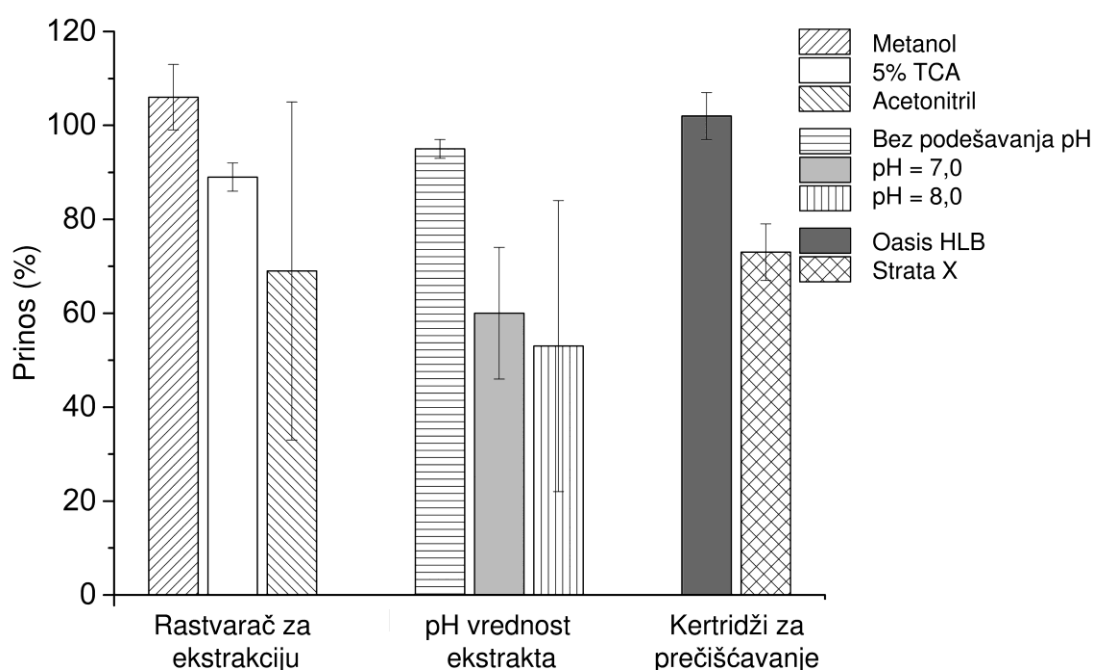
uzoraka, s obzirom na to da je pri njegovom korišćenju zapažen pad prinosa na 69%, kao i loša ponovljivost metode (RSD 36%). Konačno je odabrano da se kao optimalan rastvarač za ekstrakciju koristi metanol. Na osnovu literature (tabela 7), metanol uglavnom pokazuje dobru moć ekstrakcije (Berrada *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2014; Stariat *et al.*, 2014; Montesano *et al.*, 2016), dok su TCA (Cherlet *et al.* 2003; Zhu *et al.*, 2008; Kaufmann *et al.*, 2012) i acetonitril (Shao *et al.*, 2005; Dickson *et al.*, 2012; Macarov *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2012) nešto manje efikasni u ekstrakciji antibiotika iz različitih bioloških matrica, što je u skladu sa rezultatima dobijenim za anizomicin.

Tabela 7. Prinosi postignuti korišćenjem različitih rastvarača za ekstrakciju antibiotika iz bioloških matrica

Analit	Biološka matrica	Rastvarač za ekstrakciju	Prinos (%)	Literatura
Etambutol	Plazma	Metanol	94–101	Singh <i>et al.</i> , 2014
Tiosemikarbazoni	Plazma	Metanol	69–101	Stariat <i>et al.</i> , 2014
Aminoglikozidi, makrolidi	Mišići	Metanol	70–96	Berrada <i>et al.</i> , 2010
Marbofloksacin	Plazma	Metanol	93–96	Montesano <i>et al.</i> , 2016
Aminoglikozidi	Mišići, Bubrezi, Jetra	5% TCA	61–116	Zhu <i>et al.</i> , 2008
Tetraciklini	Mišići, Bubrezi, Jetra	0,1 M sukcinjska kiselina i 20% TCA	7–60	Cherlet <i>et al.</i> , 2003
Aminoglikozidi	Mišići, Bubrezi, Jetra	5% TCA	27–93	Kaufmann <i>et al.</i> , 2012
Penicilini	Mišići	Voda i acetonitril	50–101	Macarov <i>et al.</i> , 2012
Makrolidi	Bubreg	Acetonitril i 0,3 M fosfatni pufer	68–76	Dickson <i>et al.</i> , 2012
Sulfonamidi	Mišići, Bubrezi, Jetra	Acetonitril i heksan	52–120	Shao <i>et al.</i> , 2005
Sulfanilamidi, nitroimidazoli, hinoloni, makrolidi, linkozamidi, prazikvantel	Mišići	Acetonitril	21–121	Xie <i>et al.</i> , 2012

Nakon izbora rastvarača za ekstrakciju, testirane su različite pH vrednosti ekstrakta pre prečišćavanja, tj. pre nanošenja na SPE kertridž. U toku pripreme, nakon ekstrakcije metanolom, uparavanja i rekonstituisanja u 5% rastvoru TCA, pH vrednost dobijenog ekstrakta bila je 1,7. Podešavanje pH vrednosti rađeno je kako bi se pojačalo hidrofobno zadržavanje anizomicina na kertridžu za prečišćavanje, jer se očekuje smanjenje

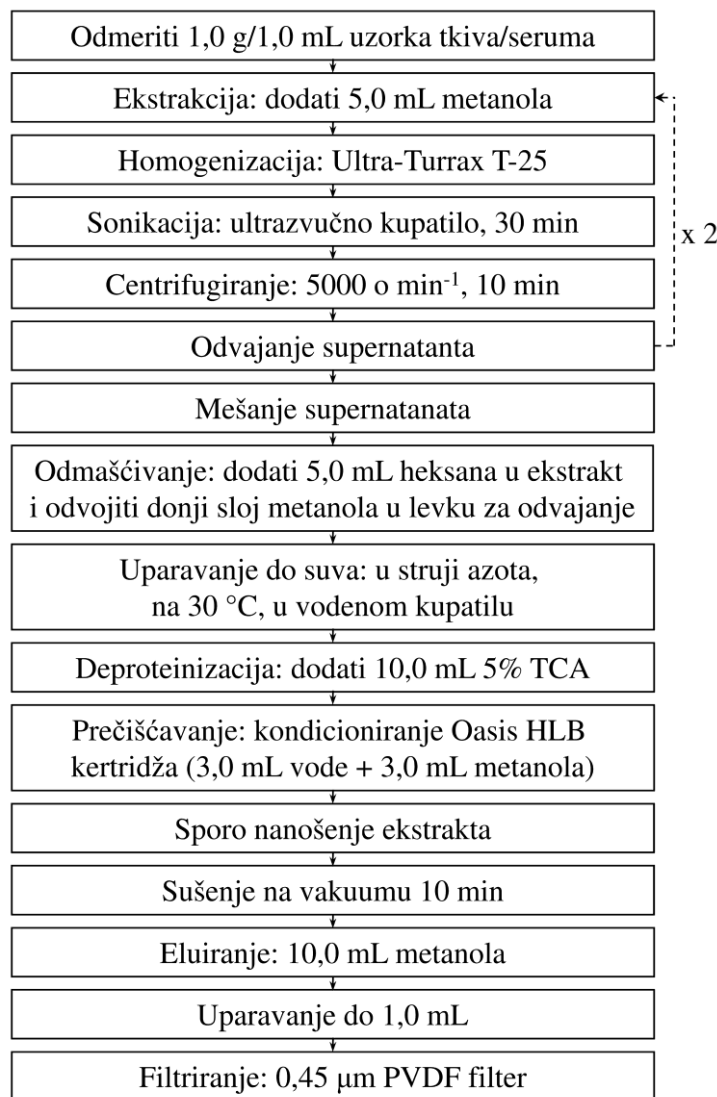
jonizacije analita pri pH vrednosti bliskoj njegovoj pK_a vrednosti (Koesukwiwat *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2008). Testirane su pH vrednosti 7,0 i 8,0 (pK_a vrednost anizomicina 7,9). Takođe je izveden eksperiment bez podešavanja pH vrednosti. Pokazano je da se najveći prinos anizomicina dobija bez podešavanja pH (95%, RSD 2%, slika 23). Prilikom podešavanja pH vrednosti na 7,0 (59%, RSD 9%) i 8,0 (54%, RSD 22%) došlo je do značajnog smanjenja prinosa. Rezultati pokazuju da je ekstrakcija anizomicina najefikasnija iz kisele sredine. Zapravo, u baznoj sredini dolazi do deprotonovanja anizomicina, tj. odlaska vodonika iz hidroksilne grupe na položaju 4 pirolidinovog prstena (slika 1), tako da se formira anjon i analit se nalazi u jonizovanom obliku koji se teže vezuje za adsorbens. U kiseljoj sredini se ravnoteža pomera u drugom smeru, tako da se analit nalazi u nejonizovanom obliku, što i utiče na to da se anizomicin bolje zadržava na kertridžu za prečišćavanje. Na osnovu dobijenih rezultata odabrano je da se ne podešava pH vrednost ekstrakta pre prečišćavanja.



Slika 23. Rezultati optimizacije metode pripreme uzoraka biološkog materijala

U narednom eksperimentu su testirani kertridži za prečišćavanje uzoraka. Pokazalo se da su prinosi značajno niži kada su korišćeni Strata X kertridži (73%, RSD 6%, slika 23) u poređenju sa HLB kertridžima (106%, RSD 5%). Na kraju je zaključeno da su optimalni uslovi za pripremu uzoraka biološkog porekla u cilju izdvajanja

anizomicina sledeći: korišćenje metanola kao rastvarača za ekstrakciju, bez podešavanja pH vrednosti ekstrakta uz korišćenje Oasis HLB kertridža za prečišćavanje. Konačan postupak pripreme uzoraka biološkog materijala za određivanje anizomicina prikazan je shematski na slici 24.



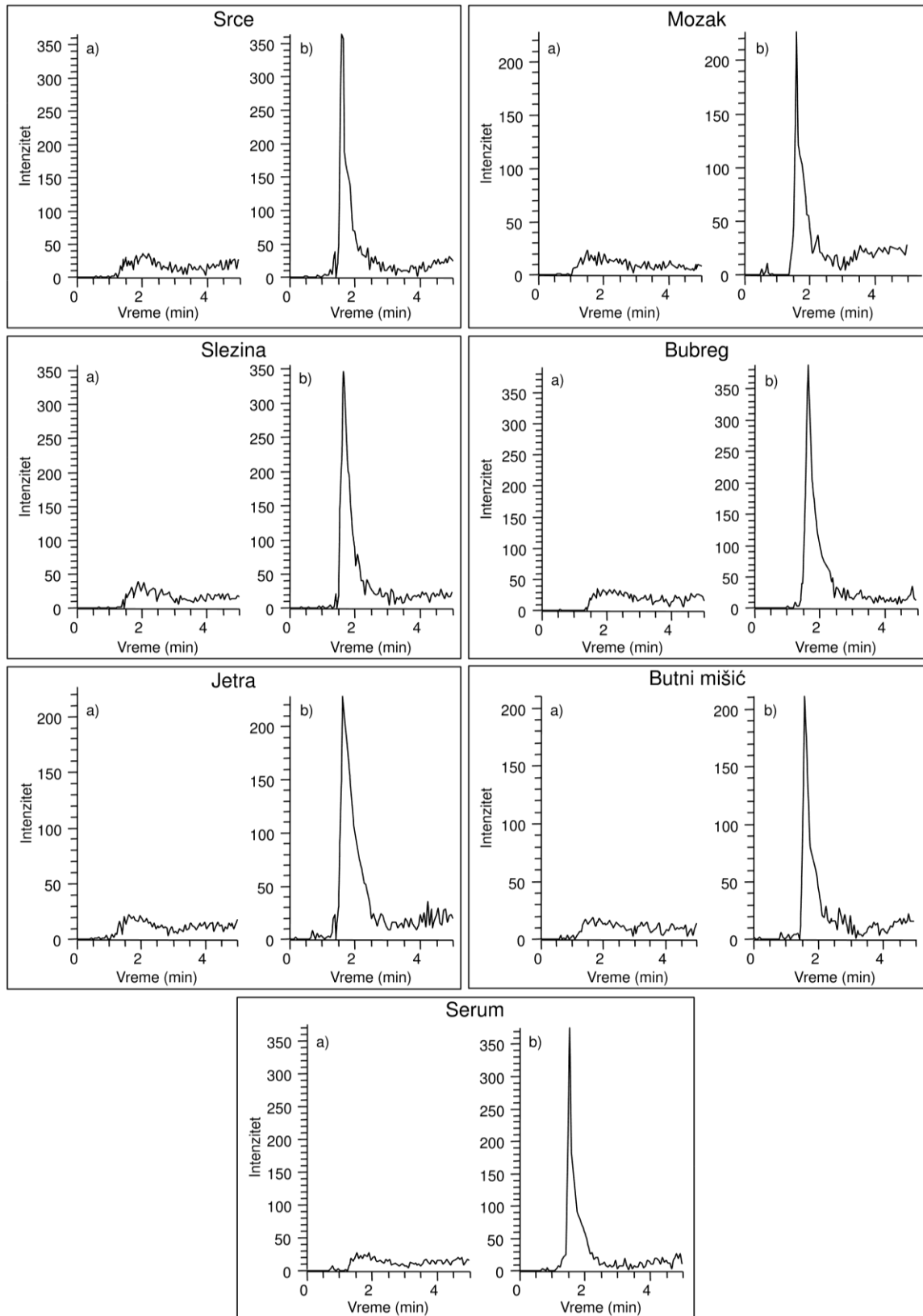
Slika 24. Shematski prikaz postupka pripreme uzoraka za ekstrakciju anizomicina iz biološkog materijala

4.3.2. Validacija metode

Izvršena je validacija prethodno razvijene i optimizovane metoda za određivanje prisustva anizomicina u tkivu svinjskog srca i na drugim svinjskim tkivima, kao što su mozak, slezina, bubrezi, jetra, butni mišić, kao i na serumu. Uzorcima je dodat standardni rastvor anizomicina tako da koncentracija analita u uzorcima iznosi LLOQ, 50, 100, 250, 500, 1000 i 2500 ng g⁻¹ za tkiva, odnosno LLOQ, 50, 100, 250, 500, 1000 i 2500 ng mL⁻¹ za serum. Validacija metode je izvršena u skladu sa pravilnikom za validaciju bioanalitičkih metoda Agencije za hranu i lekove SAD-a (FDA), pri čemu su određeni sledeći validacioni parametri: selektivnost, tačnost, preciznost, prinos, kalibraciona kriva, uticaj matrice i stabilnost leka (FDA, 2001).

Tipični SRM hromatogrami uzoraka slepe probe i kontrolnog (QC) uzorka pri LLOQ koncentraciji za svako tkivo i serum su prikazani na slici 25. Dobijeni hromatogrami jasno ukazuju na selektivnost metode. Nisu primećene interference iz biološkog materijala na retencionom vremenu anizomicina.

Rezultati dobijeni za intra- i interdnevnu tačnost i preciznost metode su predstavljeni u tabeli 8. Intra- i interdnevna tačnost metode za sve ispitivane biološke materijale je bila u okviru prihvatljivih opsega. Izračunate vrednosti RE su bile manje od 15% i za intra- i za interdnevne eksperimente, što ukazuje na zadovoljavajuću tačnost metode, tj. na sličnost određene i prave vrednosti koncentracije analita. Određena preciznost metode je bila u skladu sa FDA pravilnikom (FDA, 2001), za sve vrste tkiva i serum. Proračunate vrednosti intra- i interdnevne preciznosti su bile do 9%, odnosno 11%, što ukazuje na slične vrednosti individualnih merenja.



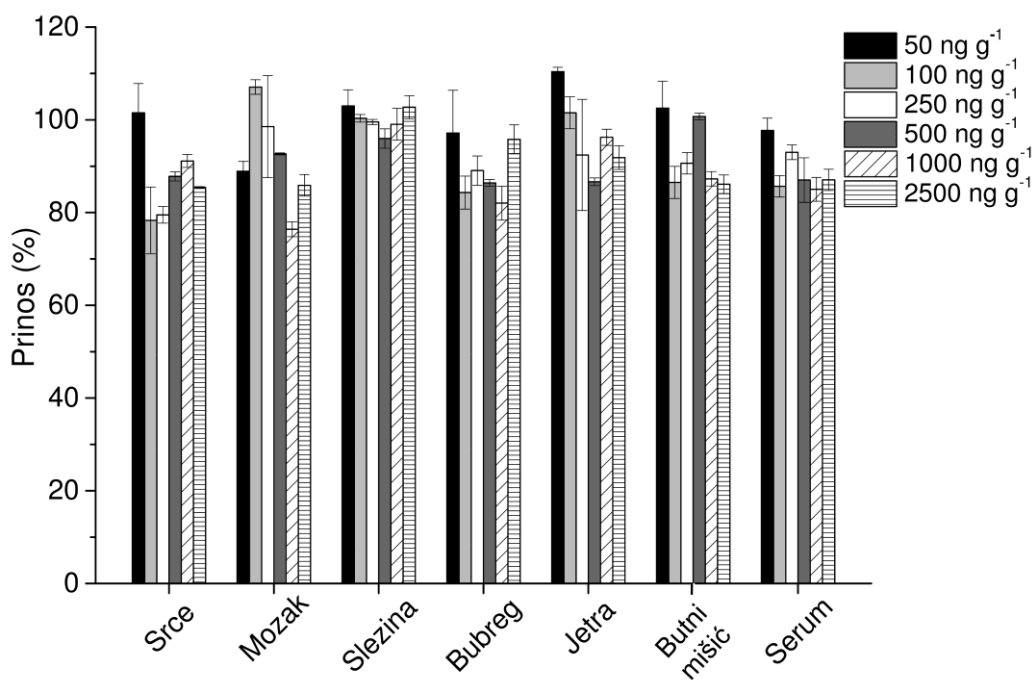
Slika 25. SRM hromatogrami: a) slepe probe i b) QC uzoraka pri LLOQ koncentraciji za šest ispitivanih tkiva i serum

Tabela 8. Intra- i interdnevna tačnost i preciznost i uticaj matrice za šest različitih tkiva i serum

Tkivo	Koncentracija (ng g ⁻¹)	Intradnevna		Interdnevna		Uticaj matrice (%)
		Tačnost (RE, %)	Preciznost (%)	Tačnost (RE, %)	Preciznost (%)	
Srce	LLOQ	1	2	6	8	
	50	4	6	3	9	-2
	500	-11	3	-12	2	-10
	2500	-15	2	-14	3	-5
Mozak	LLOQ	-1	5	-3	6	
	50	-10	1	-9	5	-23
	500	-8	2	-11	3	-33
	2500	-14	3	-15	4	-25
Slezina	LLOQ	1	7	4	2	
	50	3	4	5	3	-36
	500	-5	2	-8	1	-40
	2500	3	2	4	2	-34
Bubreg	LLOQ	2	4	-4	6	
	50	-4	9	-1	10	-19
	500	-13	2	-14	6	-27
	2500	-4	1	-7	2	-20
Jetra	LLOQ	1	4	-3	8	
	50	10	3	13	1	-17
	500	-14	1	-15	2	-32
	2500	-7	3	-12	3	-21
Butni mišić	LLOQ	3	6	-3	10	
	50	2	6	9	11	-49
	500	1	1	3	5	-40
	2500	-14	2	-15	1	-46
Serum ^a	LLOQ	-14	1	-12	5	
	50	-15	3	-10	3	-10
	500	-13	1	-12	5	-5
	2500	-13	2	-15	1	-9

^aKoncentracija u ng mL⁻¹

Dobijeni su visoki prinosi anizomicina iz različitih tkiva i seruma pri šest testiranih koncentracija primenom optimizovane procedure ekstrakcije (slika 26): srce (78–102%), mozak (76–107%), slezina (99–103%), bubreg (82–96%), jetra (87–110%), butni mišić (86–103%) i serum (85–98%). Izračunate RSD vrednosti prinosa metode bile su manje od 12% za sve biološke materijale i sve testirane koncentracije, što pokazuje da je metoda precizna i reproduktivna, kao što se i zahteva FDA pravilnikom (FDA, 2001).



