

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Valentina L. Radulović

**ELEKTROHEMIJSKO PROUČAVANJE
VARENIKLINA I BRIMONIDINA,
I RAZVOJ ELEKTROANALITIČKIH
METODA ZA NJIHOVO ODREĐIVANJE U
RAZLIČITIM MATRIKSIMA**

doktorska disertacija

Beograd, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Valentina L. Radulović

**ELECTROCHEMICAL STUDY
OF VARENICLINE AND BRIMONIDINE,
AND DEVELOPMENT OF
ELECTROANALYTICAL METHODS FOR
THEIR DETERMINATION IN DIFFERENT
MATRICES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017.

MENTORI

Dr sc Vera Kapetanović, redovni profesor (u penziji)
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Dr sc Danica Agbaba, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE

Dr sc Mara Aleksić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Dr sc Dragan Manojlović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet

Dr sc Miloš Jovanović, redovni profesor (u penziji)
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija urađena je na Katedri za analitičku hemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i predstavlja deo istraživanja u okviru naučnoistraživačkog projekta „Sinteza, kvantitativni odnosi između strukture i dejstva, fizičko-hemijska karakterizacija i analiza farmakološki aktivnih supstanci” (broj 172033) čiji je rukovodilac Prof. dr Danica Agbaba, a koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Uspešnoj realizaciji ovog rada značajno su doprineli mnogi kojima upućujem najiskrenije i najsrdačnije reči zahvalnosti:

Posebno se zahvaljujem svom mentoru, Prof. dr Veri Kapetanović, na ukazanom poverenju i uvođenju u svet nauke, na korisnim stručnim savetima i prenetom iskustvenom znanju stečenom tokom dugogodišnje posvećenosti nastavno-naučnom radu, i neprocenjivim sugestijama u sticanju umeća pisanja radova kao i same teze. Neizmerno hvala na usmeravanju da znanje i intelektualno poštenje predstavljaju najmoćniji potencijal pojedinca, na prepoznavanju mojih sposobnosti i sklonosti ka naučno-istraživačkom i nastavnom radu, i na pruženoj podršci do uspešnog ostvarenja cilja uobličenog u ovu doktorsku disertaciju, a kojom su otvorena vrata metodološkim potencijalima za buduća istraživanja.

Veliku zahvalnost upućujem Prof. dr Danici Agbabi na inicijalnoj ideji za celokupno istraživanje, što me je prihvatila kao člana svog projektnog tima, prepoznala moje zalaganje i predanost radu i značajno pomogla i podržala u završnici izrade ove teze. Njena ekspeditivnost, ukazano poverenje, naučnički entuzijazam i vizionarski duh uliva energiju za buduće realizacije ideja i osvajanja neistraženih polja nauke.

Zahvaljujem se Prof. dr Mari Aleksić posebno na kooperativnosti i korisnim savetima tokom pisanja ovog rada, koja je od početka bila deo istraživačkog tima i čiji je ključni doprinos bio u obučavanju za rad na odgovarajućim instrumentima i u obuci oko obrade rezultata.

Zahvaljujem se Prof. dr Draganu Manojloviću i Prof. dr Milošu Jovanoviću na korektnoj saradnji, korisnim diskusijama i sugestijama u fazi pisanja ove disertacije.

Hvala svim dobronamernim kolegama na rečima podrške, ne samo sa Katedre za analitičku hemiju, već i sa drugih Katedri Farmaceutskog fakulteta.

Zahvaljujem se svojim studentima čiji gestovi, kao odraz poštovanja i stečenog pozitivnog utiska usled posvećenosti njima, su mi predstavljali dodatni izvor energije.

Zahvalna sam svojim iskrenim prijateljima na strpljenju, razumevanju i svakoj upućenoj reči podrške i ohrabrenja.

Zahvaljujem se majci, bratu i njegovoj porodici, svim članovima porodice mog supruga, koji su uvek uz mene i koji me nikada nisu izneverili u podržavanju, razumevanju, ulivanju snage i istrajnosti, a naročito u pružanju ljubavi i pažnje.

Ipak, najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici: voljenom suprugu Aleksandru i našoj divnoj deci Nataliji i Vladimiru, za sve propušteno zajedničko vreme, beskrajno razumevanje, požrtvovanost, reči utehe i ohrabrenja, i bezgraničnu ljubav. Njima posvećujem ovu doktorsku disertaciju, kao i svom pokojnom ocu Lazaru, koji bi bio izuzetno ponosan i čiju snagu podrške i zaštitnički duh osećam i danas.

ELEKTROHEMIJSKO PROUČAVANJE VARENIKLINA I BRIMONIDINA, I RAZVOJ ELEKTROANALITIČKIH METODA ZA NJIHOVO ODREĐIVANJE U RAZLIČITIM MATRIKSIMA

REZIME

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitano je elektrohemijsko ponašanje vareniklina i brimonidina, razvijene su elektroanalitičke metode za njihovo određivanje u određenim matriksima, a ispitana je i potencijalna interakcija vareniklina i DNK.

Vareniklin i brimonidin predstavljaju farmakološki aktivne derivate hinoksalina. Vareniklin se primenjuje u terapiji odvikavanja od pušenja, a brimonidin u terapiji glaukoma. Kako predstavljaju elektroaktivne vrste, proučavani su primenom određenih elektrohemijskih metoda - polarografije jednosmerne struje (*direct current polarography*, DCP) i ciklične voltometrije (*cyclic voltammetry*, CV) i uz upotrebu različitih radnih elektroda – kapljuće živine elektrode (*dropping mercury electrode*, DME), elektrode viseće živine kapi (*hanging mercury electrode*, HMDE), borom dopirane dijamantske elektrode (*boron doped diamond electrode*, BDDE) i elektrode od staklastog ugljenika (*glassy carbon electrode*, GCE). Okarakterisana je priroda procesa (difuzija, adsorpcija) na odgovarajućoj radnoj elektrodi. Takođe, dobijen je broj razmenjenih elektrona i protona tokom procesa radi postavljanja odgovarajućih redoks mehanizama vareniklina i brimonidina. Broj razmenjenih elektrona i protona u procesima oksidacije utvrđen je ne samo na osnovu ciklovoltametrijskih rezultata na čvrstim elektrodama, već i na osnovu dodatnih rezultata dobijenih diferencijalno pulsnom voltametrijom (*differential pulse voltammetry*, DPV). Međusobnim poređenjem elektrohemijskog ponašanja ova dva leka, utvrđene su sličnosti i razlike u ponašanju koje odgovaraju sličnostima i razlikama u njihovim molekulskim strukturama. Sličnosti u ponašanju pripisane su postojanju hinoksalinskog jezgra u molekularnoj strukturi oba leka, a razlike utiču na supstituenata odnosno konjugovanog prstena na fizičko-hemijske karakteristike celokupnih molekula. Otuda je utvrđeno da se proces redukcije odvija lakše kod vareniklina u odnosu na brimonidin.