Slika 26. Prinosi anizomicina iz šest različitih tkiva i seruma na šest koncentracija u opsegu 50–2500 ng g⁻¹ ($n = 3$)

Određeno je da je kalibraciona kriva linearna u ispitivanom opsegu koncentracija (LLOQ–2500 ng g⁻¹), pri čemu su dobijeni korelacioni koeficijenti u opsegu od 0,990 za butni mišić do 0,996 za tkivo srca (tabela 9), što ukazuje na zadovoljavajuću linearnost metode za sve testirane biološke materijale u ispitivanom opsegu koncentracija.

Primenom razvijene metode dobijene su niske vrednosti LLOQ (1,0–11,0 ng g⁻¹, tabela 9) i LOD (0,3–3,3 ng g⁻¹) za sve uzorke biološkog materijala, što pokazuje da je

metoda osjetljiva i pogodna za određivanje tragova anizomicina u različitim tkivima i serumu.

Tabela 9. Validacioni parametri dobijeni za šest različitih tkiva i serum

Tkivo	Jednačina linearne regresije	R^2	LLOQ (ng g ⁻¹)	LOD (ng g ⁻¹)
Srce	$y = 45,1x + 68,6$	0,996	2,7	0,8
Mozak	$y = 41,9x + 3086,0$	0,994	5,7	1,7
Slezina	$y = 13,7x + 996,6$	0,995	11,0	3,3
Bubreg	$y = 43,5x + 1249,0$	0,993	4,7	1,4
Jetra	$y = 98,1x + 2001,0$	0,992	3,7	1,1
Butni mišić	$y = 30,6x + 73,6$	0,990	6,0	1,8
Serum ^a	$y = 57,7x + 1184,0$	0,993	1,0	0,3

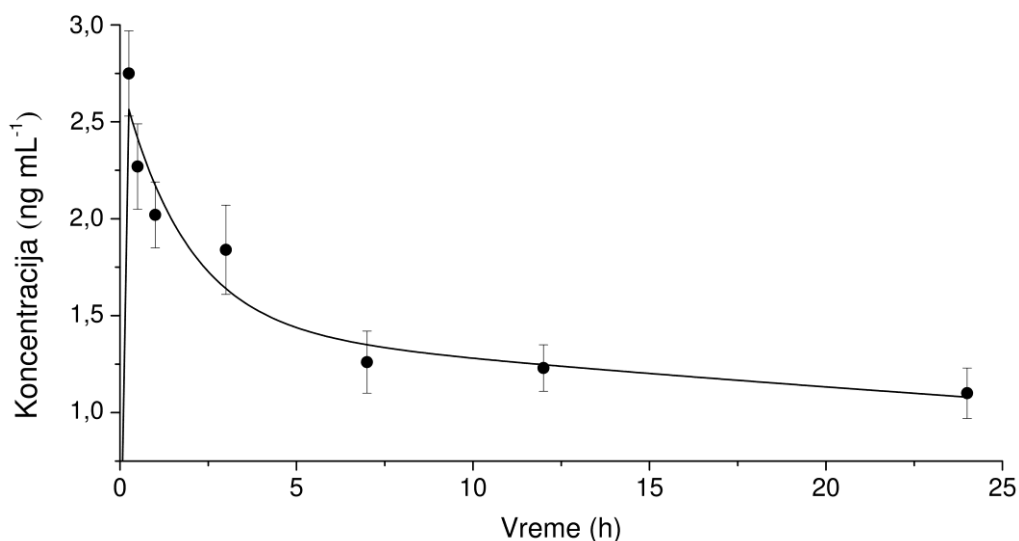
^aLLOQ i LOD u ng mL⁻¹

Što se tiče uticaja matrice, utvrđeno je da komponente biološkog materijala izazivaju supresiju signala anizomicina. Zapravo, uticaj matrice je najizraženiji za butni mišić (do 49%, tabela 8). U slučaju uzoraka srca i seruma, supresija signala je bila najmanje izražena (do 10%, tabela 8). Zbog ustanovljenog uticaja matrice, korišćena je eksterna kalibracija sa MM standardima u cilju tačne kvantifikacije.

Ispitivanjem stabilnosti utvrđeno je da je anizomicin bio stabilan tokom 15 dana kada su QC uzorci čuvani na -80 °C. Takođe, anizomicin je stabilan i nakon pripreme uzoraka, kada su uzorci čuvani u autoinjektoru tokom 12 h na 20 °C. Dodatno, nije došlo do značajne degradacije standardnog rastvora anizomicina ni tokom čuvanja u frižideru na 4 °C tokom 15 dana. Za sva tri eksperimenta gubitak anizomicina nije bio veći od 11%.

4.3.3. Ispitivanje raspodele i određivanje farmakokinetičkih parametara leka u *in vivo* studiji

Razvijena i validirana metoda je primenjena u *in vivo* studiji za ispitivanje raspodele anizomicina i određivanje farmakokinetičkih parametara u tkivima (srce, mozak, slezina, bubrezi, jetra i butni mišić) i serumu Wistar albino pacova nakon potkožnog injektovanja 150 mg kg^{-1} leka. Slika 27 predstavlja promenu koncentracije anizomicina sa vremenom u serumu pacova. Iz ove zavisnosti određena je maksimalna koncentracija anizomicina u serumu ($2,5 \pm 0,1 \text{ ng ml}^{-1}$) koja je postignuta nakon $0,25 \pm 0,02 \text{ h}$ od primene leka. Može se zaključiti da je apsolutna vrednost koncentracije anizomicina u serumu prilično niska u poređenju sa koncentracijama antibiotika u serumu u većini sličnih studija, ali postoji i manji broj studija u kojima su pronađene slične niske vrednosti koncentracija (Zha *et al.*, 2007; Urva *et al.*, 2009; Roy *et al.*, 2010). Određeno je da je srednje vreme zadržavanja anizomicina u serumu $10,81 \pm 2,45 \text{ h}$, dok je poluvreme eliminacije $6,50 \pm 1,10 \text{ h}$. Određeno poluvreme eliminacije anizomicina je među nižim vrednostima u poređenju sa vremenima za druge antibiotike, u zavisnosti od tipa antibiotika i puteva primene. Za druge antibiotike su pronađene vrednosti poluvremena eliminacije u opsegu od 2 do 66 h (Davis *et al.*, 2005; Urva *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2012; Wyns *et al.*, 2014). Dobijena je niska vrednost konstante brzine eliminacije (β), što ukazuje na sporu eliminaciju anizomicina iz seruma u terminalnoj fazi. Mera ukupne količine anizomicina u serumu (PIK) tokom vremena iznosila je $32,06 \pm 2,33 \text{ ng h L}^{-1}$. Određena je vrednost klirensa (CL) u serumu od $1,10 \pm 0,10 \text{ L h}^{-1}$. Može se reći da je dobijena vrednost uporediva sa vrednostima CL dobijenim za gamitromicin ($1,69 \text{ L h}^{-1}$) i tiosemikarbazon ($1,19 \text{ L h}^{-1}$) (Stariat *et al.*, 2014; Wyns *et al.*, 2014) i nešto veća u poređenju sa vrednostima CL za druge antibiotike ($0,008\text{--}0,234 \text{ L h}^{-1}$) (Rao *et al.*, 2012; Bijleveld *et al.*, 2014; Li i Bu, 2014; Yao *et al.*, 2017).



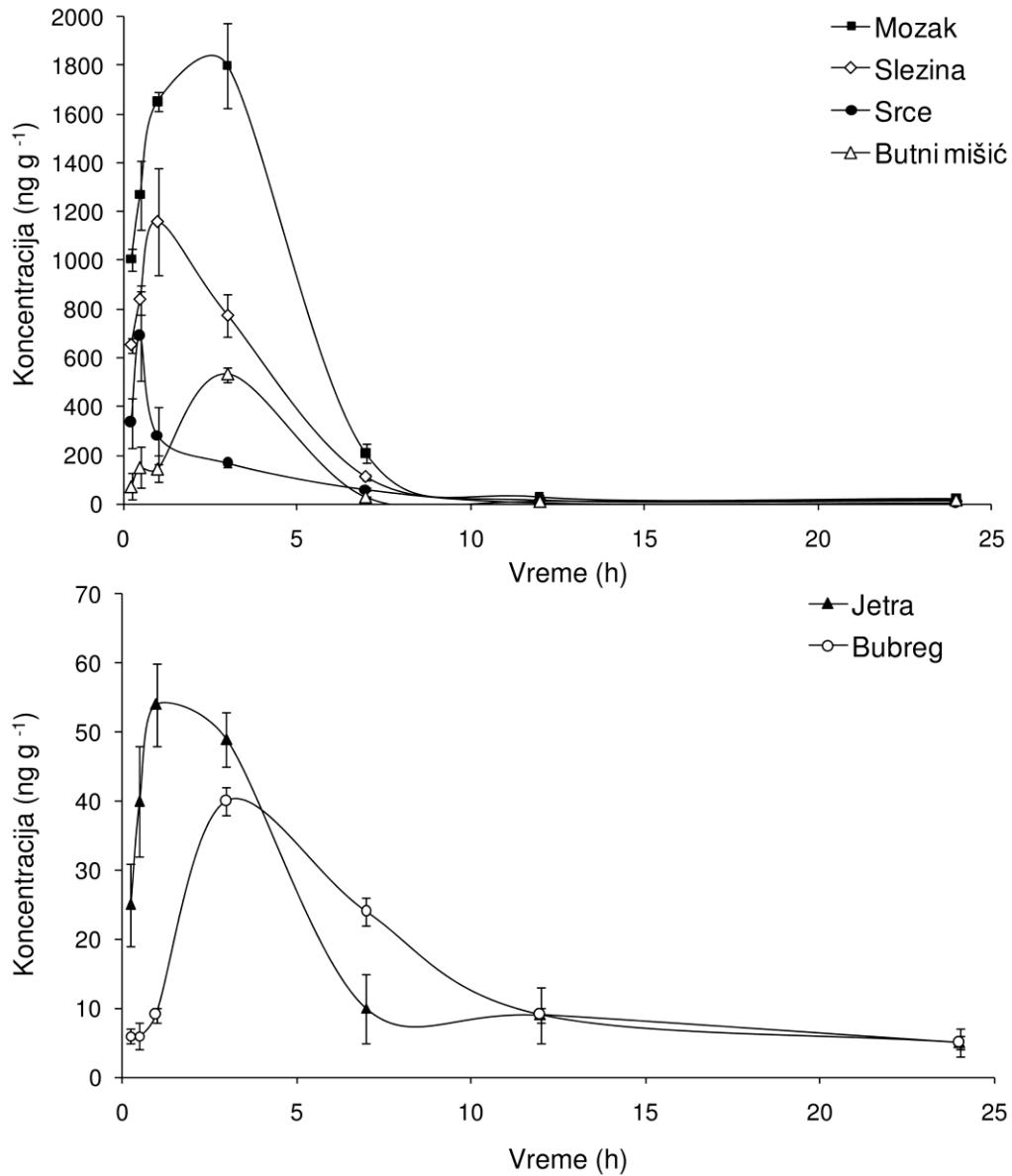
Slika 27. Promena srednje vrednosti koncentracije anizomicina sa vremenom u serumu pacova nakon injektovanja 150 mg kg^{-1} ($n = 3$)

Tabela 10 i slika 28 pokazuju raspodelu anizomicina u analiziranim tkivima Wistar albino pacova u različitim vremenskim tačkama nakon primene leka. Podaci za sva tkiva ukazuju na isti trend relativno brze apsorpcije i postepene eliminacije. Pri tome se maksimalne koncentracije anizomicina postižu do tri sata od primene. Razlike koncentracija u tkivima su prilično velike kada se porede sa drugim antibioticima (Shin *et al.*, 2003; Arnold *et al.*, 2004; Zha *et al.*, 2007; Urva *et al.*, 2009; Roy *et al.*, 2010).

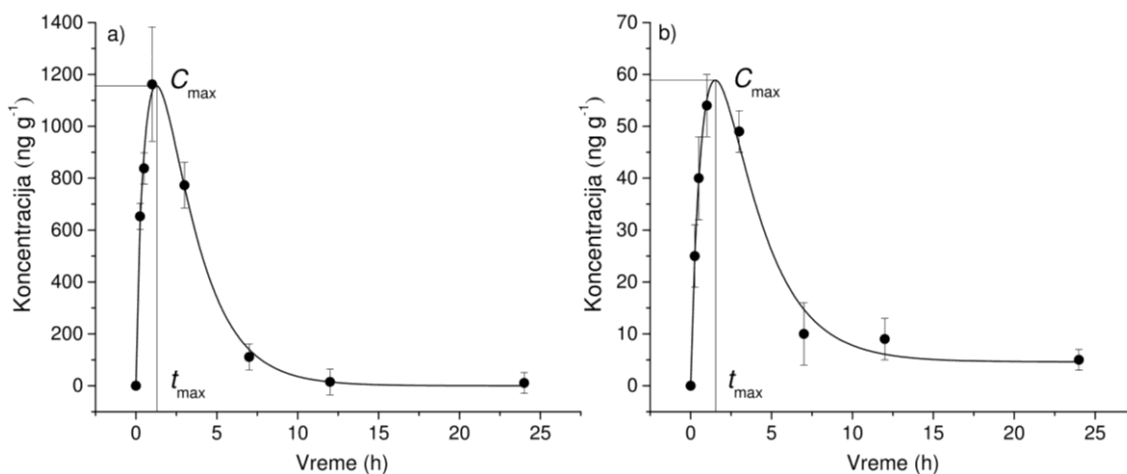
Tabela 10. Koncentracija anizomicina u tkivima pacova u različitim vremenskim tačkama nakon primene leka ($n = 3$)^a

Tkivo	Koncentracija \pm SD (ng g ⁻¹)						
	0,25 h	0,50 h	1 h	3 h	7 h	12 h	24 h
Mozak	1005 \pm 46	1267 \pm 141	1652 \pm 39	1799 \pm 175	207 \pm 40	29 \pm 6	22 \pm 0
Slezina	653 \pm 30	838 \pm 60	1162 \pm 220	773 \pm 88	111 \pm 13	15 \pm 8	11 \pm 5
Srce	332 \pm 105	689 \pm 185	283 \pm 117	164 \pm 14	60 \pm 7	4 \pm 0	3 \pm 1
Butni mišić	73 \pm 52	150 \pm 83	143 \pm 54	531 \pm 30	28 \pm 1	10 \pm 1	18 \pm 1
Jetra	25 \pm 6	40 \pm 8	54 \pm 6	49 \pm 4	10 \pm 5	9 \pm 4	5 \pm 1
Bubreg	6 \pm 1	6 \pm 2	9 \pm 1	40 \pm 2	24 \pm 2	9 \pm 1	5 \pm 2

^a n : broj merenja



Slika 28. Raspodela anizomicina u analiziranim tkivima pacova tokom 24 h nakon primene leka ($n = 3$)



Slika 29. Fitovanje podataka prema neprostornom modelu za a) slezinu i b) jetru sa obeleženim parametrima koji se mogu dobiti direktno sa krive (C_{\max} i t_{\max})

Iz ovih podataka se mogu izvući određeni zaključci, ali se do detaljnije analize dolazi kada se podaci fituju prema modelu koji se najčešće koristi u sličnim studijama. Na slici 29 je predstavljeno fitovanje podataka prema neprostornom modelu za dva odabrana organa. Za slezinu je pokazano dobro slaganje sa modelom, s obzirom na to da sve eksperimentalne tačke leže na krivoj. Međutim, u slučaju jetre nije dobijeno tako dobro slaganje, što ukazuje na to da se eksperimentalni podaci bez modelovanja ne mogu koristiti za određivanje farmakokinetičkih parametara. Iz ovog razloga je izvršeno fitovanje rezultata prema neprostornom modelu za sva ispitivana tkiva.

Rezultati dobijeni iz fitovanja podataka prema odgovarajućem modelu za sva ispitivana tkiva su prikazani u tabeli 11. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je najbrža akumulacija anizomicina postignuta u srcu ($t_{\max} = 0,46$ h), dok je u slučaju bubrega bilo potrebno najviše vremena da se postigne maksimalna koncentracija (2,88 h). U drugim tkivima je maksimalna koncentracija postignuta u približno isto vreme. Tačnije, maksimalne koncentracije u tkivima su postizane između 1,26 h za slučaj slezine i 1,92 h za slučaj butnog mišića. U poređenju sa drugim studijama, približno isto vreme za postizanje maksimalne koncentracije je primećeno u slučaju fluorohinolona za većinu tkiva (od 0,45 h do 1,0 h) (Shin *et al.*, 2003).

Tabela 11. Maksimalna koncentracija i vreme njenog postizanja dobijeni u *in vivo* studiji raspodele anizomicina u Wistar albino pacovima (potkožno injektovanje 150 mg kg⁻¹)

Tkivo	C_{max} (ng g ⁻¹)	t_{max} (h)
Mozak	1748 ± 183	1,37 ± 0,42
Slezina	1156 ± 123	1,26 ± 0,39
Srce	652 ± 69	0,46 ± 0,15
Butni mišić	553 ± 59	1,92 ± 0,57
Jetra	58 ± 8	1,51 ± 0,45
Bubreg	40 ± 4	2,88 ± 0,92

C_{max} : maksimalna koncentracija leka; t_{max} : vreme potrebno da se postigne C_{max}

Takođe, teško je porediti podatke dobijene za anizomicin sa drugim studijama raspodele lekova s obzirom na to da su ispitivanja često izvođena u tri vremenske tačke (Zha *et al.*, 2007; Roy *et al.*, 2010) ili čak samo jednoj (Urva *et al.*, 2009). Međutim, može se zaključiti da je relativna distribucija leka gotovo nezavisna od vremena uzorkovanja, što se može primetiti i na osnovu tabele 10. Iz ovog razloga, raspodele antibiotika dobijene u različitim studijama u različitim vremenima eksperimenta mogu se upoređivati (tabela 12). Iz ovog pregleda se može zaključiti sledeće: jetra i/ili slezina su organi gde se najčešće postiže maksimalna akumulacija leka u svim razmatranim studijama, dok se u mozgu akumulira zanemarljiva količina antibiotika. Rezultati ispitivanja u slučaju anizomicina su pokazali da je raspodela leka prilično različita od očekivane raspodele antibiotika na osnovu pregleda literature (tabela 12). Tačnije, u slučaju anizomicina je najviša vrednost C_{max} postignuta u mozgu (1748 ng g⁻¹, tabela 11), dok je najniža vrednost postignuta u bubregu (40 ng g⁻¹).

Tabela 12. Raspodela različitih antibiotika u životinjskim tkivima

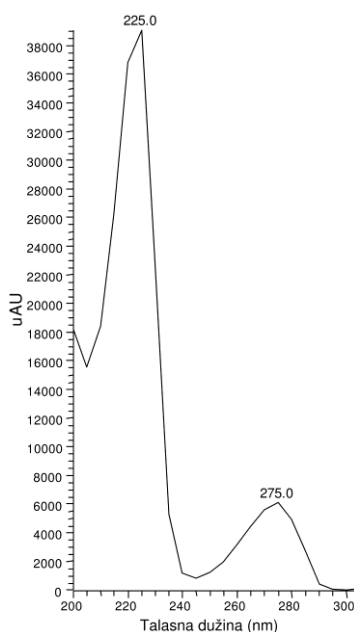
Antibiotik	Vreme analize (h)	Raspodela u tkivima	Literatura
Doksorubicin	72	Slezina > jetra > bubreg > srce > mišić > mozak	Urva <i>et al.</i> , 2009
Doksorubicin	8	Slezina > jetra > srce > mozak	Arnold <i>et al.</i> , 2004
Gemifloksacin	3	Jetra > bubreg > srce > mozak	Roy <i>et al.</i> , 2010
Roksitromicin	3	Jetra > slezina > bubreg > srce > mišić > mozak	Zha <i>et al.</i> , 2007
Fluorohinolon	0,5–1	Jetra > bubreg > slezina > srce > mozak	Shin <i>et al.</i> , 2003

U skladu sa maksimalno postignutim koncentracijama, mera ukupne količine anizomicina u tkivu tokom vremena (PIK_{0-24}) je bila najviša u slučaju mozga (7564 h ng g^{-1}), a najniža u bubregu (354 h ng g^{-1}). Najviša koncentracija anizomicina pronađena u mozgu je u skladu sa činjenicom da je primarno mesto delovanja ovog leka upravo mozak gde se odvija inhibicija sinteze proteina (Nader *et al.*, 2000; Gur *et al.*, 2014). Dobijeni rezultati ukazuju na to da veći deo anizomicina odlazi upravo u njegov ciljani organ. Sličan nivo akumulacije leka u mozgu je primećen za neke antipsihotike (Tasso *et al.*, 2005). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se u tkivima uspostavlja sledeća raspodela anizomicina: mozak > slezina > srce > butni mišić > jetra > bubrezi.

4.4. Studija forsirane degradacije

4.4.1. Optimizacija hromatografskih parametara

Na samom početku snimljen je UV spektar osnovnog standardnog rastvora anizomicina u metanolu koncentracije $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ u opsegu 200–600 nm, korišćenjem PDA detektora. S obzirom na to da su dobijena dva apsorpciona maksimuma anizomicina na 225 nm i 275 nm (slika 30), snimanje UV spektara vršeno je na talasnoj dužini od 225 nm. PDA detektor je izabran da bi se tokom ispitivanja proveravala čistoća pikova svih eluiranih analita.



Slika 30. UV spektar anizomicina

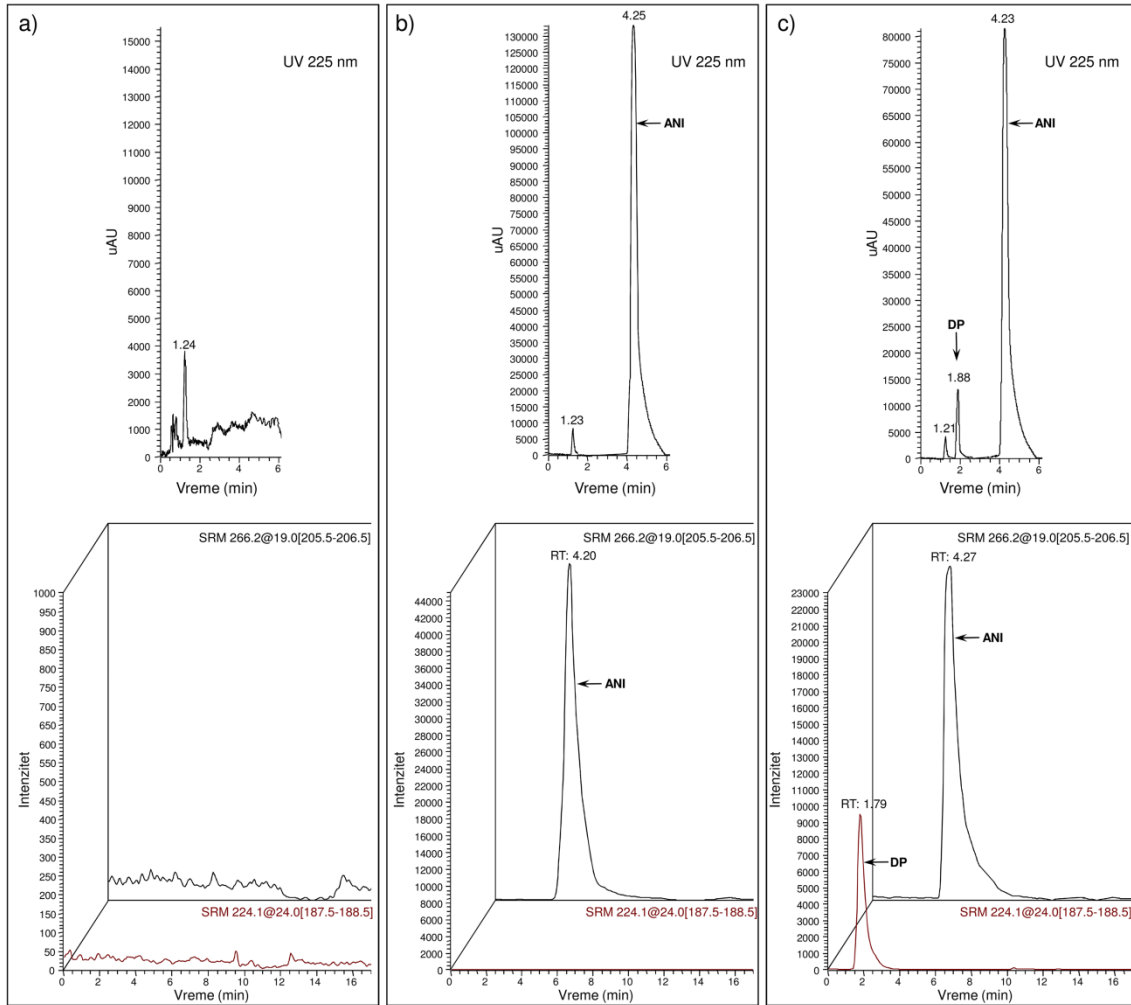
Za optimizaciju hromatografske metode korišćeni su uzorci anizomicina prethodno izloženi određenom stresu, tako da se u uzorku već nalazi degradacioni proizvod. Za hromatografsko razdvajanje anizomicina i degradacionog proizvoda primenjena je već razvijena hromatografska metoda za određivanje anizomicina u uzorcima biološkog materijala. Ova metoda je delimično izmenjena, a retencionna vremena posmatranih analita su optimizovana povećanjem sadržaja vode u mobilnoj fazi kako bi se produžilo retenciono vreme anizomicina. Konačno, sastav mobilne faze tokom studije forsirane degradacije je bio sledeći: 79% voda, 20% metanol i 1% rastvor sirćetne kiseline

koncentracije 10%. Takođe je variran i protok mobilne faze u opsegu 0,4–1,0 mL min⁻¹. Kao optimalan, dobijen je protok mobilne faze od 0,9 mL min⁻¹. Optimizovana hromatografska metoda je tabelarno predstavljena u poglavlju 3.3 (tabela 5).

4.4.2. Validacija metode

U cilju validacije LC-MS/MS metode za određivanje anizomicina u studiji forsirane degradacije ispitivani su sledeći parametri: specifičnost, tačnost, preciznost, granica detekcije, granica kvantifikacije, linearnost, opseg i robusnost u skladu sa ICH Q2(R1) smernicom. Specifičnost metode je određena analizom anizomicina u prisustvu stres agenasa i degradacionog proizvoda. Poređenjem snimljenih LC-UV i LC-MS/MS hromatograma slepe probe, stresiranog uzorka i standardnog rastvora primećeno je da je anizomicin razdvojen od proizvoda degradacije (slika 31c). Na hromatogramima dobijenim za slepu probu (slika 31a) i standardni rastvor anizomicina (slika 31b) se ne uočavaju smetnje na retencionom vremenu leka ili njegovog proizvoda degradacije, što nedvosmisleno potvrđuje specifičnost metode.

Rezultati dobijeni za tačnost i intra- i interdnevnu preciznost pri testiranim koncentracijama (tabela 13) ukazuju na zadovoljavajuću tačnost i pouzdanost metode. Prinos anizomicina u prisustvu stres agenasa i degradacionog proizvoda bio je u opsegu od 98,8 do 100,5%. RSD vrednosti intra- (0,3–1,6%) i interdnevne (2,8–4,1%) preciznosti pokazuju dobru ponovljivost metode.



Slika 31. LC–UV i LC–MS/MS hromatogrami: a) slepe probe, b) standardnog rastvora anizomicina (ANI) i c) stresiranog uzorka u slučaju neutralne hidrolize sa degradacionim proizvodom (DP)

Tabela 13. Tačnost ($n = 3$) i preciznost ($n = 9$) metode

Konzentracija (ng mL ⁻¹)	Tačnost		Intradnevna preciznost	Interdnevna preciznost
	Proračunata dodata koncentracija ± SD ^a (ng mL ⁻¹); RSD (%)	Prinos (%)	Izmerena koncentracija ± SD (ng mL ⁻¹); RSD (%)	Izmerena koncentracija ± SD (ng mL ⁻¹); RSD (%)
700	691,5 ± 33,4; 4,8	98,8	701,4 ± 1,9; 0,3	682,0 ± 22,4; 3,3
1000	997,4 ± 13,9; 1,4	99,7	990,2 ± 13,9; 1,4	1013,3 ± 41,3; 4,1
1300	1306,3 ± 64,0; 4,9	100,5	1315,1 ± 21,3; 1,6	1334,6 ± 36,9; 2,8

^aSD: standardno odstupanje (eng. *standard deviation*)

Određena vrednost LOD bila je $2,5 \text{ ng mL}^{-1}$, a vrednost LOQ bila je $8,3 \text{ ng mL}^{-1}$. Dobijene niske vrednosti granice detekcije i granice kvantifikacije pokazuju da je testirana metoda za određivanje anizomicina vrlo osetljiva. Takođe je dobijena i dobra linearnost u testiranom opsegu koncentracija $700\text{--}1300 \text{ ng mL}^{-1}$. Određen je koeficijent korelacije (R^2) sa vrednošću od 0,9961.

Rezultati dobijeni pri ispitivanju robusnosti metode, pri čemu su menjani udeo organskog rastvarača u mobilnoj fazi (od 15% do 25%), protok mobilne faze (od $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ do $1,0 \text{ mL min}^{-1}$) i njena pH vrednost (od 3,2 do 3,4), kao i temperatura kolone (od $30 \text{ }^\circ\text{C}$ do $40 \text{ }^\circ\text{C}$), su predstavljani u tabeli 14. Određene su RSD vrednosti na tri koncentracije za sve eksperimente i dobijene su vrednosti u opsegu od 2,1% do 7,4%. S obzirom na to da su uočene male i zanemarljive promene posmatranih vrednosti, može se zaključiti da je metoda robusna.

Tabela 14. Robusnost metode

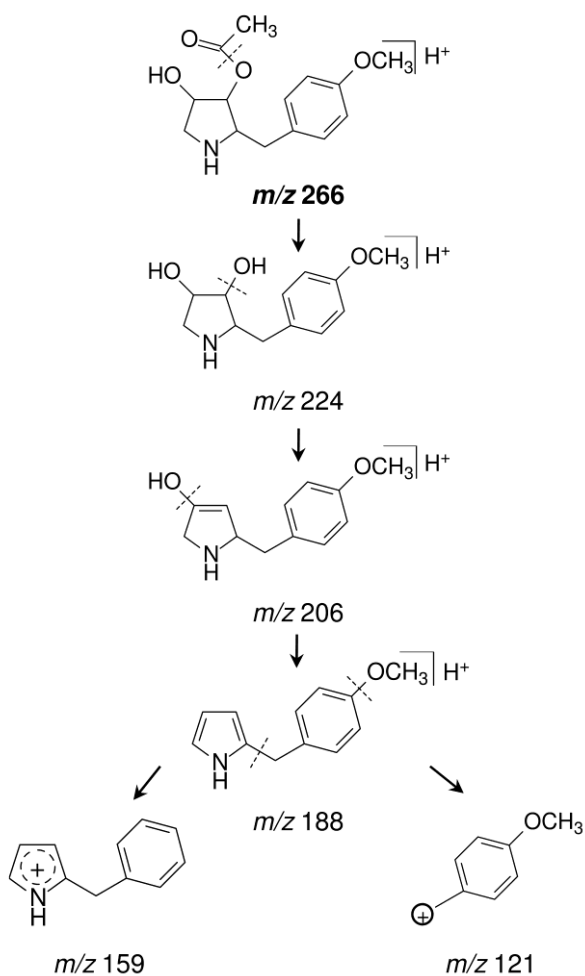
Koncentracija (ng mL^{-1})	Organski rastvarač	Protok	pH vrednost	Temperatura kolone	RSD (%)
700	7,2	6,2	5,8	2,1	
1000	7,0	5,1	5,5	2,2	
1300	7,4	5,6	6,4	2,4	

Vrednosti validacionih parametara: specifičnosti, tačnosti, preciznosti, granice detekcije, granice kvantifikacije, linearnosti, opsega i robusnosti, koje su u skladu sa unapred definisanim kriterijumima za validaciju metode, ukazuju na to da validirana LC-MS/MS metoda odgovara njenoj planiranoj nameni za određivanje anizomicina i njegovih degradacionih proizvoda u studiji forsirane degradacije.

4.4.3. Put fragmentacije anizomicina

Kao što je već ustanovljeno i predstavljeno u poglavlju 4.1, masenom analizom prekursor jona anizomicina (m/z 266) nastaje pet fragmentnih jona sa vrednostima m/z 224, 206, 188, 159 i 121 (slika 21b). Na osnovu dobijenih jona pretpostavljen je put fragmentacije anizomicina prikazan na slici 32. Zapravo, pretpostavljeno je da se

produkt jon anizomicina sa vrednošću m/z 224 formira gubitkom acetil grupe na mestu 3 pirolidinovog prstena. Daljom MS³ analizom jona m/z 224 dolazi do fragmentacije na četiri produkt jona m/z 206, 188, 159 i 121. Najintenzivniji jon u spektru (m/z 206) se verovatno formira gubitkom hidroksilne grupe takođe na položaju 3 pirolidinovog prstena. Pri tome se pretpostavlja da tom prilikom dolazi do formiranja dvostruke veze u prstenu. Dalje se jon m/z 206 fragmentiše na tri produkt jona m/z 188, 159 i 121. Produkt jon m/z 188 bi mogao da se formira gubitkom druge hidroksilne grupe na mestu 4 pirolidinovog prstena uz nastanak druge dvostruke veze u prstenu. Na kraju se jon m/z 188 fragmentiše do jona m/z 159 i 121. Pretpostavlja se da se produkt jon m/z 121 formira gubitkom pirolidinovog prstena, dok se jon sa vrednošću m/z 159 formira gubitkom metoksi grupe na benzenovom prstenu. Daljom fragmentacijom jona, tj. MS⁴ analizom, nastaju nestabilni fragmentni joni.



Slika 32. Pretpostavljeni put fragmentacije anizomicina

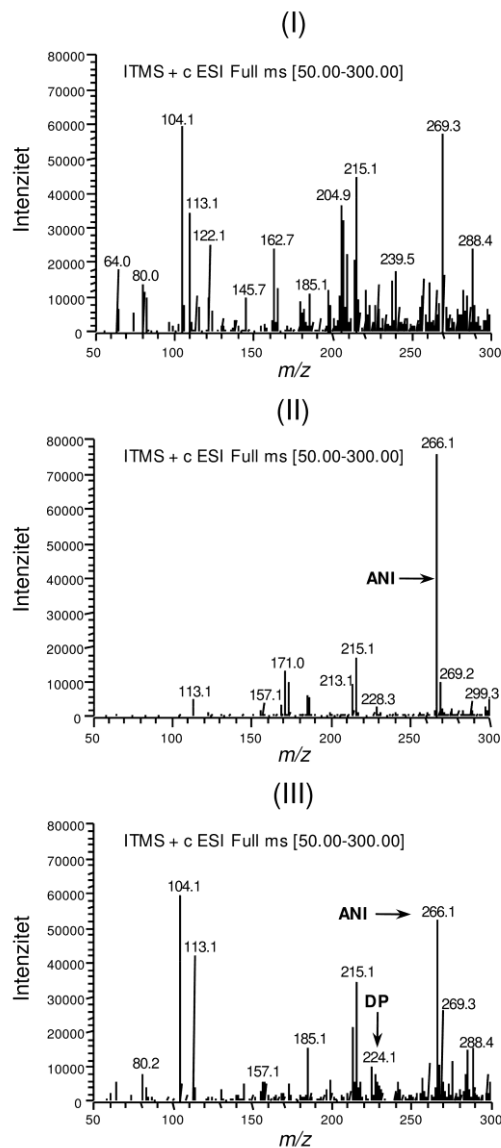
4.4.4. Degradacija anizomicina

Studija forsirane degradacije antibiotika anizomicina je sprovedena u skladu sa ICH smernicama (ICH Q1A(R2), 2003; Q1B, 1996). Uzorci su pripremani na način opisan u poglavlju 3.7.1. Obično se studije forsirane degradacije izvode do momenta kada se postigne 5–20% degradacije ispitivanog jedinjenja. Međutim, u ovoj studiji su neki eksperimenti izvođeni i duže od predloženog vremena i čak i do potpune degradacije anizomicina. Eksperimenti su izvođeni na ovaj način da bi se uspostavio što potpuniji profil degradacije anizomicina i formiranja degradacionog proizvoda. Svi uzorci su ispitivani u sledećim vremenskim tačkama: neposredno nakon pripreme (vreme nula), obično nakon 1, 2,5, 5, 24, 48 sati i nakon 7, 15 i najduže 30 dana, ili je dalje ispitivanje prekidano kada se dostigne potpuna ili gotovo potpuna degradacija leka. U slučaju bazne hidrolize ispitivanje je vršeno i nakon 15 min od početka eksperimenta, a u slučaju fotodegradacije analiziranje dobijenih uzoraka je rađeno na svakih sat vremena tokom šest sati.

Uzorci dobijeni nakon izlaganja anizomicina različitim uslovima, su direktno injektovani u maseni spektrometar kako bi se identifikovali prisutni joni, tj. degradacioni proizvodi. Za svaki od eksperimenata su u svakoj vremenskoj tački snimani spektri slepe probe, standardnog rastvora i stresiranog uzorka. Dobijeni spektri su upoređeni da bi se utvrdilo koji su joni dobijeni u stresiranom uzorku prisutni i u slepoj probi ili i u standardu. Tako je utvrđeno koji joni potiču iz slepe probe, kao i iz standardnog rastvora, a preostali se mogu smatrati potencijalnim degradacionim proizvodima.