Na osnovu dobijenih ciklovoltometrijskih rezultata, kao i dodatnih proučavanja voltametrijom pravougaonih talasa (*square wave voltammetry*, SWV), utvrđen je stepen reverzibilnosti procesa.

Utvrđeno je da se redukcija vareniklina odvija na C=N vezi hinoksalinskog jezgra uz učešće dva elektrona i dva protona u širokoj pH oblasti (2,0 – 11,0) do 1,4-dihidro-vareniklina, a stepen reverzibilnosti procesa raste sa porastom pH vrednosti sredine i najveći je u baznoj sredini. U kiseljoj sredini, pri pH < 6,0; vareniklin podleže dodatnom stepenu redukcije do 1,2,3,4-tetrahidro-vareniklina, a prvi stepen redukcije odvija se stupnjevito uz nastajanje radikal-intermedijera, pri čemu najpre dolazi do adicije jednog protona, a zatim transfera jednog elektrona po svakom stupnju. Nakon redukcije, odvija se kvazireverzibilni proces oksidacije uz učešće jednog elektrona i jednog protona, polazeći od 1,4-dihidro-vareniklina (nastalog produkta redukcije) do 2-hidroksi-1,4-dihidrovareniklina.

Redukcijom brimonidina u širokom pH intervalu (2,0 – 11,0) nastaje 1,4-dihidro-brimonidin kao posledica dvoelektronskog procesa i učešće dva protona, na dvostrukoj C=N vezi hinoksalina. Stepen reverzibilnosti procesa raste sa porastom pH vrednosti rastvora. Dodatni stepen redukcije odvija se takođe uz učešće dva elektrona i dva protona do nastajanja 1,2,3,4-tetrahidro-brimonidina i prisutan je samo u jako kiseljoj sredini (pH = 2,0 i 3,0). Oksidacija brimonidina odvija se putem dva odvojena nezavisna procesa: 1) proces vezan za prethodnu redukciju i 2) proces nezavisan od prethodne redukcije. Nakon prethodne redukcije (1), nastali produkt 1,4-dihidro-brimonidin podleže kvazireverzibilnom procesu oksidacije uz učešće jednog elektrona i jednog protona do nastajanja 2-hidroksi-1,4-dihidrobromonidina. Proces ireverzibilne oksidacije (2) odvija se na sekundarnom aminu na poziciji C6 uz učešće jednog elektrona i jednog protona, pri čemu nastaje *N-radikal* brimonidina.

Rezultati kvantitativne analize vareniklina i brimonidina u različitim matriksima primenom odgovarajućih optimizovanih elektroanalitičkih metoda, ukazali su na odgovarajuće metode izbora. Za određivanje vareniklina u tabletama i opterećenoj plazmi, kao i za određivanje brimonidina u kapima za oči, predložena je SWV/BDDE metoda zasnovana na redukcionom reverzibilnom piku. Metoda DPV/BDDE zasnovana na oksidacionom ireverzibilnom piku, uspešno je primenjena za određivanje brimonidina u opterećenoj očnoj vodici. Studija stabilnosti brimonidina u uzorku očne

vodice pokazala je da uzorak zamrznut tokom dva meseca ne podleže značajnoj promeni, ali se uzorak sa analitom može podvrgnuti samo jednom ciklusu zamrzavanja/odmrzavanja.

Rezultati ispitivanja potencijalne interakcije vareniklina i DNK, primenom adsorptivne transfer *stripping* tehnike (*adsorptive transfer stripping technique*, AdTS) na HMDE ukazali su na reverzibilnu interakciju vareniklina i DNK, tipa interkalacije. Ustanovljeno je da se redukovani oblik jače vezuje za DNK od oksidovanog oblika vareniklina.

Ključne reči: vareniklin, brimonidin, elektrohemijsko proučavanje, voltometrija, redoks mehanizam, određivanje, stabilnost, interkalacija

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutska-medicinska hemija i strukturna analiza

UDK broj: 544.018:[545.55:615.217.2/.3(043.3)

**ELECTROCHEMICAL STUDY OF VARENICLINE AND BRIMONIDINE,
AND DEVELOPMENT OF ELECTROANALYTICAL METHODS FOR THEIR
DETERMINATION IN DIFFERENT MATRICES**

ABSTRACT

The electrochemical behaviour of varenicline and brimonidine was studied in this doctoral dissertation, electroanalytical methods were developed for their determination in certain matrices, and the potential interaction between varenicline and DNA was investigated.

Varenicline and brimonidine represent pharmacologically active quinoxaline derivatives. Varenicline is applied in smoking cessation therapy, and brimonidine is used as antiglaucoma agent. Both of them are electroactive species and they were examined by applying certain electrochemical methods – direct current polarography (DCP) and cyclic voltammetry (CV), and using different working electrodes - *dropping mercury electrode* (DME), *hanging mercury electrode* (HMDE), *boron doped diamond electrode* (BDDE) and *glassy carbon electrode* (GCE). Consequently, the nature of the process (diffusion, adsorption) at appropriate working electrode was determined. Also, the number of transferred electrons and protons during the process to set the appropriate redox mechanisms for varenicline and brimonidine was obtained. The number of transferred electrons in the processes of oxidation was determined not only based on the results of cyclic voltammetry at solid electrodes, but also on the basis of the results obtained by the additional differential pulse voltammetry (DPV). Mutual comparison of electrochemical behaviour of these two drugs have been established some similarities and differences in their behaviour in accordance to the similarities and differences in their molecular structures. Behavioural similarities have been attributed to presence of quinoxaline core in molecular structure of both drugs, and behavioural differences are explained by the influences of substituents or conjugated ring on the physico-chemical properties of overall molecules. Hence, it was found that the reduction process of varenicline occurs more easily compared to the reduction process of brimonidine.

Based on the obtained cyclic voltammetric results as well as on the square wave voltammetric (SWV) results the reversibility degree of the process was defined.

It was found that the reduction of varenicline takes place in the C=N bond of quinoxaline core with participation of two electrons and two protons in a wide pH range (2.0 – 11.0) forming 1,4-dihydro-varenicline. The degree of reversibility of the process increases with increasing of pH value and is the highest in basic media. In acidic media at pH < 6.0; additional reduction step of varenicline takes a place forming 1,2,3,4-tetrahydro-varenicline. The first degree of reduction happens gradually with formation of intermediate radical, with the first addition of proton and then transfer of one electron in each step. After reduction, the quasi-reversible oxidation process of 1,4-dihydro-varenicline (a product of reduction) occurs including transfer of one electron and one proton forming 2-hydroxy-1,4-dihydrovarenicline.