Ispitivanje hidrolize anizomicina u kiseloj sredini vršeno je sa 1 M hlorovodoničnom kiselinom na sobnoj temperaturi. Degradacija je praćena tako što su uzorci injektovani u maseni spektrometar radi identifikacije prisutnih jona. Snimljeni maseni spektri su prikazani na slici 33. Poređenjem spektra uzorka sa spektrima slepe probe i standardnog rastvora, primećeno je da se pored anizomicina (m/z 266) u spektru javlja jon sa vrednošću m/z 224 koji je prisutan samo u uzorku, tako da se može smatrati potencijalnim degradacionim proizvodom anizomicina. Na osnovu identifikovanih jona

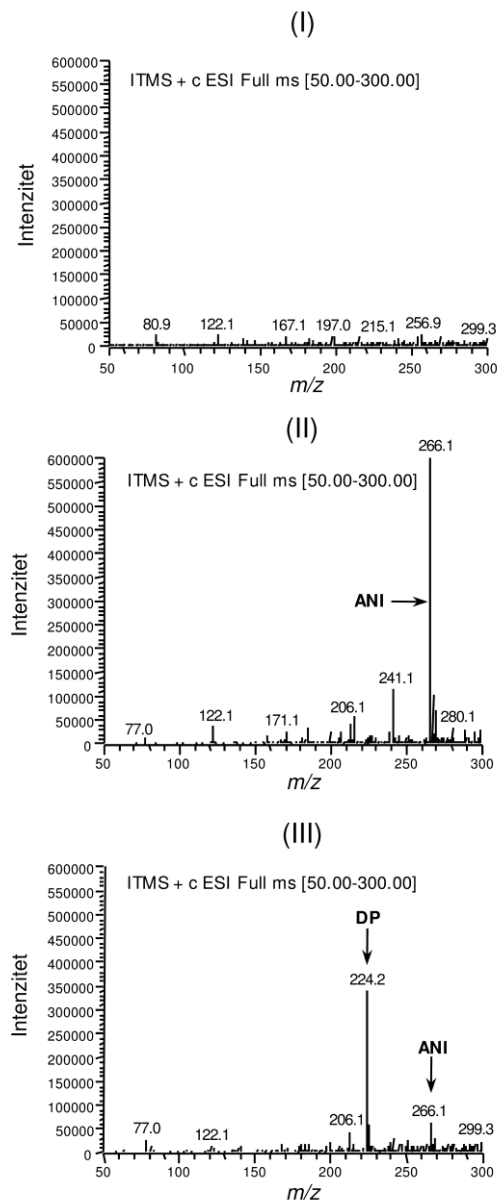
vršena je i LC–MS/MS analiza slepe probe, standardnog rastvora i stresiranog uzorka u svim vremenskim tačkama i zaključeno je da dolazi do degradacije anizomicina tokom vremena. Na sobnoj temperaturi degradacija se odvija relativno sporo, tako da je do 30. dana do kada je praćena degradacija anizomicin još uvek bio prisutan u uzorku.



Slika 33. Maseni spektri slepe probe (I), standardnog rastvora anizomicina (ANI) (II) i uzorka (III) sa degradacionim proizvodom (DP) nakon izlaganja uslovima hidrolize u kiseljoj sredini

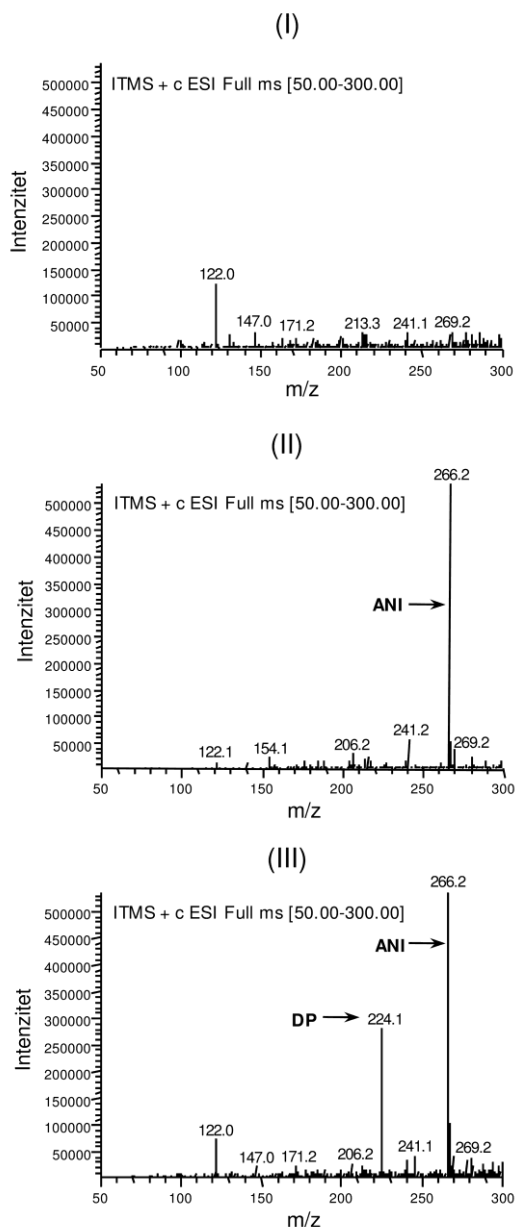
Ispitivanje hidrolize aktivne farmaceutske supstance anizomicina u baznoj sredini je prvo vršeno sa 1 M rastvorom natrijum-hidroksida, ali kako je već u nultom momentu došlo do značajne razgradnje anizomicina, koncentracija baze je smanjena na 0,1 M. I u

ovom eksperimentu su u svakoj vremenskoj tački analizirani slepa proba, standardni rastvor i stresirani uzorak. Dobijeni maseni spektri su prikazani na slici 34. Kao i prilikom ispitivanja hidrolize anizomicina u kiseljoj sredini, i u baznoj sredini je na spektru uzorka uočen jon sa vrednošću m/z 224. Pri eksperimentu sa 0,1 M rastvorom natrijum-hidroksida na sobnoj temperaturi došlo je do brze potpune degradacije anizomicina, tako da je pored vremenske tačke nakon jednog sata uvedena i vremenska tačka nakon 15 min od početka eksperimenta.



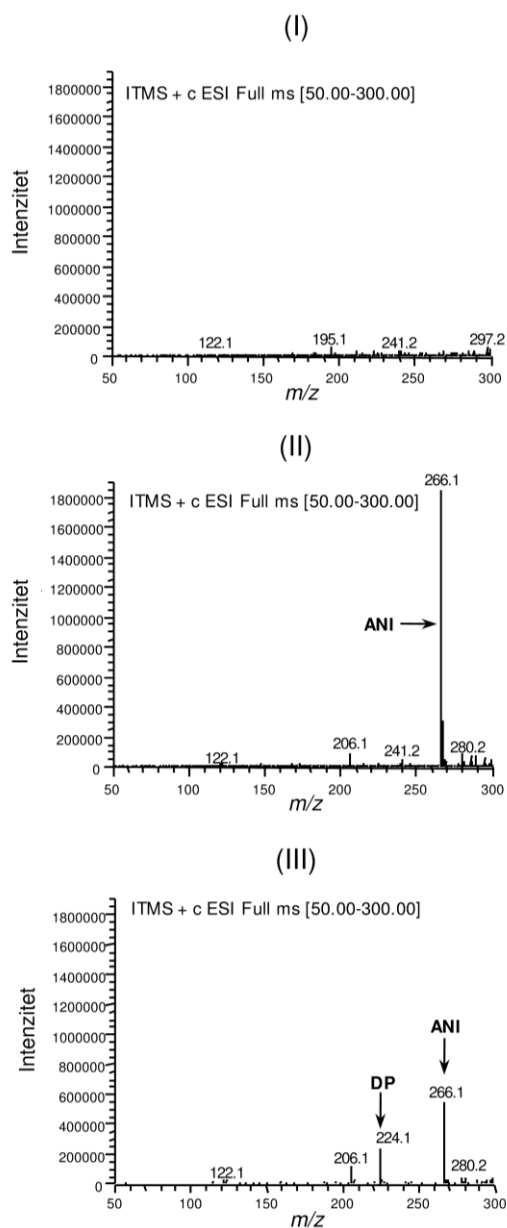
Slika 34. Maseni spektri slepe probe (I), standardnog rastvora anizomicina (ANI) (II) i uzorka (III) sa degradacionim proizvodom (DP) nakon izlaganja uslovima hidrolize u baznoj sredini

U slučaju neutralne hidrolize degradacija je ispitivana tako što je anizomicinu u rastvoru dodata voda na sobnoj temperaturi. U svakoj prethodno određenoj vremenskoj tački su snimani maseni spektri slepe probe, standardnog rastvora i uzorka, i kao najintenzivniji jon na spektru uzorka pored anizomicina se javlja jon sa vrednošću m/z 224 (slika 35). Pri neutralnoj hidrolizi degradacija se odvijala brže nego pri kiseloj hidrolizi, tako da je došlo do potpune degradacije anizomicina nakon dve nedelje.



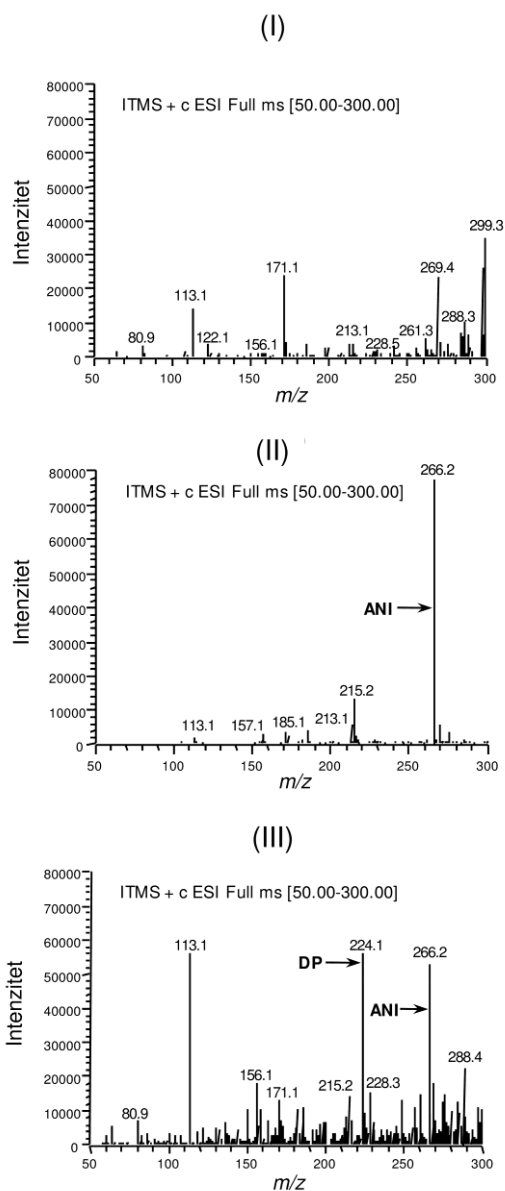
Slika 35. Maseni spektri slepe probe (I), standardnog rastvora anizomicina (ANI) (II) i uzorka (III) sa degradacionim proizvodom (DP) nakon izlaganja uslovima hidrolize u neutralnoj sredini

Degradacija anizomicina ispitivana je i sa rastvorom vodonik-peroksida koncentracije 30%. U literaturi se obično koriste rastvori vodonik-peroksida manje koncentracije (3%) (WHO, 2005; Alsante *et al.*, 2007; Blessy *et al.*, 2014; Bhandi *et al.*, 2016). Međutim, u slučaju anizomicina se pokazalo da se čak i sa ovako velikom koncentracijom vodonik-peroksida degradacija odvija prilično sporo u poređenju sa drugim eksperimentima. I u ovom eksperimentu su pored stresiranog uzorka, gde je uočen jon sa vrednošću m/z 224, analizirani i uzorci slepe probe i standardnog rastvora, a dobijeni maseni spektri predstavljani su na slici 36.

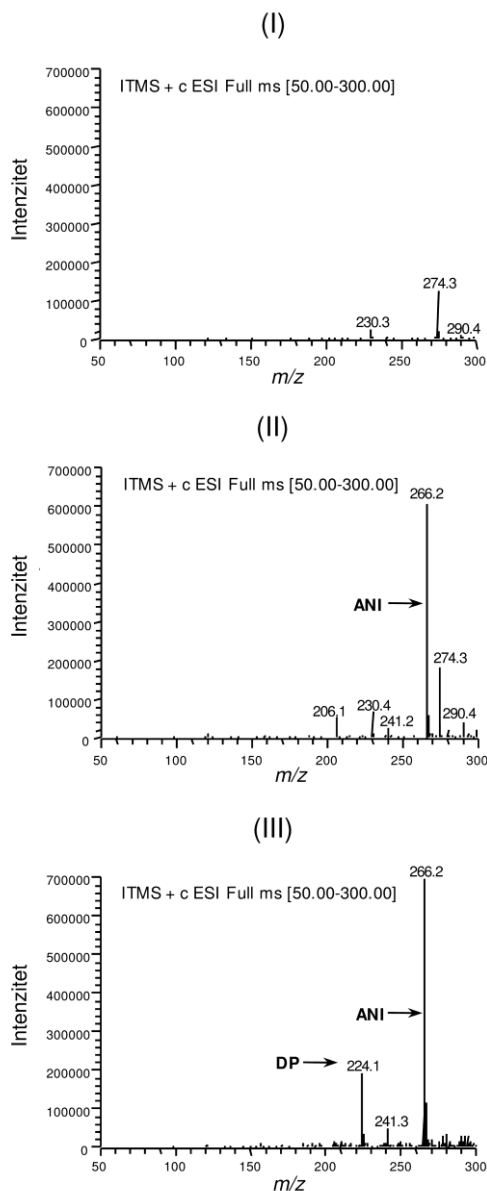


Slika 36. Maseni spektri slepe probe (I), standardnog rastvora anizomicina (ANI) (II) i uzorka (III) sa degradacionim proizvodom (DP) nakon izlaganja oksidacionom sredstvu

Hidroliza u kiselj i neutralnoj sredini je testirana i na povišenoj temperaturi od 60°C da bi se proverilo da li povećanje temperature utiče na brzinu degradacije (slike 37 i 38). Ispitivanja su vršena tokom 48 sati u vodenom kupatilu. Ustanovljeno je da se degradacija na povišenoj temperaturi odvija brže nego na sobnoj temperaturi. I u ovim eksperimentima se na masenim spektrima uzoraka uočava prisustvo jona sa vrednošću m/z 224.

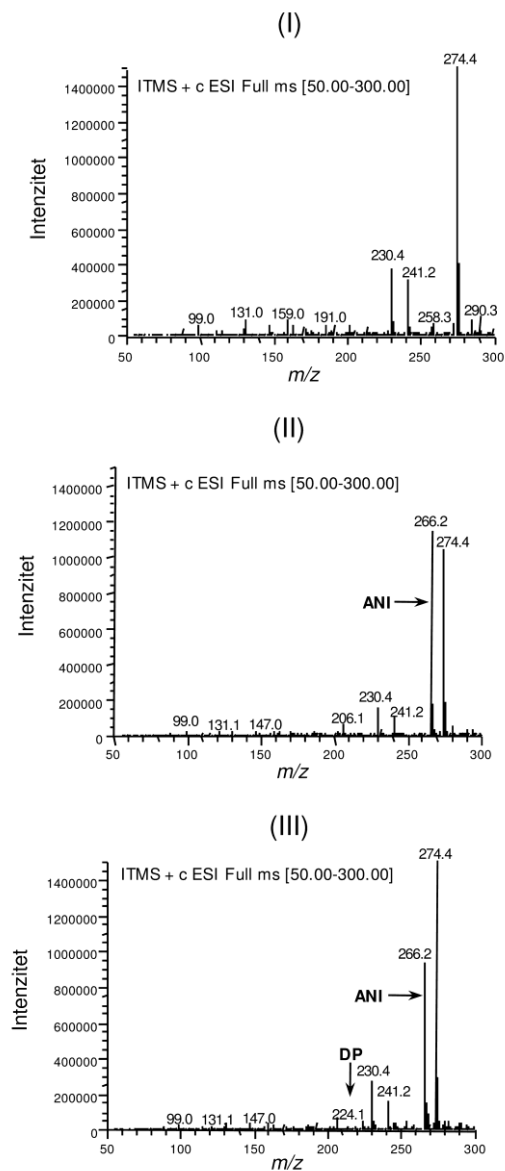


Slika 37. Maseni spektri slepe probe (I), standardnog rastvora anizomicina (ANI) (II) i uzorka (III) sa degradacionim proizvodom (DP) nakon izlaganja termičkoj degradaciji pod uslovima kisele hidrolize



Slika 38. Maseni spektri slepe probe (I), standardnog rastvora anizomicina (ANI) (II) i uzorka (III) sa degradacionim proizvodom (DP) nakon izlaganja termičkoj degradaciji pod uslovima neutralne hidrolize

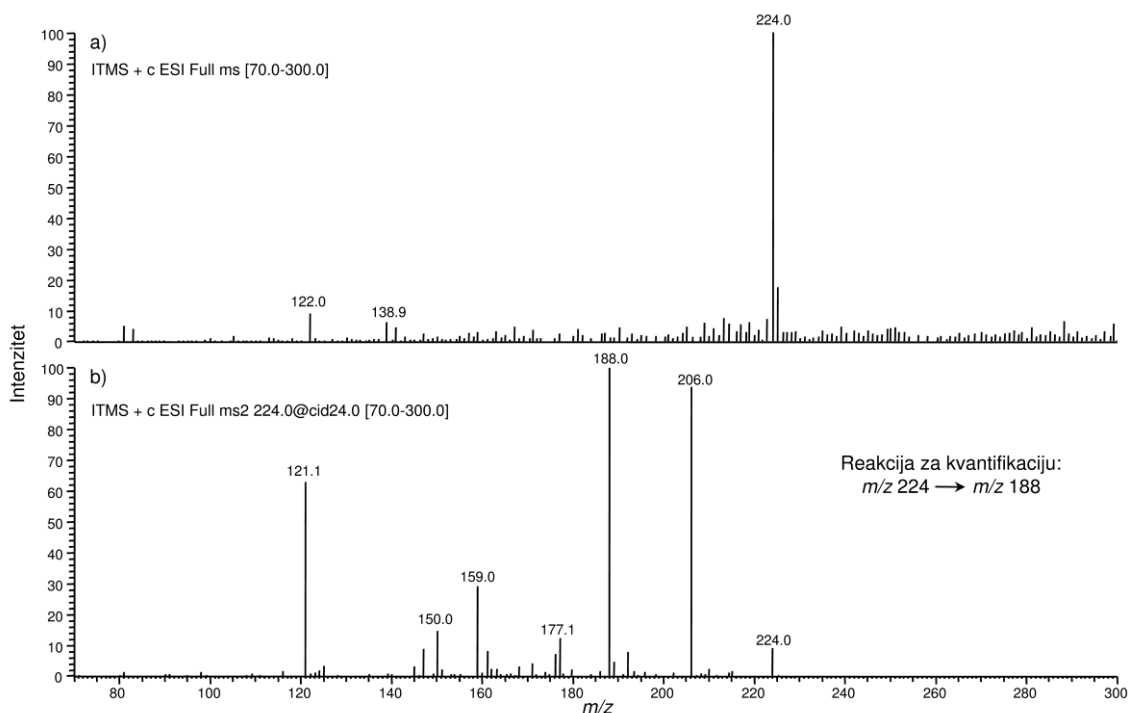
Osetljivost anizomicina na svetlost izvedena je kako je propisano ICH Q1B smernicom. Ispitivanje fotodegradacije aktivne farmaceutske supstance anizomicina u rastvoru tokom šest sati nije pokazalo značajnu degradaciju pod uticajem svetlosti, ali je na masenom spektru uočen jon koji se javljao i prilikom degradacije anizomicina u prethodnim eksperimentima (m/z 224, slika 39).



Slika 39. Maseni spektri slepe probe (I), standardnog rastvora anizomicina (ANI) (II) i uzorka (III) sa degradacionim proizvodom (DP) nakon izlaganja uslovima fotodegradacije

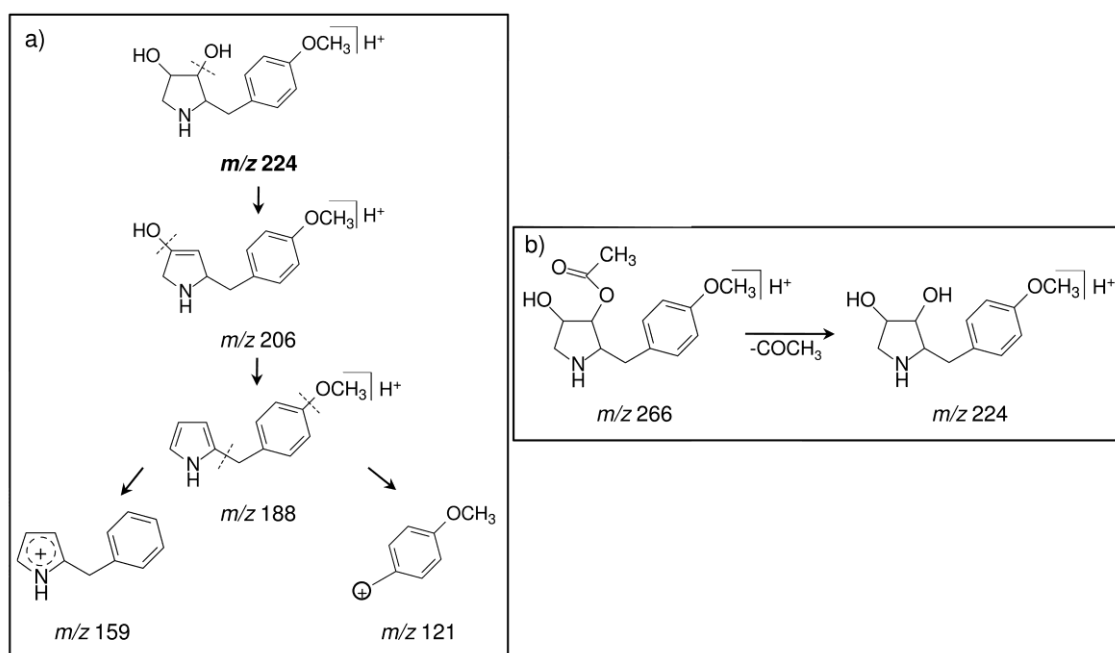
Uvidom u dobijene masene spektre zaključeno je da je pod svim testiranim uslovima došlo do degradacije anizomicina. U svim eksperimentima je detektovan isti degradacioni proizvod, jon sa m/z vrednošću 224. Pošto je prisutan samo u stresiranim uslovima, a ne i u slepoj probi ili u standardnom rastvoru anizomicina, može se zaključiti da je ovo jedini degradacioni proizvod anizomicina u svim testiranim uslovima.

Ovo jedinjenje je ranije identifikovano kao deacetylanizomicin (Hutin *et al.*, 2000; Reddy i Rao, 2011). MS i MS/MS spektri deacetylanizomicina su predstavljeni na slici 40. Tandem masenom analizom je izvršena fragmentacija protonovanog molekula deacetylanizomicina na četiri produkt jona sa m/z vrednostima 206, 188, 159 i 121 (slika 40b). Reakcija fragmentacije prekursor jona (m/z 224) u najintenzivniji produkt jon (m/z 188) je izabrana za identifikaciju i određivanje deacetylanizomicina u daljoj LC-MS/MS analizi.



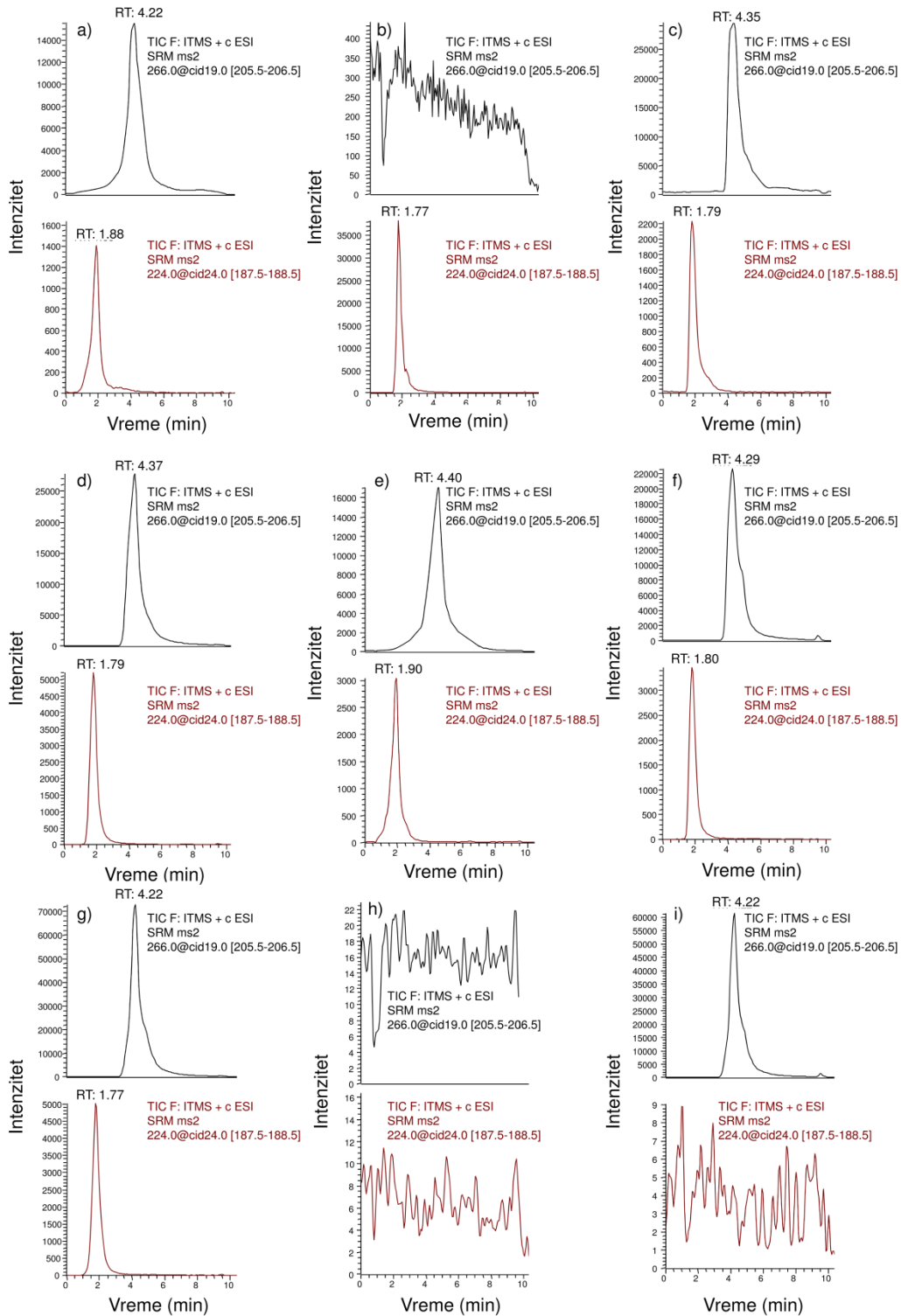
Slika 40. Spektri deacetylanizomicina: a) MS i b) MS/MS

Na slici 41a je predstavljen pretpostavljeni put fragmentacije deacetilanizomicina. Ovaj proizvod degradacije je najverovatnije formiran deacetilovanjem pirolidinovog prstena anizomicina što je predstavljeno pretpostavljenim mehanizmom degradacije leka na slici 41b. Zanimljivo je istaći da uklanjanje acetil grupe bitno smanjuje aktivnost anizomicina (Grollman, 1967). Na osnovu toga se može zaključiti da se sa degradacijom leka anizomicina smanjuje i njegov efekat.



Slika 41. a) Pretpostavljeni put fragmentacije deacetilanizomicina, b) pretpostavljeni mehanizam degradacije anizomicina

Nakon analize uzoraka direktnim injektovanjem u maseni spektrometar, uzorci su analizirani LC-MS/MS metodom radi kvantifikacije anizomicina i nastalog degradacionog proizvoda. Dobijeni SRM hromatogrami anizomicina i degradacionog proizvoda dobijeni za uzorke izložene različitim uticajima (kisela, bazna i neutralna sredina, oksidacija, toplota i svetlost) su predstavljeni na slici 42.



Slika 42. SRM hromatogrami anizomicina i njegovog proizvoda degradacije: a) kisela hidroliza, sobna temperatura (48 h), b) bazna hidroliza, sobna temperatura (1h), c) neutralna hidroliza, sobna temperatura (4,5 h), d) oksidacija (7 dana), e) kisela hidroliza, 60 °C (6 h), f) neutralna hidroliza, 60 °C (2 h), g) fotodegradacija (6 h), h) slepa proba i i) standardni rastvor anizomicina

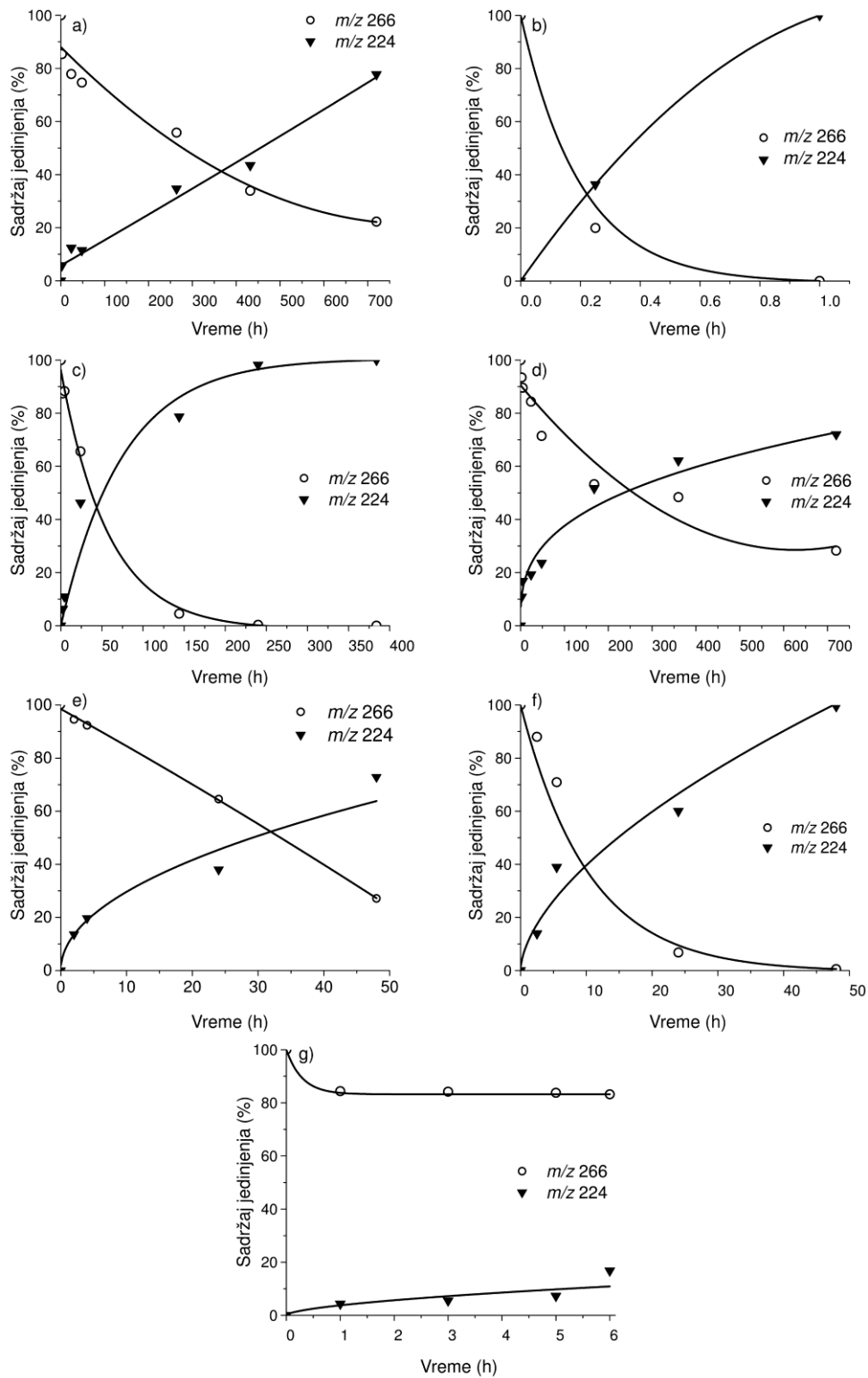
Ispitivanjem degradacionih svojstava anizomicina ustanovljeno je da pod baznim i termičkim (neutralna hidroliza) uslovima, anizomicin pokazao veliku nestabilnost, dok je umereno stabilan pri kiselim i neutralnim uslovima, pri oksidaciji, kao i pri termičkim (kisela hidroliza) i fotolitičkim uslovima (tabela 15). Najmanji procenat degradacije anizomicina je postignut u prisustvu svetlosti i oksidacionog sredstva.

Tabela 15. Procenat degradacije anizomicina pod različitim stres uslovima

Stres uslovi	Vreme (h)	Početna koncentracija (ng mL ⁻¹)	Izmerena koncentracija (ng mL ⁻¹)	Degradacija (%)
Kisela hidroliza	24	1000	778,7	22,1
Bazna hidroliza	1	1000	0	100,0
Neutralna hidroliza	24	1000	656,0	34,4
Oksidacija	24	1000	843,4	15,7
Toplota (kiselina)	24	1000	645,6	35,4
(neutralna)	24	1000	67,8	93,2
Fotodegradacija	6	1000	832,1	16,8

Degradacija leka pod različitim uslovima i formiranje degradacionog proizvoda tokom vremena prikazano je na slici 43. Količina deacetyl-anizomicina je određen prema količini anizomicina, pod pretpostavkom da je to jedini proizvod degradacije.

Najbrža degradacija anizomicina postignuta je pod baznim uslovima. Anizomicin se potpuno razgradio posle samo jednog sata (slika 43b). Takođe se može zaključiti da toplota pospešuje proces degradacije ovog leka. Na sobnoj temperaturi, anizomicin se u kiseloj sredini, u toku mesec dana, degraduje za 77,7% (slika 43a). Kada se temperatura poveća na 60 °C, isti procenat degradacije se postiže nakon samo 48 sati (slika 43e). Ovaj trend je još više izražen pod neutralnim uslovima. Na sobnoj temperaturi anizomicin potpuno se degraduje nakon 15 dana (slika 43c), dok se na temperaturi od 60 °C potpuno degraduje nakon dva dana, tj. 48 h (slika 43f). Anizomicin je umereno stabilan u prisustvu oksidacionog sredstva. Nakon 30 dana izlaganja 30% rastvoru vodonik-peroksida lek je degradirao do 28,2% početnog sadržaja (slika 43d). Nakon izlaganja svetlosti po uslovima preporučenim ICH smernicama, anizomicin je ostao prilično stabilan. Nakon osvetljavanja tokom jednog sata, 15,6% leka se degradiralo, a u narednih pet sati nije došlo do značajne degradacije (slika 43g).



Slika 43. Degradacija anizomicina (\circ) i formiranje degradacionog proizvoda (\blacktriangledown) pod različitim uslovima: a) kisela hidroliza, b) bazna hidroliza, c) neutralna hidroliza, d) oksidacija, e) termička degradacija (kisela hidroliza), f) termička degradacija (neutralna hidroliza), g) fotodegradacija

4.5. Elektrohemijska degradacija anizomicina

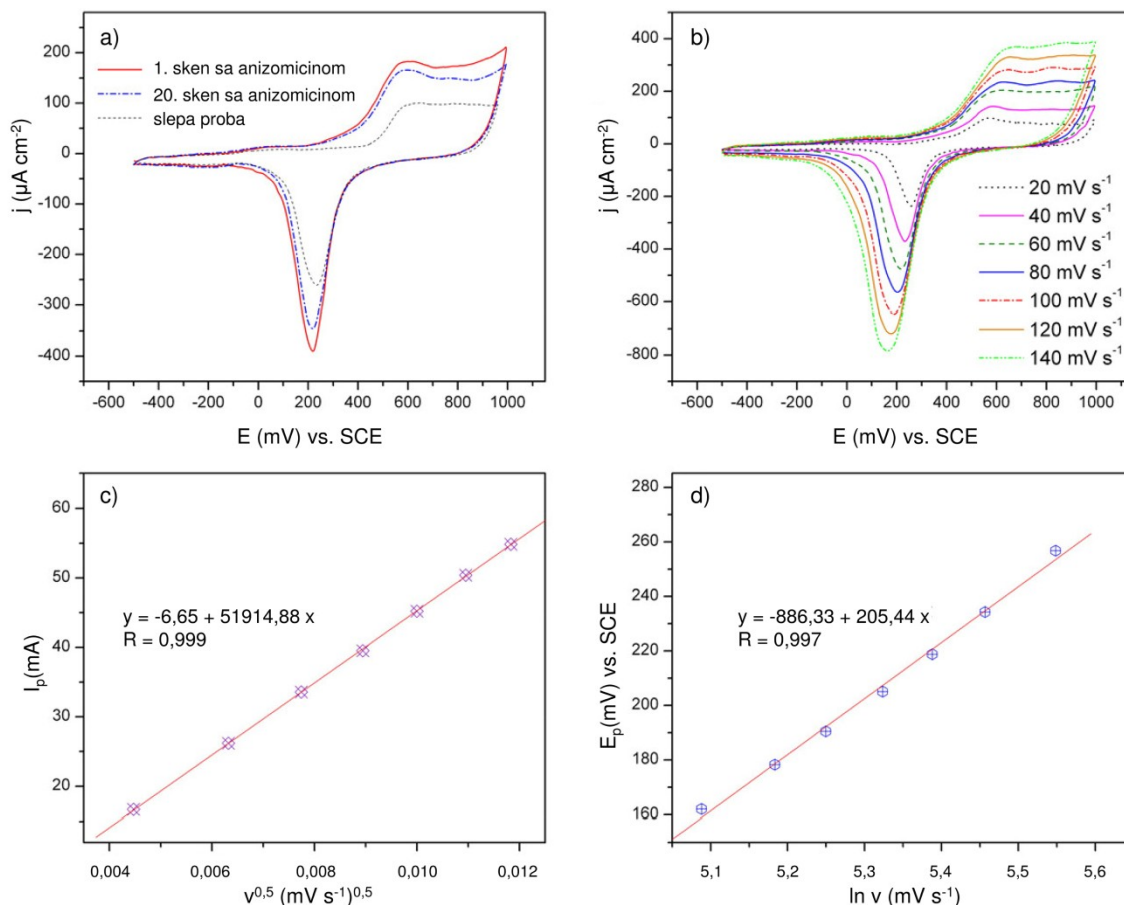
Elektrohemijska degradacija anizomicina u koncentracionom opsegu 1–250 ng mL⁻¹ je izvedena cikličnim ponavljanjem potencijala i primenom voltimetrije sa pravougaonim impulsima (SWV) u elektrolitu NaHCO₃ (pH = 8,4) tokom različitih vremenskih intervala u elektrohemijskoj ćeliji sa radnom elektrodom od zlata. SWV metoda je korišćena za kvantifikaciju leka u uzorcima sa i bez dodatka biološkog uzorka, tj. urina. Kao uporedna metoda za identifikaciju i kvantifikaciju leka i proizvoda njegove degradacije nastalog elektrohemijском razgradnjom korišćena je LC–MS/MS metoda.

4.5.1. Ciklična voltimetrija

Praćenje elektrohemijškog ponašanja anizomicina je prvo vršeno pomoću ciklične voltimetrije (CV) na elektrodi od zlata, dok je kao elektrolit korišćen 0,05 M NaHCO₃. Cikličnom voltimetrijom je definisano elektrohemijško ponašanje i aktivnost anizomicina, a naknadno je cikliziranje produženo tokom više sati. Ciklični voltamogrami (uzastopno skeniranje, 1–20) anizomicina na elektrodi od zlata u elektrolitu zajedno sa voltametrijskim odgovorom elektrode od zlata u rastvoru slepe probe (tačkasta linija) su predstavljeni na slici 40a. U prisustvu anizomicina, već u prvom ciklusu dolazi do promene cikličnog voltamograma u odnosu na slepu probu, tj. elektrolit, tako da se uočava očigledno povećanje struje u oblasti formiranja oksida, kao i u oblasti gde se odvija proces redukcije. Pretpostavlja se da su promene izazvane kontinuiranom ciklizacijom povezane sa formiranjem površinskih oksida (Mirković *et al.*, 2014). Tokom ciklizacije između prvog i dvadesetog ciklusa, voltamogrami pokazuju blag pad anodnih struja u oblasti formiranja oksida.