The reduction of brimonidine results in forming 1,4-dihydro-brimonidine in a wide pH range (2.0 – 11.0) as the consequence of two electrons and two protons reduction process of C=N bond in quinoxaline core. The reversibility degree increases with increasing of pH value. The additional degree of reduction occurs only in the strong acid media (pH = 2.0 i 3.0) including two electrons and two protons and forming 1,2,3,4-tetrahydro-brimonidine. The oxidation of brimonidine is carried out through two separate independent processes: 1) a process dependent of previous reduction and 2) a process independent of previous reduction. After reduction (1), a quasi-reversible oxidation process of 1,4-dihydro-brimonidine (product of reduction) happens with transfer of one electron and one proton forming 2-hydroxy-1,4-dihydrobrimonidine. The irreversible oxidation process (2) takes a place on the secondary amine in position 6 with the participation of one electron and one proton, forming *N*-radical of brimonidine.

The quantitative analysis results of varenicline and brimonidine in different matrices obtained by applied appropriate optimized electroanalytical methods, pointed out methods of choice. Based on reversible reduction peak, SWV/BDDE method has been selected for determination of varenicline in tablets and spiked blood plasma, as well as for determination of brimonidine in eye drops. Method DPV/BDDE based on irreversible oxidation peak was successfully applied for determination of brimonidine in spiked samples of aqueous humor. Stability study of brimonidine in a sample of spiked

aqueous humor is shown that the sample frozen for two months is not subjected to a significant change. The sample with analyte may be subjected to only a single cycle of freeze/thawing.

The results obtained by applying adsorptive transfer stripping technique (AdTS) and HMDE indicated reversible interaction between varenicline and DNA defined as intercalation. The reduced form of varenicline binds more strongly to DNA than the oxidized form of varenicline.

Key words: varenicline, brimonidine, electrochemical behaviour, voltammetry, redox mechanism, determination, stability, intercalation

Scientific Field: Pharmacy

Narrow Scientific Field: Pharmaceutical-medicinal chemistry and structural analysis

UDK number: 544.018:[545.55:615.217.2/.3(043.3)

SADRŽAJ:

| | |
|---|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1 Vareniklin i brimonidin – farmakološki aktivni derivati hinoksalina | 2 |
| 1.2. Struktura i fizičko-hemijska svojstva vareniklina i brimonidina | 5 |
| 1.3. Literaturni pregled analitičkih metoda za praćenje vareniklina i brimonidina u biološkim uzorcima i doziranim oblicima | 6 |
| 1.4. Voltametrijske metode | 9 |
| 1.4.1. Koncentracioni profili i vrste kretanja u rastvoru | 9 |
| 1.4.2. Nernstov izraz i vrste elektroda | 12 |
| 1.4.3. Polarografija (sa jednosmernom strujom) (<i>Direct Current Polarography, DCP</i>) | 17 |
| 1.4.4. Ciklična voltometrija (<i>Cyclic Voltammetry, CV</i>) | 21 |
| 1.4.5. Diferencijalno pulsna voltometrija (<i>Differential Pulse Voltammetry, DPV</i>) | 26 |
| 1.4.6. Voltometrija pravougaonih talasa (<i>Square Wave Voltammetry, SWV</i>) | 28 |
| 1.4.7. Adsorptivne voltametrijske tehnike: Diferencijalno pulsna voltometrija sa adsorpcionim obogaćivanjem i rastvaranjem (<i>Adsorptive Stripping Differential Pulse Voltammetry, AdSDPV</i>); Voltometrija pravougaonih talasa sa adsorpcionim obogaćivanjem i rastvaranjem (<i>Adsorptive Stripping Square Wave Voltammetry, AdSSWV</i>) | 32 |
| 1.5. Validacija analitičke metode | 33 |
| 1.6. Ispitivanje interakcije DNK – lek | 36 |
| 1.6.1. Adsorptivna transfer „ <i>stripping</i> ” tehnika (<i>Adsorptive Transfer Stripping Technique, AdTS</i>) | 41 |
| 2.CILJ RADA | 42 |
| 3.EKSPERIMENTALNI DEO | 44 |
| 3.1. Oprema | 45 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2. Računarski programi | 46 |
| 3.3. Hemikalije | 47 |
| 3.4. Laboratorijski materijal | 48 |
| 3.5. Procedure | 49 |
| 3.5.1. Priprema rastvora i uzorci za analizu | 49 |
| 3.5.1.1. Priprema polaznih rastvora i pufera za elektrohemijsko proučavanje vareniklina i brimonidina | 49 |
| 3.5.1.2. Priprema doziranog oblika vareniklina - Champix® tableta za analizu | 50 |
| 3.5.1.3. Dozirani oblik brimonidina – Alphagan® kapi za oči | 51 |
| 3.5.1.4. Priprema uzorka humane krvne plazme | 51 |
| 3.5.1.5. Priprema uzorka humane očne vodice | 52 |
| 3.5.2. Priprema čvrstih elektroda – GCE i BDDE | 53 |
| 3.5.3. Elektrohemijsko ispitivanje vareniklina i brimonidina | 55 |
| 3.5.3.1. Uslovi i procedure za ispitivanje uticaja pH na elektrohemijsko ponašanje vareniklina – CV i DCP | 55 |
| 3.5.3.2. Uslovi i procedure za elektrohemijsko proučavanje brimonidina - CV i DCP | 56 |
| 3.5.3.3. Procedura za AdSSWV metodu u ispitivanju adsorptivnih svojstava vareniklina na HMDE | 56 |
| 3.5.3.4. Procedura adsorptivne transfer „stripping” tehnike (AdTS) | 56 |
| 3.5.3.5. Procedura ispitivanja interakcije vareniklina i DNK | 57 |
| | |
| 4. REZULTATI I DISKUSIJA | 58 |
| 4.1. Elektrohemijsko ponašanje brimonidina i vareniklina | 59 |
| 4.1.1. Proučavanje elektrohemijskog ponašanja brimonidina i vareniklina primenom DCP | 59 |
| 4.1.1.1. Uticaj pH vrednosti sredine na polarografsko ponašanje brimonidina i vareniklina (DCP) | 67 |
| 4.1.2. Proučavanje elektrohemijskog ponašanja vareniklina i brimonidina primenom ciklične voltametrije (CV) | 70 |
| 4.1.2.1. HMDE | 70 |