Ciklični voltamogrami (CV) rastvora koji sadrže anizomicin su predstavljeni na slici 44b pri različitim brzinama skeniranja (v). Primećeno je da gustina struje raste sa porastom brzine skeniranja. Na slici 44c predstavljena je veza između maksimalne struje (I_p) i $v^{1/2}$ pokazujući linearnost, što ukazuje da je oksidacija anizomicina difuziono kontrolisan proces. Takođe, primećeno je da maksimalni potencijal raste sa povećanjem brzine skeniranja, tako da je dobijena pravolinijska zavisnost između maksimalnog

potencijala (E_p) i ln vrednosti brzine skeniranja (slika 44d), što pokazuje da je oksidacija anizomicina nepovratan proces (Bard i Faulkner, 2001).



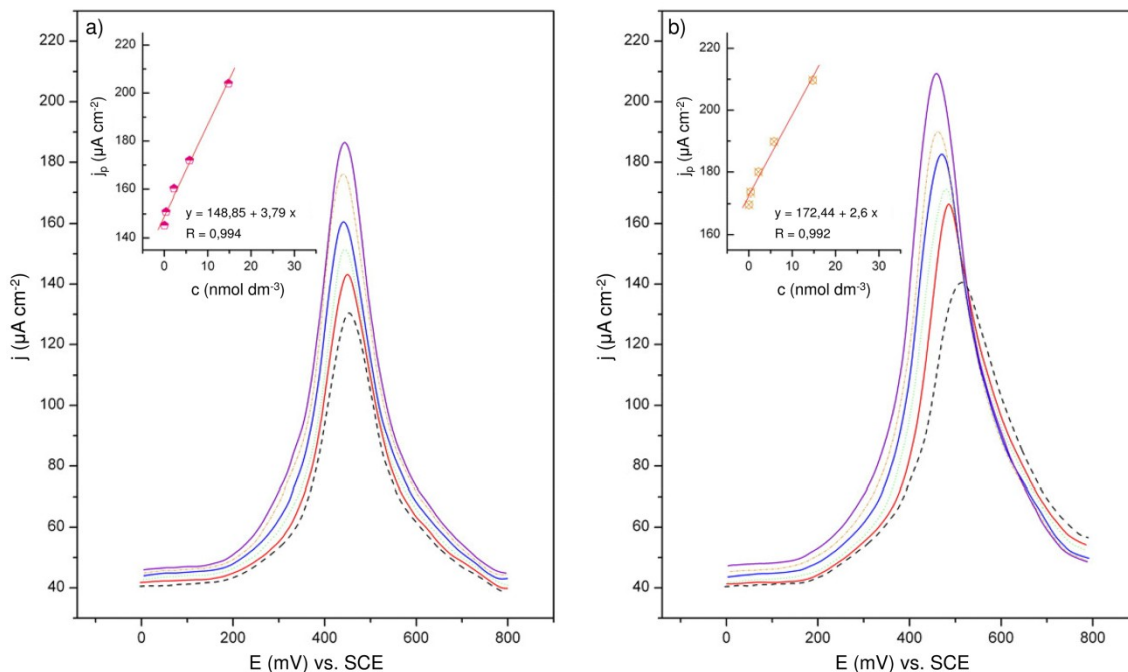
Slika 44. Ciklični voltamogram elektrode od zlata korišćenjem 0,05 M NaHCO₃ (—) i sa 1 ng mL⁻¹ anizomicina, a) 1. i 20. sken, brzina skeniranja (v): 50 mV s⁻¹, b) za brzine skeniranja: 20, 40, 60, 80, 100, 120 i 140 mV s⁻¹, c) zavisnost struje (I_p) i vrednosti $v^{1/2}$, d) zavisnost promene potencijala (E_p) i ln vrednosti brzine skeniranja

Prema rezultatima predstavljanim na slici 44b, kinetički parametri oksidacije anizomicina su procenjeni iz Lavironove teorije (Laviron, 1979). Vrednost an je određena iz nagiba zavisnosti potencijala (E_p) i logaritma vrednosti brzine skeniranja (v). Pri tome vrednost α predstavlja koeficijent razmene naelektrisanja, a n je broj razmenjenih elektrona. Broj elektrona razmenjenih tokom elektrooksidacije anizomicina je proračunat na 1,1 (približno 1), pod pretpostavkom da se razmena elektrona određuje na osnovu brzine, tako da je koeficijent razmene jednak faktoru simetrije koji iznosi 0,5.

Vrednost heterogene konstante brzine razmene elektrona (k^0) se određuje iz odsečka prethodne zavisnosti ako je vrednost E^0 poznata. Vrednost E^0 se dobija iz odsečka krive zavisnosti E_p i v . Dobijena vrednost vrednost E_p bila je 267,2 mV. Odatle je izračunata vrednost k^0 i iznosila je $0,23 \text{ s}^{-1}$.

4.5.2. Voltometrija sa pravougaonim impulsima

Primena voltetrije sa pravougaonim impulsima za kvantitativno određivanje anizomicina na elektrodi od zlata pri pet različitih koncentracija u odsustvu i u prisustvu ljudskog urina predstavljena je na slici 45. Voltamogrami su dobijeni pod sledećim uslovima: potencijal stepena 5 mV, amplituda pulsa 100 mV, frekvencija 2 Hz, brzina skeniranja 10 mV s^{-1} i vreme akumulacije 200 ms na 0,0 V. Na početku procesa oksidacije javlja se dobro definisan pik na približno 450 mV. Snimljeni voltamogrami pokazuju linearnu zavisnost vrednosti anodnih struja u odnosu na koncentraciju anizomicina u opsegu $1\text{--}250 \text{ ng mL}^{-1}$ (slika 45a). Ispitivane koncentracije anizomicina proizvode uporedivo više oksidacione struje i linearnu zavisnost u prisustvu biološkog fluida u rastvoru (slika 45b). Proračunate vrednosti LOD i LOQ (de Silva i Machado, 2012) su 27 i 108 ng mL^{-1} , a u prisustvu biološkog fluida vrednost LOD je bila 54 ng mL^{-1} , a LOQ 162 ng mL^{-1} , što pokazuje dobru osetljivost metode. LC-MS/MS metoda korišćena za potvrdu SWV rezultata, postigla je dobru linearnost u posmatranom opsegu koncentracija u odsustvu ($R = 0,999$) i u prisustvu biološkog uzorka ($R = 0,978$).

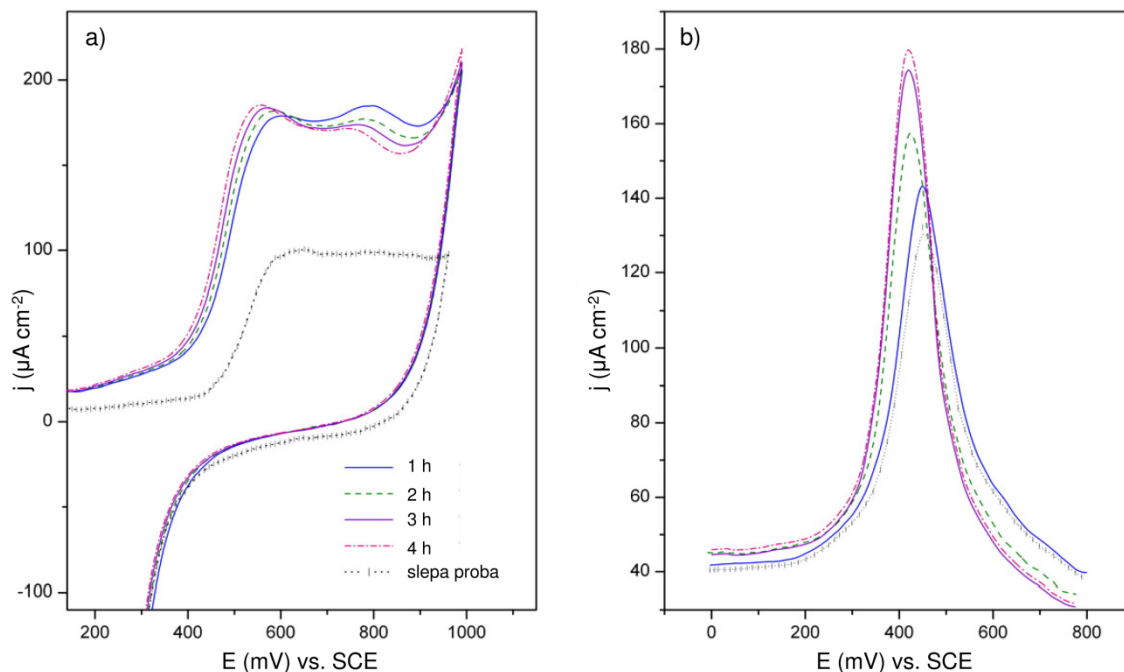


Slika 45. Voltamogrami dobijeni voltametrijom sa pravougaonim impulsima na elektrodi od zlata (—) uz korišćenje 0,05 M NaHCO₃ sa anizomicinom (1, 10, 50, 100 i 250 ng mL⁻¹): a) u odsustvu biološkog uzorka i b) u prisustvu biološkog uzorka;

Dodatak: linearna zavisnost anodnih struja i koncentracije anizomicina

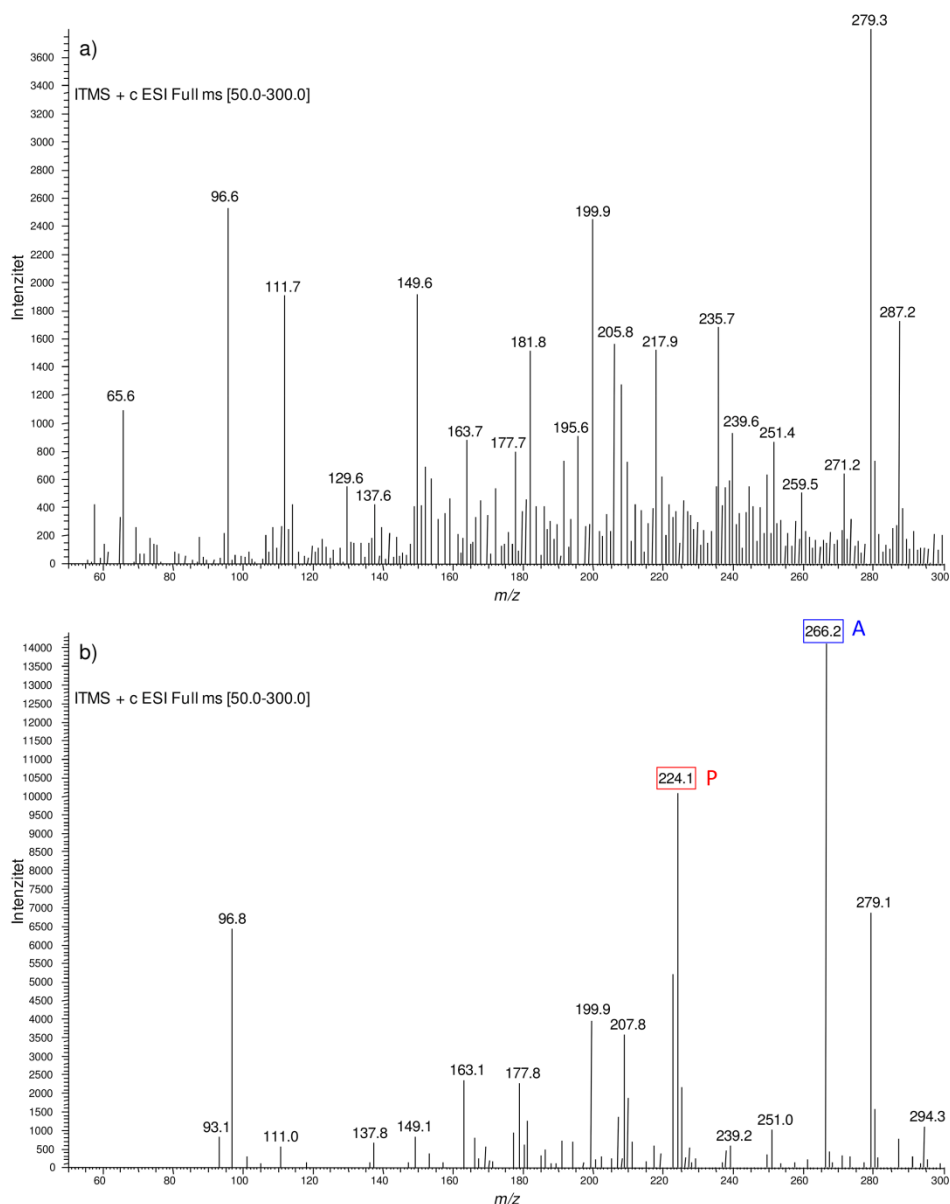
4.5.3. Dugotrajna ciklizacija potencijala praćena LC–MS/MS analizom

Ciklični voltamogram tokom 4 h oksidacije anizomicina (slika 46a) pokazuje pojavu novih anodnih reakcija sa porastom struja u poređenju sa slikom 44a. Na osnovu dobijenih rezultata može se pretpostaviti da dolazi do istovremene oksidacije anizomicina i proizvoda koji nastaje tokom njegove oksidacije. Voltamogram dobijen SWV metodom (slika 46b) potvrđuje taj uticaj pokazujući povećanje anodnih struja. Parametri pri kojima je izvršena SWV analiza su: potencijal stepena 5 mV, amplituda pulsa 100 mV, frekvencija 2 Hz, brzina skeniranja 10 mV s⁻¹ i vreme akumulacije 200 ms na 0,0 V.



Slika 46. a) Ciklični voltamogram i b) voltamogram dobijen voltametrijom sa pravougaonim impulsima uz korišćenje elektrode od zlata u 0,05 M NaHCO_3 (—) i sa 1 ng mL^{-1} anizomicina, nakon 1, 2, 3 i 4 h ciklizacije, brzina skeniranja 50 mV s^{-1}

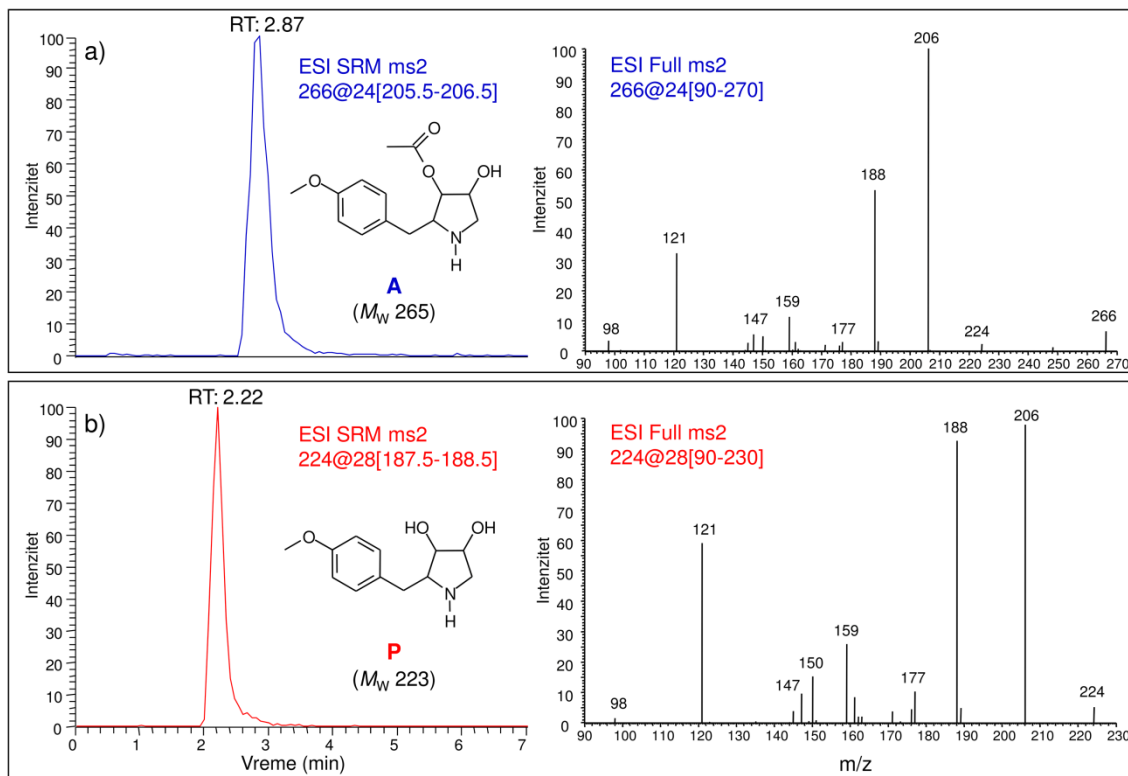
Promena koncentracije anizomicina u elektrolitu je simultano praćena LC–MS/MS metodom. Tokom ciklizacije su nakon svakog sata sakupljani uzorci elektrolita i analizirani. Nakon svakog sata tokom ciklizacije (4 h) uziman je uzorak elektrolita sa anizomicinom i nakon pripreme injektovan direktno u maseni spektrometar. Utvrđeno je da dolazi do degradacije anizomicina. Uvidom u masene spektre uzoraka dobijenih nakon ciklizacije tokom 4 h uočeno je da je formiran isti degradacioni proizvod kao i u studijama forsirane degradacije sa vrednošću m/z 224 (slika 47).



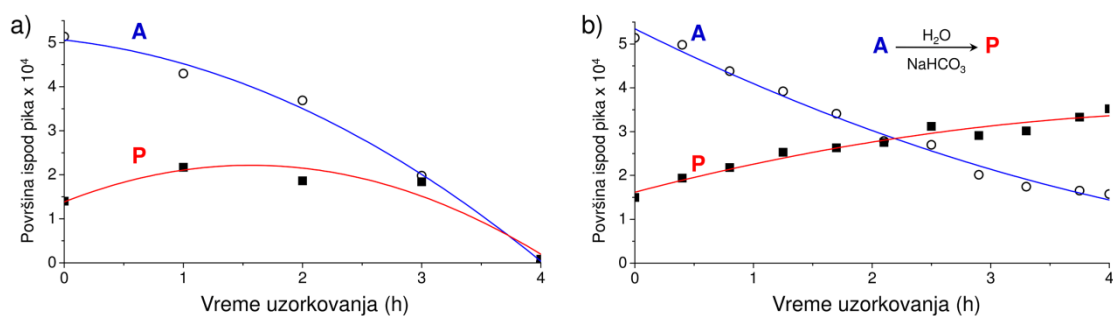
Slika 47. Maseni spektri a) slepe probe (elektrolita) i b) uzorka nakon 1 h ciklizacije u prisustvu anizomicina (A) i degradacionog proizvoda (P)

Za kvantifikaciju anizomicina praćena je reakcija fragmentacije protonovanog molekula leka (m/z 266) u njegov najintenzivniji fragmentni jon (m/z 206, slika 48a). Za kvantifikaciju degradacionog proizvoda korišćena je reakcija fragmentacije prekursor jona m/z 224 u fragmentni jon m/z 188 (slika 48b). Deacetilanizomicin (m/z 224) je identifikovan kao proizvod degradacije anizomicina, hromatografski odvojen od anizomicina. Na slici 48 su predstavljeni SRM hromatogrami i MS/MS spektri

anizomicina (slika 48a) i njegovog degradacionog proizvoda (slika 48b) u 0,05 M NaHCO₃.



Slika 48. SRM hromatogrami i MS/MS spektri a) anizomicina (A) i b) degradacionog proizvoda (P)



Slika 49. Degradacije anizomicina (A, ○) i nastajanje degradacionog proizvoda (P, ■) a) u elektrohemijskom eksperimentu i b) u 0,05 M NaHCO₃

Degradacija anizomicina prilikom dugotrajne ciklizacije prema CV uslovima (slika 46a) je predstavljena na slici 49a. Uočeno je da tokom prva dva sata, količina anizomicina

opada dok količina degradacionog proizvoda raste. Nakon ovog vremena, količina anizomicina i dalje opada, a počinje da se smanjuje količina degradacionog proizvoda. Do kraja eksperimenta (4 h) njihovo prisustvo je zanemarljivo. Ovo potvrđuje da posle 2 h elektrooksidacioni procesi izazivaju očigledno povećanje anodnih struja na slici 46. Takođe je određeno da dolazi do degradacije anizomicina u 0,05 M NaHCO₃ i bez elektrohemijskih uslova (slika 49b). Tokom prvih 30 min eksperimenta, samo 3% anizomicina je degradovano što omogućava pouzdanu elektroanalitičku analizu tokom najmanje 30 min. Za razliku od elektrohemijskog eksperimenta, u 0,05 M NaHCO₃ količina degradacionog proizvoda konstantno raste i tokom 4 h samo 69,5% anizomicina degradira.

5. ZAKLJUČAK

Cilj ovog rada bio je razvoj, optimizacija i primena nove, brze i osetljive analitičke metode za određivanje tragova multifunkcionalnog leka anizomicina u uzorcima biološkog materijala (srce, mozak, slezina, bubreg, jetra, butni mišić i serum), kao i za praćenje stabilnosti leka. U okviru istraživanja izvršena je optimizacija postupka pripreme uzoraka biološkog materijala i instrumentalnih metoda tečne hromatografije u sprezi sa tandem masenom spektrometrijom. Na osnovu pregleda literature i u skladu sa svojstvima anizomicina definisani su uslovi za sprovođenje studije forsirane degradacije leka u skladu sa ICH smernicama Q1A(R2) i Q1B. Metode su validirane u skladu sa zahtevima FDA pravilnika za bioanalitičke metode i ICH smernice Q2(R1). Za ispitivanje degradacionih svojstava anizomicina primenjene su i elektrohemijske metode (CV i SWV). Razvijene i validirane metode su primenjene u *in vivo* studiji, u cilju određivanja distribucije leka u organizmu i najvažnijih farmakokinetičkih parametara, kao i u studiji forsirane degradacije radi utvrđivanja stabilnosti leka i identifikacije proizvoda degradacije. Analizom rezultata dobijenih u ovom radu mogu se izvesti sledeći zaključci:

- O optimalnim parametrima ekstrakcije i postupka prečišćavanja dobijenih ekstrakata: Kao optimalan rastvarač u postupku ultrazvučne ekstrakcije anizomicina iz bioloških materijala od tri testirana rastvarača odabran je metanol, za deproteinizaciju je korišćen 5% vodeni rastvor TCA, za odmašćivanje uzoraka je korišćen heksan, dok su za prečišćavanje ekstrakata odabrani Oasis HLB SPE kertridži.
- O optimalnim hromatografskim uslovima i maseno-spektrometrijskoj analizi: Optimalni hromatografski parametri, za analizu anizomicina u uzorcima biološkog materijala, kao i u uzorcima dobijenim u studiji forsirane degradacije, podrazumevaju korišćenje reverzno-fazne kolone, pri čemu se mobilna faza sastoji od vode, metanola i 10% rastvora sirćetne kiseline, uz korišćenje elektrosprej jonizacije u pozitivnom režimu rada. Kvantifikacija anizomicina je uspešno urađena praćenjem karakteristične reakcije fragmentacije prekursor jona (m/z 266) u najintenzivniji i najstabilniji fragmentni jon (m/z 206).

- O validaciji optimizovanih metoda:

Bioanalitička metoda validirana na šest ispitivanih tkiva i serumu u skladu sa FDA pravilnikom je pokazala dobru selektivnost, tačnost, preciznost, ponovljivost, linearnost, efikasnost ekstrakcije i pogodnost za određivanje tragova anizomicina u različitim tkivima i serumu. Metoda za analiziranje uzoraka dobijenih tokom studije forsirane degradacije anizomicina validirana u skladu sa ICH Q2(R1) smernicom je specifična, tačna, ponovljiva, osetljiva, linearna i robusna.

- O rezultatima dobijenim primenom metode u *in vivo* studiji:

Nakon potkožnog injektovanja anizomicina Wistar albino pacovima i praćenja raspodele leka zaključeno je da je koncentracija anizomicina niža u serumu u poređenju sa koncentracijama u testiranim tkivima. Raspodela leka u tkivima je uspostavljena po sledećem odnosu: mozak > slezina > srce > butni mišić > jetra > bubrezi. Najviša koncentracija anizomicina je pronađena u mozgu, što je u skladu sa činjenicom da je primarno mesto delovanja ovog leka upravo mozak. Maksimalne koncentracije anizomicina u svim tkivima su postignute tokom tri sata od injektovanja. Zaključeno je da se anizomicin brzo raspodeljuje u analiziranim tkivima, pri čemu se najbrža akumulacija anizomicina postiže u srcu.

- O rezultatima dobijenim primenom metode u studiji forsirane degradacije:

Zaključeno je da je anizomicin izuzetno nestabilan u baznoj sredini, kao i da pokazuje veliku nestabilnost na povišenoj temperaturi u neutralnoj sredini, a umereno je stabilan u kiselj i neutralnoj sredini, kao i na povišenoj temperaturi u kiselj sredini i pod uticajem svetlosti. Najmanji nivo degradacije anizomicina se postiže u prisustvu svetlosti i oksidacionog sredstva. Pokazano je da se pri svim testiranim uslovima formira isti degradacioni proizvod, identifikovan kao deacetylanizomicin. Takođe je na osnovu dobijenih rezultata pretpostavljen mehanizam degradacije anizomicina.

- O rezultatima dobijenim primenom elektrohemijskih metoda:

Ispitivanjem elektrohemijske aktivnosti anizomicina ustanovljeno je da je oksidacija anizomicina nepovratan i difuziono kontrolisan proces. Takođe je pokazano da pri elektrohemijskoj degradaciji anizomicina nastaje jedan degradacioni proizvod, deacetylanizomicin.

LITERATURA

Agilent, C₁₈,

[http://www.agilent.com/en/products/sample-preparation/sample-preparation-methods/solid-phase-extraction-\(spe\)/bond-elut-c18](http://www.agilent.com/en/products/sample-preparation/sample-preparation-methods/solid-phase-extraction-(spe)/bond-elut-c18), poslednji pristup: 10. oktobar 2017.

Alsante K.M., Ando A., Brown R., Ensing J., Hatajik T.D., Kong W., Tsuda Y., The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 29–37.

Ardrey R., *Liquid chromatography–mass spectrometry: an introduction*, John Wiley & Sons Ltd., Huddersfield, UK, 2003.

Arnold R.D., Slack J.E., Straubinger R.M., Quantification of Doxorubicin and metabolites in rat plasma and small volume tissue samples by liquid chromatography/ electrospray tandem mass spectroscopy, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 808 (2004) 141–152.

Avramov Ivić M., Petrović S., Mijin D., *Contribution to the Recent Advances in Electrochemical Analysis of Pharmaceuticals*, u: Djokić S. (Urednik), *Biomedical and Pharmaceutical Applications of Electrochemistry*, Springer International Publishing, Switzerland, 2016, pp. 89–195.

Baertschi S.W., *Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug Degradation*, first ed., Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA, 2005.

Barbacid M., Vazquez D., [³H]anisomycin Binding to Eukaryotic Ribosomes, *J. Mol. Biol.* 84 (1974) 603–623.

Bard A.J., Faulkner L.R., *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, drugo izdanje, John Wiley and Sons, Inc., New York, USA, 2001.

Bardal S., Wachter J., Martin D., poglavlje Pharmacokinetics u: *Applied Pharmacology*, Elsevier Ltd., St. Louis, SAD, 2011.

Beereboom J.J., Butler K., Pennington F.C., Solomons I.A., Anisomycin. I. Determination of the Structure and Stereochemistry of Anisomycin, *J. Org. Chem.* 30 (1964) 2334–2342.

Berrada H., Moltó J.C., Mañes J., Font G., Determination of aminoglycoside and macrolide antibiotics in meat by pressurized liquid extraction and LC-ESI-MSJ. *Sep. Sci.* 33 (2010) 522–529.

- Bhandi M.M., Borkar R.M., Shankar G., Raut S., Nagesh N., Srinivas R., Identification and characterization of stressed degradation products of rabeprazole using LC-ESI/MS/MS and ¹H-NMR experiments: in vitro toxicity evaluation of major degradation products, *RSC Adv.* 6 (2016) 10719–10735.
- Bijleveld Y., de Haan T., Toersche J., Jorjani S., van der Lee J., Groenendaal F., Dijk P., van Heijst A., Gavilanes A.W.D., de Jonge R., Dijkman K.P., van Straaten H., Rijken M., Zonnenberg I., Cools F., Nuytemans D., Mathôt R., A simple quantitative method analysing amikacin, gentamicin, and vancomycin levels in human newborn plasma using ion-pair liquid chromatography/tandem mass spectrometry and its applicability to a clinical study, *J. Chromatogr. B*, 951–952 (2014) 110–118.
- Blessy M., Patel R., Prajapati P.N., Agrawal Y.K., Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs—A review, *J. Pharm. Anal.* 4 (2014) 159–165.
- Bonilla A., Muniz K., Antibiotic resistance: causes, and risk factors, mechanisms and alternatives, Nova Science Publishers, New York, USA, 2009.
- Bousova K., Senyuva H., Mittendorf K., Quantitative multi-residue method for determination antibiotics in chicken meat using turbulent flow chromatography coupled to liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1274 (2013) 19–27.
- Brann J.P., Studies towards the total synthesis of (-)-anisomycin. the total synthesis of (-)-2-epi-anisomycin, doktorska disertacija, University of Sussex, USA, 2013.
- Bratkowska D., Shobo A., Singh S., Bester L.A., Kruger H.G., Maguire G.E.M., Govender T., Determination of the antitubercular drug PA-824 in rat plasma, lung and brain tissues by liquid chromatography tandem mass spectrometry: Application to a pharmacokinetic study, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 988 (2015) 187–194.
- Brett C.M.A., Brett A.M.O., *Electrochemistry Principles, Methods, and Applications*, Oxford University Press Inc., New York, USA, 1994.
- Cazorla-Reyes R., Romero-González R., Garrido Frenich A., Rodríguez Maresca M.A., Martínez Vidal J.L., Simultaneous analysis of antibiotics in biological samples by ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 89 (2014) 203–212.

- Chen D., Yu J., Tao Y., Pan Y., Xie S., Huang L., Peng D., Wang X., Wang Y., Liu Z., Yuan Z., Qualitative screening of veterinary anti-microbial agents in tissues, milk, and eggs of food-producing animals using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1017–1018 (2016) 82–88.
- Cherlet M., Schelkens M., Croubels S., De Backer P., Quantitative multi-residue analysis of tetracyclines and their 4-epimers in pig tissues by high-performance liquid chromatography combined with positive-ion electrospray ionization mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 492 (2003) 199–213.
- Cohen H., Kaplan Z., Matar M.A., Loewenthal U., Kozlovsky N., Zohar J., Anisomycin, a protein synthesis inhibitor, disrupts traumatic memory consolidation and attenuates posttraumatic stress response in rats, *Biol. Psychiatry* 60 (2006) 767–776.
- Croons V., Martinet W., Herman A.G., Timmermans J.-P., De Meyer G.R.Y., The Protein Synthesis Inhibitor Anisomycin Induces Macrophage Apoptosis in Rabbit Atherosclerotic Plaques through p38 Mitogen-Activated Protein Kinase, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 329 (2009) 856–864.
- da Silva O.B., Machado S.A.S., Evaluation of the detection and quantification limits in electroanalysis using two popular methods: application in the case study of paraquat determination, *Anal. Methods* 4 (2012) 2348–2354.
- Davis J.L., Salmon J.H., Papich M.G., Pharmacokinetics and tissue fluid distribution of cephalexin in the horse after oral and i.v. administration, *J. vet. Pharmacol. Therap.* 28 (2005) 425–431.
- de Hoffmann E., Stroobant V., *Mass Spectrometry Principles and Applications*, treće izdanje, John Wiley & Sons Ltd., Brussels, Belgium, 2007.
- Dean J.R., *Methods for environmental trace analysis*, John Wiley & Sons Ltd., Newcastle, UK, 2003.
- Debiec J., LeDoux J.E., Nader K., Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus, *Neuron* 36 (2002) 527–538.
- Despić A., *Elektrohemijske tehnike i tehnologije*, Srpska akademija nauka i umetnosti, Beograd, Srbija, 2005.

- Dickson L.C., O'Byrne C., Chan W., A Quantitative Method for Residues of Macrolide Antibiotics in Porcine Kidney by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry, *J. AOAC Int.* 95 (2012) 567–575.
- Dubois M., Fluchard D., Sior E., Delahaut Ph., Identification and quantification of five macrolide antibiotics in several tissues, eggs and milk by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 753 (2001) 189–202.
- Fedeniuk R.W., Mizuno M., Neiser C., O'Byrne C., Development of LC–MS/MS methodology for the detection/determination and confirmation of chloramphenicol, chloramphenicol 3-O- β -d-glucuronide, florfenicol, florfenicol amine and thiamphenicol residues in bovine, equine and porcine liver, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 991 (2015) 68–78.
- Food and Drug Administration (FDA), U.S. Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, Rockville, USA, 2001.
- Food and Drug Administration (FDA), U.S. Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), Draft Guidance for Industry: Stability Testing of Drug Substances and Drug Products, Rockville, USA, 1998.
- Freitas A., Barbosa J., Ramos F., Determination of Amoxicillin Stability in Chicken Meat by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry, *Food Anal. Methods* 5 (2012) 471–479.
- Garcés A., Zerzaňová A., Kučera R., Barrón D., Barbosa J., Determination of a series of quinolones in pig plasma using solid-phase extraction and liquid chromatography coupled with mass spectrometric detection Application to pharmacokinetic studies, *J. Chromatogr. A* 1137 (2006) 22–29.
- Gladtko E., History of Pharmacokinetics, u: Pecile A., Rescigno A. (Urednici), Pharmacokinetics Mathematical and Statistical Approaches to Metabolism and Distribution of Chemicals and Drugs, Springer Science+Business Media, LLC, New York, USA, 988, pp.1–9.

- Gopinath S., Kumar R.S., Alexander S., Danabal P., Development of a rapid and sensitive SPE-LC-MS/MS method for the simultaneous estimation of fluoxetine and olanzapine in human plasma, *Biomed. Chromatogr.* 26 (2012) 1077–1082.
- Grollman A., Inhibitors of Protein Biosynthesis II. Mode of action of anisomycin, *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 3226–3233.
- Guo W., Li G., Yang Y., Yang C., Si L., Huang J., LC-MS/MS analysis of pramipexole in mouse plasma and tissues: Elimination of lipid matrix effects using weak cation exchange mode based solid-phase extraction, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 988 (2015) 157–165.
- Gur R., Tendler A., Wagner S., Long-term social recognition memory is mediated by oxytocin-dependent synaptic plasticity in the medial amygdala, *Biol. Psychiatry* 76 (2014) 377–386.
- Gužvanj V., Praktikum iz instrumentalne analize. Problemi i rešenja, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, Srbija, 2011.
- Hardy S., Human microbiology, Taylor & Francis, London, GB, 2002.
- Huang X.-H., Zhao Y.-D., He L.-M., Liang Z.-S., Guo L.-L., Zeng Z.-L., Chen Z.-L., Zhang M., Fang B.-H., Development of High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for the Detection of Tulathromycin in Swine Plasma, *J. Integr. Agric.* 11 (2012) 465–473.
- Hutin P., Haddad M., Larchevêque M., Stereoselective synthesis of (–)-deacetylanisomycin, *Tetrahedron: Asymmetry* 11 (2000) 2547–2553.
- International Conference of Harmonisation (ICH), Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products, Geneva, Switzerland, 2003.
- International Conference of Harmonisation (ICH), Q1B Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products, Geneva, Switzerland, 1996.
- International Conference of Harmonisation (ICH), Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Geneva, Switzerland, 1994.
- Jafari-Nodoushan M., Barzin J., Mobedi H., A stability-indicating HPLC method for simultaneous determination of morphine and naltrexone, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1011 (2016) 163–170.
- Jang G.R., Harris R.Z., Lau D.T., Pharmacokinetics and Its Role in Small Molecule Drug Discovery Research, *Med. Res. Rev.* 21 (2001) 382–396.

- Jin H.-E., Lee K.-R., Kang I.-H., Chung S.-J., Shim C.-K., Determination of zabofloxacin in rat plasma by liquid chromatography with mass spectrometry and its application to pharmacokinetic study, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54 (2011) 873–877.
- Judge M.E., Quartermain D., Alleviation of anisomycin-induced amnesia by pre-test treatment with lysine-vasopressin, *Pharm. Biochem. Behav.* 16 (1982) 463–466.
- Kaufmann A., Butcher P., Maden K., Determination of aminoglycoside residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry in a variety of matrices, *Anal. Chim. Acta* 711 (2012) 46–53.
- Kaushik D., Kaur J., Kaur V.P., Saini B., Bansal Y., Bansal G., Forced degradation, LC–UV, MSⁿ and LC–MS–TOF studies on azilsartan: Identification of a known and three new degradation impurities, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 120 (2016) 202–211.
- Koesukwiwat U., Jayanta S., Leepipatpiboon N., Solid-phase extraction for multiresidue determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in Bovine's milk, *J. Chromatogr. A* 1149 (2007) 102–111.
- Kumar P., Rúbies A., Companyó R., Centrich F., Determination of aminoglycoside residues in kidney and honey samples by hydrophilic interaction chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 2710–2717.
- Lancini G., Parenti F., Gallo G.G., *Antibiotics a multidisciplinary approach*, Springer Science + Business Media, New York, USA, 1995.
- Laviron E., The use of linear potential sweep voltammetry and of a.c. voltammetry for the study of the surface electrochemical reaction of strongly adsorbed systems and of redox modified electrodes, *J. Electroanal. Chem.* 100 (1979) 263–270.
- Lee S.J., Desra K.T., Eum S.Y., Dartois V., Cho S.N., Bae D.-W., Shin S.C., Development and validation of LC-ESI-MS/MS method for analysis of moxifloxacin and levofloxacin in serum of multidrug-resistant tuberculosis patients: Potential application as therapeutic drug monitoring tool in medical diagnosis, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1009–1010 (2016) 138–143.
- Li J.-y., Huang J.-y., Li M., Zhang H., Xing B., Chen G., Wei D., Gu P.-y., Hu W.-x., Anisomycin induces glioma cell death via downregulation of PP2A catalytic subunit *in vitro*, *Acta Pharmacol. Sin.* 33 (2012) 935–940.