| | |
|--|------------|
| 4.1.2.2. BDDE | 75 |
| 4.1.2.3. GCE | 81 |
| 4.1.2.4. Uticaj brzine promene potencijala na intenzitet struje ciklovoltametrijskih pikova | 90 |
| 4.1.3. Karakterizacija elektrodnog procesa za postavljanje redoks mehanizma brimonidina i vareniklina | 96 |
| 4.1.4. Redoks mehanizam brimonidina i vareniklina | 105 |
| 4.2. Kvantitativna analiza vareniklina i brimonidina | 115 |
| 4.2.1. Voltametrijsko određivanje vareniklina | 115 |
| 4.2.1.1. Optimizacija metoda za određivanje vareniklina | 115 |
| 4.2.1.1.1. Optimizacija AdSSWV/HMDE metode za određivanje vareniklina | 115 |
| 4.2.1.1.2. Optimizacija AdSSWV/GCE metode za određivanje vareniklina | 117 |
| 4.2.1.1.3. Optimizacija SWV/BDDE metode za određivanje vareniklina | 117 |
| 4.2.1.2. Validacija metoda za određivanje vareniklina | 118 |
| 4.2.1.2.1. Validacija AdSSWV/HMDE metode za određivanje vareniklina | 118 |
| 4.2.1.2.2. Validacija metode SWV/GCE za određivanje vareniklina u opterećenom uzorku krvne plazme | 120 |
| 4.2.1.2.3. Validacija metode SWV/BDDE za određivanje vareniklina u opterećenom uzorku krvne plazme | 122 |
| 4.2.2. Voltametrijsko određivanje brimonidina | 126 |
| 4.2.2.1. Optimizacija metoda za određivanje brimonidina | 126 |
| 4.2.2.1.1. Optimizacija DPV/BDDE i SWV/BDDE metode za određivanje brimonidina | 126 |
| 4.2.2.1.2. Optimizacija DPV/GCE metode za određivanje brimonidina | 127 |
| 4.2.2.2. Validacija metoda za određivanje brimonidina | 128 |

| | |
|---|------------|
| 4.2.2.2.1. Validacija DPV/BDDE i SWV/BDDE metode za određivanje brimonidina u doziranom obliku | 128 |
| 4.2.2.2.2. Validacija DPV/GCE metode za određivanje brimonidina u doziranom obliku | 133 |
| 4.2.2.2.3. Validacija metode DPV/BDDE za određivanje brimonidina u opterećenom uzorku očne vodice | 136 |
| 4.2.2. Diskusija rezultata kvantitativne analize | 144 |
| 4.3. Interakcija DNK–vareniklin | 147 |
| 4.3.1. Adsorptivno svojstvo vareniklina | 147 |
| 4.3.2. Uticaj vremena akumulacije (t_{acc}) | 148 |
| 4.3.3. Uticaj potencijala akumulacije (E_{acc}) | 148 |
| 4.3.4. Uticaj koncentracije na stepen adsorpcije vareniklina na površini HMDE | 150 |
| 4.3.5. Utvrđena interakcija vareniklina i DNK | 152 |
| 5. ZAKLJUČAK | 156 |
| 6. LITERATURA | 162 |
| 7. PRILOZI | 179 |
| 8. BIOGRAFIJA | 182 |

LISTA SKRAĆENICA:

VAR – Vareniklin

FDA - *Food and Drug Administration*

EMA - *European Medicines Agency*

BRIM – Brimonidin

IOP - Intraokularni pritisak

MAO – Monoaminooksidaza

DNK – Dezoksiribonukleinska kiselina

HMDE – Elektroda viseće živine kapi (*Hanging Mercury Drop Electrode*)

GCE – Elektroda od staklastog ugljenika (*Glassy Carbon Electrode*)

QUI – Hinoksalin

HPLC - Visokoefikasna tečna hromatografija (*High Performance Liquid Chromatography*)

LOD - Granica detekcije, limit detekcije (*Limit of Detection*)

LOQ – Granica određivanja, limit kvantifikacije (*Limit of Quantification*)

ICH – *International Conference on Harmonization*

HPLC-MS - Visokoefikasna tečna hromatografija spregnuta sa masenom spektrometrijom (*High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*)

HPLC-MS/MS - Visokoefikasna tečna hromatografija sa tandem masenom spektrometrijom (*High Performance Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrometry*)

HPLC-MS-NMR - Visokoefikasna tečna hromatografija spregnuta sa masenom spektrometrijom i nuklearnom magnetnom rezonancom (*High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry – Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry*)

GC-MS - Gasna hromatografija spregnuta sa masenom spektrometrijom (*Gas Chromatography – Mass Spectrometry*)

CE - Kapilarna elektroforeza (*Capillary Electrophoresis*)

LC-MS/MS - Tečna hromatografija spregnuta sa tandem masenom spektrometrijom (*Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrometry*)

RP-HPLC - Visokoefikasna tečna hromatografija reverznih faza (*Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography*)

LC - Tečna hromatografija (*Liquid Chromatography*)

DME - Kapljuća živina elektroda (*Dropping Mercury Electrode*)

SMDE – Elektroda stacionarne živine kapi (kap stalne površine) (*Static Mercury Drop Electrode*)

BDDE - Borom dopirana dijamantska elektroda (*Boron Doped Diamond Electrode*)

OT – Oksidovana površina (elektrode) (*Oxygen Terminated*)

HT – Redukovana površina (elektrode) (*Hydrogen Terminated*)

DCP - Polarografija sa jednosmernom strujom (*Direct Current Polarography*)

IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*

CPE – Elektroda od ugljenične paste (*Carbon paste electrode*)

CV - Ciklična voltometrija (*Cyclic Voltammetry*)

DPV - Diferencijalno pulsna voltometrija (*Differential Pulse Voltammetry*)

SWV - Voltometrija pravougaonih talasa (*Square Wave Voltammetry*)

AdSDPV - Diferencijalno pulsna voltometrija sa adsorpcionim obogaćivanjem i rastvaranjem (*Adsorptive Stripping Differential Pulse Voltammetry*)

AdSSWV - Voltometrija pravougaonih talasa sa adsorpcionim obogaćivanjem i rastvaranjem (*Adsorptive Stripping Square Wave Voltammetry*)

RSD – relativna standardna devijacija

SD – standardna devijacija

AdTS - Adsorptivna transfer *stripping* tehnika (*Adsorptive Transfer Stripping Technique*)

BR – Briton-Robinsonov (puffer)

H₂QUI - 1,4-dihidrohinosalin

H₄QUI – 1,2,3,4-tetrahidrohinosalin

1,4-H₂BRIM – 1,4-dihidrobriimidin

1,2,3,4-H₄BRIM - 1,2,3,4-tetrahidrobriimidin

2-OH-1,4-H₂BRIM - 2-hidroksi-1,4-dihidrobriimidin

BRIM[•] - *N-radikal* briimidina

1,4-H₂VAR - 1,4-dihidrovareniklin

1,2,3,4-H₄VAR - 1,2,3,4-tetrahidrovareniklin

HVAR[·] - Vareniklin-radikal

HVAR⁺ - Protonovani oblik vareniklina

2-OH-1,4-H₂VAR - 2-hidroksi-1,4-dihidrovareniklin

LSV - Voltometrija sa linearnom promenom potencijala (*Linear Sweep Voltammetry*)

AdSLSV - Voltometrija sa linearnom promenom potencijala i adsorpcionim obogaćivanjem i rastvaranjem (*Adsorptive Stripping Linear Sweep Voltammetry*)

1. UVOD

1.1. Vareniklin i brimonidin – farmakološki aktivni derivati hinoksalina

Vareniklin i brimonidin predstavljaju derivate hinoksalina (benzopirazina) sa farmakološkim dejstvom. Do sada su utvrđene brojne biološke aktivnosti i biomedicinska primena hinoksalinskih derivata kao što je: antimikrobna,¹⁻³ antiinflamatorna,⁴ metabolička – hipoglikemijska,⁵ antitumorska,^{6,7} u terapiji neuroloških oboljenja.^{8,9} Vareniklin se koristi za odvikavanje od pušenja, a brimonidin u terapiji glaukoma.

Vareniklin (VAR, 7,8,9,10-tetrahidro-6,10-metano-6*H*-pirazino[2,3-*h*][3] benzazepin) je sintetisan sa ciljem da se poboljša efikasnost u odvikavanju od pušenja, a 2006. godine odobren je od strane FDA (*Food and Drug Administration*) i EMA (*European Medicines Agency*) za upotrebu.^{10,11} Na američkom tržištu dostupan je Chantix® (*Pfizer Inc.*), a na pojedinim evropskim tržištima Champix® (*Pfizer Inc.*), pri čemu oba predstavljaju komercijalno dostupne farmaceutske oblike (tablete; 0,5 mg ili 1,0 mg vareniklina u obliku vareniklin-tartarata).¹²

Tokom dugog vremenskog perioda proučava se efekat pušenja na celokupno zdravlje ljudi.¹³ Hronični bronhitis i kancer pluća jesu najteža oboljenja uzrokovana pušenjem, ne samo kod aktivnih, već i kod pasivnih pušača. Dodatni problem kod pušenja jeste postojanje zavisnosti koja je uzrokovana aktivnim sastojkom duvana – nikotinom. Mogućnost rešavanja ovog problema je dvojaka: primena nikotinske supstitucione terapije ili tzv. nenikotinske terapije (npr. bupropionom).¹⁴

Ciljno mesto delovanja vareniklina jesu $\alpha_4\beta_2$ nikotinski holinergički receptori. VAR je tokom ispitivanja *in vitro* postigao 45% maksimalne aktivnosti nikotina, te je okarakterisan kao selektivan parcijalni agonist pomenutih receptora. Naime, polazeći od činjenica da afinitet predstavlja sposobnost leka da se veže za receptore, a da efikasnost odražava sposobnost aktivacije receptora za koje je lek vezan, može se definisati i parcijalni agonizam. To je karakteristika lekova sa umerenom efikasnošću i submaksimalnim efektom, uprkos stopostotnoj okupiranosti receptora. Antagonist jeste lek koji se vezuje za receptor, ali ne dovodi do njegove aktivacije i ujedno sprečava

vezivanje agoniste za receptor, te je krajnji ishod izostanak farmakološkog odgovora.¹⁵ Antagonističko dejstvo VAR u odnosu na nikotin potvrđeno je ispitivanjima *in vitro* i *in vivo* koja su pokazala da vareniklin dovodi do smanjenog oslobađanja dopamina. Vareniklin proizvodi subjektivne efekte pušenja (prvenstveno osećaj prijatnosti i zadovoljstva) parcijalnom aktivacijom nikotinskih receptora, a istovremeno sprečava njihovu potpunu aktivaciju nikotinom. Otuda se vareniklin može okarakterisati kao sredstvo specifično za tretman nikotinske zavisnosti i to sa dvojnim mehanizmom dejstva svojstvenim parcijalnim agonistima.^{16,17}

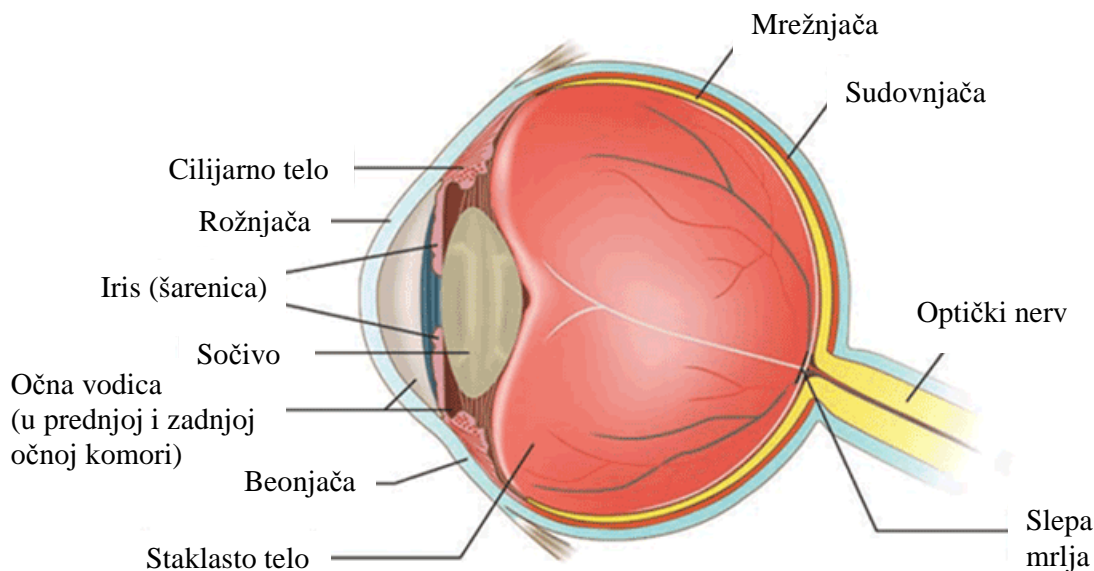
Vareniklin je relativno mali molekul koji nakon oralne primene pokazuje dobru resorpciju. Step en vezivanja vareniklina za proteine plazme je relativno nizak (~20%). Prisustvo metabolita (<10% vareniklina podleže metabolizmu) nastalih *N*-karbamoil konjugacijom, *N*-formilacijom i oksidacijom potvrđeno je u cirkulaciji i urinu. Vareniklin nije supstrat enzima citohroma P-450, samim tim nije njihov inhibitor, niti aktivator. VAR se iz organizma eliminiše uglavnom u nepromenjenom obliku (>90%), i to najvećim delom putem urina (99%) i vrlo malo fecesom (<1%). Poluvreme eliminacije vareniklina iznosi 24h, njegova maksimalna koncentracija u plazmi postiže se nakon 4h, a ravnotežna koncentracija nakon 4 dana primene.^{18,19}