- Li Y., Bu S., A simple and sensitive UHPLC-MS/MS method for the determination of sulfachloropyrazine sodium in chicken plasma and application in a comparative pharmacokinetic study, *Anal. Methods* 6 (2014) 7312–7317.
- Luo Z., Deng Z., Liu Y., Wang G., Yang W., Hou C., Tang M., Yang R., Zhou H., Development and validation of a novel stability-indicating HPLC method for the quantitative determination of eleven related substances in Ezetimibe drug substance and drug product, *Talanta* 139 (2015) 67–74.
- Ma Z., Wang J., Gerber J.P., Milne R.W., Determination of colistin in human plasma, urine and other biological samples using LC–MS/MS, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 862 (2008) 205–212.
- Macarov C.A., Tong L., Martínez-Huélamo M., Hermo M.P., Chirila E., Wang Y.X., Barrón D., Barbosa J., Multi residue determination of the penicillins regulated by the European Union, in bovine, porcine and chicken muscle, by LC–MS/MS, *Food Chem.*, 135 (2012) 2612–2621.
- Macías-Silva M., Vázquez-Victorio G., Hernández-Damián J., Anisomycin is a multifunctional drug: More than just a tool to inhibit protein synthesis, *Curr. Chem. Biol.* 4 (2010) 124–132.
- Malešević M., Živanović L., Protić A., Radišić M., Laušević M., Jović Ž., Zečević M., Stress Degradation Studies on Zolpidem Tartrate Using LC–DAD and LC–MS Methods, *Acta Chromatogr.* 26 (2014) 81–96.
- Mawji I.A., Simpson C.D., Gronda M., Williams M.A., Hurren R., Henderson C.J., Datti A., Wrana J.L., Schimmer A.D., A Chemical Screen Identifies Anisomycin as an Anoikis Sensitizer That Functions by Decreasing FLIP Protein Synthesis, *Cancer Res.* 67 (2007) 8307–8315.
- McGlinchey T.A., Rafter P.A., Regan F., McMahon G.P., A review of analytical methods for the determination of aminoglycoside and macrolide residues in food matrices, *Analytica Chimica Acta*, 624 (2008) 1–15.
- Mirković J., Lović J., Avramov Ivić M., Mijin D., Electrooxidative behavior of arylazo pyridine dyes and their inclusion complexes on gold electrode in 0.1 M NaOH, *Electrochim. Acta* 137 (2014) 705–713.
- Montesano C., Curini R., Sergi M., Compagnone D., Celani G., Varasano V., Petrizzi L., Amorena M., Determination of marbofloxacin in plasma and synovial fluid

- byultrafiltration followed by HPLC–MS/MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 123 (2016) 31–36.
- Nader K., Schafe G.E., Le Doux J.E., Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval, *Nature* 406 (2000) 722–726.
- Niessen W., *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry*, Taylor and Francis Group, Boca Raton, USA, 2006.
- Ogawa T., Hayashi T., Kyoizumi S., Kusunoki Y., Nakachi K., MacPhee D.G., Trosko J.E., Kataoka K., Yorioka N., Anisomycin downregulates gap-junctional intercellular communication via the p38 MAP-kinase pathway, *J. Cell Sci.* 117 (2003) 2087–2096.
- Ozkan S.A., *Electroanalytical methods in pharmaceutical analysis and their validation*, HNB Publishing, New York, USA, 2012.
- Pang Q., Tian Y., Mi J., Wang J., Xu Y., Simultaneous determination and pharmacokinetic study of eight components in rat plasma by UHPLC-MS/MS after oral administration of *Hypericum japonicum* Thunb extract, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 118 (2016) 228–234.
- Patel P.N., Kalariya P.D., Gananadhamu S., Srinivas R., Forced degradation of fingolimod: Effect of co-solvent and characterization of degradation products by UHPLC-Q-TOF–MS/MS and 1H NMR, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 115 (2015) 388–394.
- Pena R.R., Pereira-Caixeta A.R., Moraes M.F.D., Pereira G.S., Anisomycin administered in the olfactory bulb and dorsal hippocampus impaired social recognition memory consolidation in different time-points, *Brain Res. Bull.* 109 (2014) 151–157.
- Phenomenex, Strata X,
http://testing.portlab.ru/sites/default/files/spe_strata-x_ordering_information.pdf, 2017a, poslednji pristup: 10. oktobar 2017.
- Phenomenex, Strata X,
<http://www.phenomenex.com/Products/Part/8B-S100-TAK>, 2017b, poslednji pristup: 10. oktobar 2017.
- Plozza T., Trenerry V.C., Zeglinski P., Nguyen H., Johnstone P., The confirmation and quantification of selected aminoglycoside residues in animal tissue and bovine milk

- by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Int. Food Res. J.* 18 (2011) 1077–1084.
- Pokrajac M., *Farmakokinetika*, drugo dopunjeno izdanje, Grafolik, Beograd, Srbija, 2002.
- Pokrajac M., *Farmakokinetika-priručnik za praktičnu nastavu*, Grafolik, Beograd, Srbija, 2001.
- Pramanik B., Ganguly A., Gross M., *Applied electrospray mass spectrometry*, Taylor & Francis, New York, USA, 2002.
- Pryde A., Gilbert M.T., *Application of high performance liquid chromatography*, Chapman & Hall Ltd., London-New York, USA, 1979.
- Ramesh T., Rao P.N., Rao R.N., LC–MS/MS characterization of forced degradation products of zofenopril, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 88 (2014) 609–616.
- Rao R.N., Naidu Ch.G., Prasad K.G., Padiya R., Agwane S.B., Determination of gemifloxacin on dried blood spots by hydrophilic interaction liquid chromatography with fluorescence detector: application to pharmacokinetics in rats, *Biomed. Chromatogr.* 26 (2012) 1534–1542.
- Rao R.N., Naidu Ch.G., Prasad K.G., Santhakumar B., Saida S., Development and validation of a stability indicating assay of doxofylline by RP-HPLC: ESI-MS/MS, ¹H and ¹³C NMR spectroscopic characterization of degradation products and process related impurities, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 78–79 (2013) 92–99.
- Rao R.N., Ramachandra B., Sravan B., Khalid S., LC–MS/MS structural characterization of stress degradation products including the development of a stability indicating assay of Darunavir: An anti-HIV drug, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 89 (2014) 28–33.
- Rao R.N., Vali R.M., Ramachandra B., Raju S.S., Separation and characterization of forced degradation products of abacavir sulphate by LC–MS/MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54 (2011) 279–285.
- Reddy K.S., Rao B.V., A facile and stereoselective synthesis of the C-2 epimer of (+)-deacetylanisomycin, *Tetrahedron: Asymmetry* 22 (2011) 190–194.
- Rouessac F., Rouessac A., *Chemical Analysis: Modern instrumentation methods and techniques*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK, 2007.

- Roy B., Das A., Bhaumik U., Sarkar A.K., Bose A., Mukharjee J., Chakrabarty U.S., Das A.K., Pal T.K., Determination of gemifloxacin in different tissues of rat after oral dosing of gemifloxacin mesylate by LC–MS/MS and its application in drug tissue distribution study *J. Pharm. Biomed. Anal.* 52 (2010) 216–226.
- Runje M., Babić S., Meštrović E., Nekola I., Dujmić-Vučinić Ž., Vojčić N., Forced degradation of nepafenac: Development and validation of stability indicating UHPLC method, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 123 (2016) 42–52.
- Sadowski R.N., Canal C.E., Gold P.E., Lidocaine attenuates anisomycin-induced amnesia and release of norepinephrine in the amygdala, *Neurobiol. Learn. Mem.* 96 (2011) 136–142.
- Seydel J.K., Wiese M., *Drug-Membrane Interactions: Analysis, Drug Distribution, Modeling*, prvo izdanje, Wiley-VCH, Switzerland, 2002.
- Shao B., Dong D., Wu Y., Hu J., Meng J., Tu X., Xu S., Simultaneous determination of 17 sulfonamide residues in porcine meat, kidney and liver by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 546 (2005) 174–181.
- Shin H.-C., Kim J.-C., Chung M.-K., Jung Y.-H., Kim J.-S., Lee M.-K., Amidon G., Fetal and maternal tissue distribution of the new fluoroquinolone DW-116 in pregnant rats, *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.* 136 (2003) 95–102.
- Sigma Aldrich, Anizomicin,
<http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Datasheet/6/a9789dat.pdf>, 2017a, poslednji pristup: 7. jul 2017.
- Sigma Aldrich, C₁₈,
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/57054?lang=en®ion= SX>, 2017b, poslednji pristup: 10. oktobar 2017.
- Singh H., Sharma G., Kaur I.P., Development and validation of an UPLC method for the quantification of ethambutol in rat plasma, *RSC Adv.* 4 (2014) 42831–42838.
- Skoog D., West D., *Principles of instrumental analysis*, Saunders College Publishing, drugo izdanje, Philadelphia, USA, 1980.
- Skoog D.A., West D.M., Holler F.J., Crouch S.R., *Fundamentals of Analytical Chemistry*, deveto izdanje, Brooks/Cole, Cengage Learning, Belmont, USA, 2013.

- Sobin B., Tanner F., Anisomycin, a new anti-protozoan antibiotic, *J. Am. Chem. Soc.* 76 (1954) 4053.
- Stariat J., Suprunová V., Roh J., Šesták V., Eisner T., Filipický T., Mladěnka P., Nobilis M., Šimůnek T., Klimeš J., Kalinowski D.S., Richardson D.R., Kovaříková P., Simultaneous determination of the novel thiosemicarbazone anti-cancer agent, Bp4eT, and its main phase I metabolites in plasma: Application to a pilot pharmacokinetic study in rats, *Biomed. Chromatogr.* 28 (2014) 621–629.
- Stolker A.A.M., Rutgers P., Oosterink E., Lasaroms J.J.P., Peters R.J.B., van Rhijn J.A., Nielen M.W.F., Comprehensive screening and quantification of veterinary drugs in milk using UPLC–ToF-MS *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 2309–2322.
- Tang Y., Lu H., Lin H., Shin Y., Hwang D., Development of a Quantitative Multi-Class Method for 18 Antibiotics in Chicken, Pig, and Fish Muscle using UPLC-MS/MS, *Food Analytica Methods*, 5 (2012) 1459-1468.
- Tao Y., Chen D., Yu H., Huang L., Liu Z., Cao X., Yan C., Pan Y., Liu Z., Yuan Z., Simultaneous determination of 15 aminoglycoside(s) residues in animal derived foods by automated solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Food Chem.* 135 (2012) 676–683.
- Tasso L., Neves G., Menegatti R., Manssour Fraga C.A., Barreiro E., Eifler-Lima V., Kuze Rates S.M., Dalla Costa T., Pharmacokinetics and tissue distribution of a new heterocyclic N-phenylpiperazine derivative (LASSBio-581) in rats, *Eur. J. Pharm. Sci.* 26 (2005) 194–202.
- Theodosiou A., Ashworth A., Differential effects of stress stimuli on a JNK-inactivating phosphatase, *Oncogene* 21(2002) 2387–2397.
- Tölgyesi Á., Sharma V.K., Fekete S., Lukonics D., Fekete J., Simultaneous determination of eight corticosteroids in bovine tissues using liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 906 (2012) 75–84.
- Urva S.R., Shin B.S., Yang V.C., Balthasar J.P., Sensitive high performance liquid chromatographic assay for assessment of doxorubicin pharmacokinetics in mouse plasma and tissues, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 877 (2009) 837–841.
- Walsh C., *Antibiotics actions, origins, resistance*, ASM Press, Washington, USA, 2003.

- Wang J., Analytical Electrochemistry, drugo izdanje, Wiley-VCH, New York, USA, 2000.
- Waters, MCX,
<http://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186000252>, 2017a,
poslednji pristup: 10. oktobar 2017.
- Waters, WCX,
<http://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186002494>, 2017b,
poslednji pristup: 10. oktobar 2017.
- Waters, C₁₈,
<http://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=WAT051910>, 2017c,
poslednji pristup: 10. oktobar 2017.
- World Health Organization (WHO), Expert Committee on Specification for Pharmaceutical Preparations, WHO Technical Report Series 929, Annex 5, Guidelines for Registration of Fixed-Dose Combination Medicinal Products, Appendix 3, Pharmaceutical Development (or Preformulation) Studies, Geneva, Switzerland, 2005.
- Wyns H., Meyer E., Plessers E., Watteyn A., De Baere S., De Backer P., Croubels S., Pharmacokinetics of gamithromycin after intravenous and subcutaneous administration in pigs Res. Vet. Sci. 96 (2014) 160–163.
- Xia S., Li Y., Rosen E.M., Laterra J., Ribotoxic Stress Sensitizes Glioblastoma Cells to Death Receptor–Induced Apoptosis: Requirements for c-Jun NH₂-Terminal Kinase and Bim, Mol. Cancer Res. 5 (2007) 783–792.
- Xie W., Han C., Hou J., Wang F., Qian Y., Xi J., Simultaneous determination of multiveterinary drug residues in pork meat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry combined with solid phase extraction, J. Sep. Sci. 35 (2012) 3447-3454.
- Xing F., Yu Z., Liu J., Di J., Zeng S., Chen D., Chen L., Fang Z., Guo Z., Pan S., Wang J., Li Y., Hao W., Fan Z., Teng Z., Chen G., Chen Z., Mao C., Long Y., Liu N., Anisomycin inhibits the behaviors of T cells and the allogeneic skin transplantation in mice. J. Immunother. 31 (2008) 858–870.
- Yamada R., Kozono M., Ohmori T., Morimatsua F., Kitayama M., Simultaneous determination of residual veterinary drugs in bovine, porcine, and chicken muscle

- using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 70 (2006) 54–65.
- Yao L., Zhou F., Cai M., Peng Y., Sun J., Chen Q., Jin X., Wang G., Zhang J., Development and validation of a sensitive LC–MS/MS method without derivatization/ion-pairing agents for etimicin quantification in ratplasma, internal ear and kidney, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 146 (2017) 96–102.
- Yosioka S., Stella V.J., *Stability of drugs and dosage forms*, prvo izdanje, Kluwer Academic Publishing, New York, USA, 2002.
- Yu C., Cohen L., Tissue Sample Preparation – Not the Same Old Grind, *LC GC Europe* 17 (2004) 2–6.
- Zha W., Sun J., Wang G., Ren H., Hu X., Huang Q., Jiye A, LC-ESI-MS Determination of Roxithromycin in Tissues of Beagle Dogs after Multiple Dosing of Roxithromycin Sustained Release Tablets, *Chromatographia* 66 (2007) 475–480.
- Zheng Z., Tang Y., Lv H., Xu J., Zhao H., Xie Q., Qiu Z., Chen H., Wang H., Determination of Meserine, a new candidate for Alzheimer’s disease in mice brain by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application to a pharmacokinetic and tissue distribution study, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 3451–3458.
- Zhu W.-x., Yang J.-z., Wei W., Liu Y.-f., Zhang S.-s., Simultaneous determination of 13 aminoglycoside residues in foods of animal origin by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry with two consecutive solid-phase extraction steps, *J. Chromatogr. A*, 1207 (2008) 29–37.
- Zhu Z., Liu G., Wang F., Sasanya J.J., Cannavan A., Development of a Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometric Method for Simultaneous Determination of 15 Aminoglycoside Residues in Porcine Tissues, *Food Anal. Methods* 9 (2016) 2587–2599.

OBJAVLJENI NAUČNI RADOVI IZ DOKTORSKE DISERTACIJE

Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu – M21

1. Ljiljana Tolić, Jelena Lović, Dušan Mijin, Slobodan Petrović, Svetlana Grujić, Mila Laušević, Milka Avramov Ivić, Investigation of electrochemical behavior of anisomycin on gold electrode followed by HPLC-MS/MS analysis, *Electrochemistry Communications*, 58 (2015) 20–24.

2. Ljiljana Tolić, Svetlana Grujić, Miloš Mojović, Miloš Jovanović, Gert Lubec, Goran Bačić, Mila Laušević, Determination of anisomycin in tissues and serum by LC–MS/MS: application to pharmacokinetic and distribution studies in rats, *RSC Advances*, 6 (2016) 92479–92489.

Rad u međunarodnom časopisu – M23

1. Ljiljana Tolić, Svetlana Grujić, Mila Laušević, Development of stability-indicating LC–UV and LC–MS/MS methods for quantitative analysis of anisomycin and identification of degradation products, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, (2017) prihvaćen rad

BIOGRAFIJA AUTORA

Ljiljana Tolić je rođena 16. juna 1986. godine u Arandjelovcu gde je završila osnovnu i srednju školu. Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu, studijski program Hemijska tehnologija, smer Organska hemijska tehnologija i polimerno inženjerstvo, upisala je školske 2005/2006. godine. Diplomirala je 2009. godine sa prosečnom ocenom tokom studija 8,54. Diplomski rad pod nazivom „Ispitivanje mešljivosti polimetilmetakrilata sa cikloolefinskim kopolimerom” odbranila je sa ocenom 10 pod rukovodstvom prof. dr Katarine Jeremić. Master studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Hemijska tehnologija, smer Polimerno inženjerstvo, upisala je školske 2009/2010. godine. Diplomirala je 2010. godine sa prosečnom ocenom u toku studija 9,88. Master rad pod nazivom „Ispitivanje mogućnosti primene hidrogelova hitozana i metakrilne kiseline za kontrolisano otpuštanje diklofenak-natrijuma” odbranila je sa ocenom 10 pod rukovodstvom prof. dr Meline Kalagasidis Krušić.

Školske 2011/2012. godine upisala je doktorske akademske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu u Beogradu, smer Hemija, pod rukovodstvom prof. dr Mile Laušević. Na doktorskim studijama je položila sve ispite predviđene planom i programom sa prosečnom ocenom 10 i odbranila završni ispit pod nazivom „Određivanje antibiotika anizomicina u biološkom materijalu primenom metode tečne hromatografije u sprezi sa tandem masenom spektrometrijom”. Oblast naučno-istraživačkog rada Ljiljane Tolić obuhvata razvoj, validaciju i primenu analitičkih metoda korišćenjem tečne hromatografije sa tandem masenom spektrometrijom za analizu tragova lekova u uzorcima biološkog materijala, kao i praćenje stabilnosti i određivanje degradacionih proizvoda lekova.

Od novembra 2011. godine Ljiljana Tolić je angažovana na projektu osnovnih istraživanja pod nazivom „Razvoj i primena metoda i materijala za monitoring novih zagađujućih i toksičnih organskih materija i teških metala” (172007) finansiranom od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoj Republike Srbije.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Љиљана Толић
број индекса 4053/2011

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**ОДРЕЂИВАЊЕ АНИЗОМИЦИНА ТЕЧНОМ ХРОМАТОГРАФИЈОМ СА
ТАНДЕМ МАСЕНОМ СПЕКТРОМЕТРИЈОМ И ЕЛЕКТРОХЕМИЈСКИМ
МЕТОДАМА И ПРИМЕНА НА ИСПИТИВАЊЕ СТАБИЛНОСТИ ЛЕКА И
ЊЕГОВЕ РАСПОДЕЛЕ У ТКВИМА ПАЦОВА**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 18. 12. 2017.

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије
докторског рада**

Име и презиме аутора Љиљана Толић

Број индекса 4053/2011

Студијски програм Хемија

Наслов рада ОДРЕЂИВАЊЕ АНИЗОМИЦИНА ТЕЧНОМ ХРОМАТОГРАФИЈОМ СА
ТАНДЕМ МАСЕНОМ СПЕКТРОМЕТРИЈОМ И ЕЛЕКТРОХЕМИЈСКИМ МЕТОДАМА
И ПРИМЕНА НА ИСПИТИВАЊЕ СТАБИЛНОСТИ ЛЕКА И ЊЕГОВЕ РАСПОДЕЛЕ У
ТКИВИМА ПАЦОВА

Ментор проф. др Мила Лушевић

Потписани/а Љиљана Толић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 18. 12. 2017.

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

ОДРЕЂИВАЊЕ АНИЗОМИЦИНА ТЕЧНОМ ХРОМАТОГРАФИЈОМ СА ТАНДЕМ
МАСЕНОМ СПЕКТРОМЕТРИЈОМ И ЕЛЕКТРОХЕМИЈСКИМ МЕТОДАМА И
ПРИМЕНА НА ИСПИТИВАЊЕ СТАБИЛНОСТИ ЛЕКА И ЊЕГОВЕ РАСПОДЕЛЕ У
ТКИВИМА ПАЦОВА

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

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 полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 18. 12. 2017.

1. Ауторство - Дозвољавате 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. Дозвољавате 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. Дозвољавате 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. Дозвољавате 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. Дозвољавате 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. Дозвољавате 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.