Brimonidin (BRIM; 5-Bromo-*N*-(4,5-dihidro-1*H*-imidazol-2-il) hinoksalin-6-amin) predstavlja simpatomimetik, za koje je karakterističan stimulišući efekat na nivou organa inervisanih adrenergičkim nervima.¹⁵ Njegova primena u terapiji glaukoma odobrena je od strane FDA (*Food and Drug Administration*) i na tržištu je dozirani oblik prisutan od 1996. godine u vidu kapi za oči, Alphagan® (0,2% rastvor brimonidin-tartarata) i od 1997. godine Alphagan® (0,5% rastvor brimonidin-tartarata),²⁰ a zatim i Alphagan® P (0,15% i 0,1% brimonidin-tartarat)²¹ (*Allergan Pharmaceuticals Ireland*). Na našem tržištu postoje i druge registrovane paralele: Brimonal® (kapi za oči; 0,2% rastvor brimonidin-tartarata; *Unimed Pharma S.R.O.*; Slovačka Republika)²² i Brimonidine PharmaSwiss® (kapi za oči; 0,2% rastvor brimonidin-tartarata; *PharmaSwiss d.o.o.* Beograd, Srbija).²³

Glaukom predstavlja drugi vodeći uzrok nepovratnog gubitka vida,^{24,25} a incidenca raste sa starošću, tako da je starija populacija najugroženija ovom bolešću.^{26,27} Glaukom uglavnom nastaje zbog povećanog intraokularnog pritiska (IOP) usled porasta

zapremine očne vodice u oku, mada je potvrđeno postojanje glaukoma i u slučajevima sa normalnim vrednostima pritiska (IOP < 22 mm Hg stuba). Prema tome, glaukom se može generalno okarakterisati kao hronična progresivna optička neuropatija koja dovodi do promena na optičkom nervu i posledično do defekata u vidnom polju.²⁸ Kod pacijenata sa akutnim glaukomom dolazi do iznenadnog i značajnog povećanja IOP, što vremenom može dovesti do potpunog gubitka vida.²⁹

Farmakoterapeutici za glaukom, za slučaj kada je uslovljen povećanim IOP, mogu se aplikovati lokalno ili sistemski. Mehanizmi terapijskog dejstva lekova za tretman glaukoma zasnivaju se na: smanjenju produkcije očne vodice u cilijarnom telu, povećanju drenaže očne vodice putem trabekularne mreže i povećanju oticanja očne vodice preko uveoskleralnih puteva.^{30,31} Fiziološka uloga očne vodice u oku je višestruka: ishrana nevaskularizovanih struktura oka (rožnjače i sočiva) i odvođenje metabolita nastalih u njima, učešće u refrakciji svetlosnih zraka, a najvažnija uloga jeste održavanje odgovarajućeg i konstantnog IOP što je rezultat uspostavljene ravnoteže između brzine formiranja očne vodice i njenog oticanja iz oka.^{15,32,33} (Slika 1.).



Slika 1. Građa oka.³⁴

Među vrlo efikasnim lekovima koji se primenjuju u terapiji glaukoma jeste brimonidin, koji predstavlja α_2 -adrenergički agonist sa lokalnim dejstvom uz izraženu

visoku selektivnost, a samim tim i manji broj sporednih neželjenih efekata. Brimonidin pokazuje dobru bioraspoloživost u retini i ima minimalne sistemske efekte, pa je u tom pogledu bezbedan za primenu, a podnošljivost pri lokalnoj primeni je veoma dobra. Mehanizam dejstva BRIM sastoji se u smanjenju IOP usled smanjene produkcije očne vodice i stimulacije njenog oticanja iz oka. Otuda indikacije za primenu brimonidina jesu: povišeni intraokularni pritisak kod pacijenata sa glaukomom otvorenog ugla ili okularnom hipertenzijom; kada primena jednog leka nije pokazala zadovoljavajuću efikasnost, te se uvodi polivalentna terapija uključujući i brimonidin; i u slučajevima kada je kontraindikovana terapija lokalnim β -blokatorima.^{35,36}

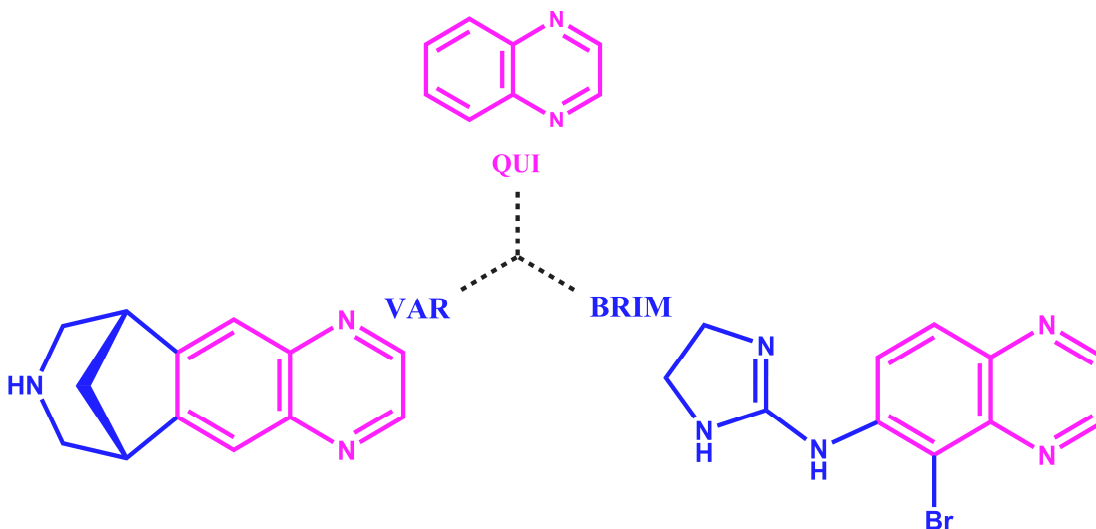
Brimonidin se aplikuje lokalno, ali je uprkos tome utvrđena njegova merljiva koncentracija u plazmi, čime se objašnjava sporedno sistemsko delovanje leka opisano u literaturi. BRIM prvenstveno podleže metabolizmu u jetri (posredstvom aldehyd oksidaze), a najvećim delom se u nepromenjenom obliku ili u formi svojih metabolita eliminiše iz organizma putem urina. Poluvreme eliminacije brimonidina iznosi oko 3h i jedan je od najbezbednijih lekova za dugotrajnu primenu kod hroničnog glaukoma. BRIM je lek izbora kod pacijenata sa kardiopulmonarnim problemima kod kojih se ne može primeniti terapija β -blokatorima, dok je primena brimonidina kontraindikovana kod pacijenata koji koriste inhibitore MAO (monoaminooksidaze) ili antidepresive sa modulatornim dejstvom na nivou noradrenergičke transmisije.^{15,34,36-38}

1.2. Struktura i fizičko-hemijska svojstva vareniklina i brimonidina

Vareniklin ($C_{13}H_{13}N_3$) (**Shema 1.**) je relativno mali molekul ($M_r = 211,27$), hidrofilan ($\log P = 1,1$) sa svojstvima slabe baze ($pK_a = 9,2$ koja odgovara sekundarnom aminu). Sadrži jedan donor i tri akceptora vodonične veze. U doziranim oblicima zastupljen je u obliku vareniklin-tartarata ($C_{13}H_{13}N_3 \cdot C_4H_6O_6$) ($M_r = 361,35$), koji predstavlja belu do bledo žutu praškastu supstancu, dobro rastvornu u vodi.^{39,40} S obzirom da hinoksalinsko jezgro, sadržano u vareniklinu, predstavlja planarnu aromatičnu strukturu i da je za neke derivate hinoksalina već potvrđena antitumorska aktivnost zasnovana na interakciji sa DNK,⁴¹ otuda se mogla pretpostaviti adsorpcija

vareniklina na elektrodama sa svojstvom da adsorbuju organske molekule na svojoj površini (HMDE, GCE), kao i potencijalna interakcija vareniklina i DNK.

Brimonidin ($C_{11}H_{10}BrN_5$) (**Shema 1.**) ($M_r = 292,14$) je relativno lipofilan molekul ($\log P = 1,37$), što se može pripisati prisustvu Br na poziciji C5, samim tim gotovo je nerastvoran u vodi, a ratvoran u etanolu ($< 8 \text{ mg ml}^{-1}$). Iz etanolnog rastvora dobija se u obliku žutih kristala, tačke topljenja od $252 \text{ }^\circ\text{C}$. Vrednost $pK_a = 7,4$ odgovara sekundarnom aminu. Sadrži pet akceptora i dva donora vodonične veze. U doziranom obliku prisutan je u formi brimonidin-tartarata ($C_{11}H_{10}BrN_5 \cdot C_4H_6O_6$) ($M_r = 442,23$), dok je u anhidrovanom obliku u formi bele do svetlo žute praškaste supstance, dobro rastvorne u vodi. So pokazuje i optičku aktivnost. Kristali dobijeni iz rastvora acetona imaju tačku topljenja na $207,5 \text{ }^\circ\text{C}$.^{39, 42,43}



Shema 1. Strukturne formule vareniklina (VAR), brimonidina (BRIM) i hinoksalina (QUI).

1.3. Literaturni pregled analitičkih metoda za praćenje vareniklina i brimonidina u biološkim uzorcima i doziranim oblicima

Farmakološka efikasnost i stepen bezbednosti primene leka stoje u tesnoj vezi sa nivoom koncentracije leka u plazmi, urinu, ciljnom tkivu i u biološkim tečnostima na mestu lokalne primene. Otuda proističe potreba za razvojem novih analitičkih metoda za

određivanje lekova u različitim vrstama uzoraka: farmaceutskim doziranim oblicima i biološkim uzorcima. Zahtevi prilikom postavljanja svake analitičke metode, osim podrazumevane tačnosti, preciznosti i osetljivosti, jesu: što kraće vreme izvođenja, ekonomičnost, jednostavnost pripreme uzorka i izvođenja analize, i na kraju ekotoksikološka bezbednost.

Literaturni podaci ukazuju da su do sada razvijene i primenjivane različite analitičke metode za određivanje vareniklina u različitim vrstama uzoraka. Kadi i saradnici⁴⁴ postavili su i uspešno primenili visokoefikasnu tečnu hromatografiju (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) za određivanje vareniklin-tartarata u tabletama i za procenu stabilnosti primenom studije forsirane degradacije. HPLC metoda je u potpunosti validirana ($LOD = 0,11 \mu\text{g ml}^{-1}$ i $LOQ = 0,38 \mu\text{g ml}^{-1}$), a rezultati studije stabilnosti pokazali su da je metoda u potpunosti primenljiva (zadovoljene ICH/FDA smernice) za određivanje vareniklina i pored prisutnih degradacionih produkata, odakle sledi da se može primenjivati u rutinskoj kontroli kvaliteta u industrijskim laboratorijama. Primenom visokoefikasne tečne hromatografije spregnute sa masenom spektrometrijom (*High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*, HPLC-MS) određivan je sadržaj vareniklina u uzorcima krvne plazme nakon samo jedne primenjene oralne doze kod populacije pušača i nepušača kako bi se utvrdila: farmakokinetička svojstva (maksimalna koncentracija u plazmi (C_{max}), vreme za postizanje maksimalne koncentracije u plazmi (t_{max}), minimalna koncentracija u plazmi (C_{min}), poluvreme eliminacije ($t_{1/2}$), uticaj doba dana aplikovanja i hrane na farmakokinetiku vareniklina.¹⁹ Visokoefikasna tečna hromatografija sa tandem masenom spektrometrijom (*High Performance Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrometry*, HPLC-MS/MS)⁴⁵ primenjena je za određivanje vareniklina u krvnoj plazmi sa ciljem: procene farmakokinetičkih osobina (maksimalna koncentracija u plazmi (C_{max}), vreme za postizanje maksimalne koncentracije u plazmi (t_{max}), minimalna koncentracija u plazmi (C_{min}), poluvreme eliminacije - $t_{1/2}$), bezbednosti i podnošljivosti vareniklina nakon višestruke oralne primene kod starije populacije (65-85 godina) nepušača. Obach i saradnici,¹⁸ primenom visokoefikasne tečne hromatografije sa tandem masenom spektrometrijom (*High Performance Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrometry*, HPLC-MS/MS) i visokoefikasne tečne hromatografije spregnute sa masenom spektrometrijom i nuklearnom magnetnom

rezonancom (*High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry – Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry*, HPLC-MS-NMR), određivali su sadržaj vareniklina i utvrdili prisustvo određenih metabolita u uzorcima seruma i krvne plazme životinja i ljudi nakon oralne primene, kao i da se najvećim delom vareniklin eliminiše iz organizma putem urina u nepromenjenom obliku.

Za određivanje brimonidina u plazmi nakon lokalne primene na oku, Acheampong i saradnici primenili su gasnu hromatografiju spregnutu sa masenom spektrometrijom (primenjena hemijska jonizacija uz nastajanje negativnih jona) (*Gas Chromatography – Mass Spectrometry*, GC-MS).⁴⁶ Najniža koncentracija koja je izmerena ovom metodom sa dovoljnom pouzdanošću iznosi $LOQ = 2 \text{ pg ml}^{-1}$, čime je pokazano da, iako lokalno aplikovan, brimonidin dospeva u sistemsku cirkulaciju i to u merljivoj količini. Cilj primenjene kapilarne elektroforeze (*Capillary Electrophoresis*, CE) za određivanje brimonidina u očnoj vodici i serumu⁴⁷ bio je da se korelira efikasnost u smanjenju IOP sa nivoom brimonidina. Odatle sledi da je optimalni period lokalne primene 6 h. Primenom tečne hromatografije spregnute sa tandem masenom spektrometrijom (*Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrometry*, LC-MS/MS) određivan je sadržaj brimonidina u tečnostima (u očnoj vodici $LOQ = 1 \text{ ng ml}^{-1}$) i tkivima oka (u staklastom telu najniži $LOQ = 1,6 \text{ ng ml}^{-1}$).⁴⁸ Takamura i saradnici su primenjenom tečnom hromatografijom spregnutom sa tandem masenom spektrometrijom (*Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrometry*, LC-MS/MS) određivali sadržaj brimonidina u očnoj vodici i staklastom telu nakon dvodnevne lokalne primene 0,1% kapi za oči u toku sedam dana pre operacije. Utvrđeni su stostruko veći nivoi koncentracija brimonidina u očnoj vodici u odnosu na staklasto telo, otuda je penetracija leka u staklasto telo slaba, ali dovoljna za ostvarivanje neuroprotektivnog efekta.⁴⁹ Visokoeffikasnom tečnom hromatografijom (HPLC)⁵⁰ uspešno je određivan sadržaj brimonidina u serumu i očnoj vodici sa ciljem da se odredi vreme potrebno za postizanje maksimalne koncentracije u njima. Shirke i saradnici primenili su metodu visokoeffikasne tečne hromatografije reverznih faza (*Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography*, RP-HPLC) za određivanje brimonidin-tartarata u doziranom obliku - kapima za oči.⁵¹ Kako bi se utvrdili i poredili nivoi koncentracija brimonidina u očnoj vodici nakon lokalne primene dva dozirana oblika različitih koncentracija brimonidina (0,1% i 0,15%), primenjena je

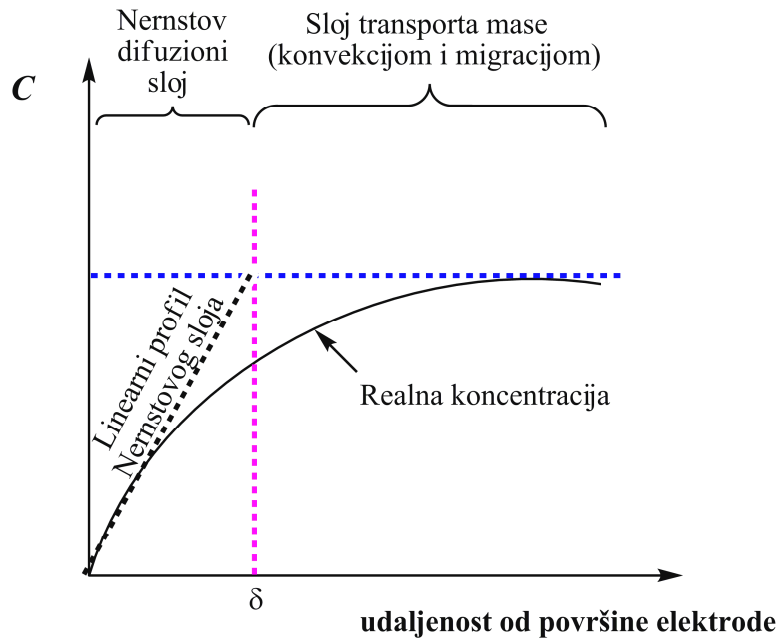
visokoefikasna tečna hromatografija spregnuta sa tandem masenom spektrometrijom (*High Performance Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrometry*, HPLC-MS/MS). Utvrđeno je da su izmerene koncentracije brimonidina u očnoj vodici direktno proporcionalne koncentracijama ovog leka u primenjenim kapima za oči.⁵² Metoda tečne hromatografije (*Liquid Chromatography*, LC) primenjena je za određivanje nečistoća brimonidina dobijenih nakon stres-uslova propisanih ICH smernicama, a u prisustvu brimonidin-tartarata.⁵³

Do sada nisu postavljene voltametrijske metode za određivanje vareniklina i brimonidina u biološkim uzorcima i doziranim oblicima uz upotrebu (komercijalnih) čvrstih elektroda, uzimajući u obzir da oba leka sadrže elektroaktivne grupe. Prednosti voltametrije nad postojećim instrumentalnim metodama jesu: brzo izvođenje analize (od nekoliko sekundi do nekoliko minuta), jednostavnost izvođenja analize, visoka osetljivost, komercijalna pristupačnost, odnosno ekonomičnost i jednostavna priprema uzorka za analizu.^{54,55} Uzimajući u obzir gore navedeno, u ovom radu ispitivanja su bila usmerena ka postavljanju nove elektroanalitičke metode za određivanje vareniklina (u tabletama i plazmi) i brimonidina (u kapima za oči i očnoj vodici) upotrebom čvrstih elektroda.

1.4. Voltametrijske metode

1.4.1. Koncentracioni profili i vrste kretanja u rastvoru

Razmena elektrona između elektroaktivne vrste i radne elektrode odvija se samo u vrlo tankom sloju rastvora uz samu površinu elektrode (0,01 – 0,001 cm) i to je tzv. **Nernstov difuzioni sloj (Slika 2.)**. Pri odvijanju elektrohemijske reakcije dolazi do promene oksidacionog stanja elektroaktivne vrste, te je potrebno obnavljanje početne vrste u ovom sloju radi kontinuiranog toka reakcije.



Slika 2. Koncentracijski profili u zavisnosti od udaljenosti od površine elektrode.

Brzina odvijanja neke elektrohemijske reakcije određena je dvjema brzinama: transporta mase (pristizanja oksido/reduktibilne vrste na površinu elektrode) i transporta elektrona (na koju se slabo može uticati s obzirom da je osim temperaturom, definisana i prirodom reakcije i karakteristikama površine elektrode). Transport mase može se odvijati na 3 načina:

1. **difuzijom** – premeštanjem jona/molekula sa mesta veće koncentracije na mesto manje koncentracije, odnosno prema koncentracijskom gradijentu između sloja rastvora u blizini površine elektrode i preostale zapremine rastvora u ćeliji,
2. **konvekcijom** – prisilnim mešanjem ili vibriranjem rastvora (rezultuje smanjenjem difuzionog sloja),
3. **migracijom** – kretanjem jonskih vrsta pod uticajem električnog polja (suprimira se koncentracijom osnovnog elektrolita većom 50 do 100 puta od koncentracije analita).

U zavisnosti od udaljenosti od površine elektrode i od efekta mešanja rastvora, moguće je sagledati koncentracione profile. Ukoliko elektroaktivni analit označimo sa X, a nakon obavljene elektrolize njegov produkt sa Y ($X + ne^- \rightarrow Y$); onda su odgovarajuće početne koncentracije u rastvoru C_X i C_Y , a odgovarajuće koncentracije u tankom sloju uz površinu elektrode C_X^o i C_Y^o . Postupkom mešanja, dolazi do formiranja određenih slojeva rastvora sa određenim tipovima kretanja u rastvoru:

- a) *Nernstov difuzioni sloj* uz samu površinu elektrode u kojem rastvor potpuno miruje i u njemu se koncentracije reaktanata i proizvoda menjaju sa promenom udaljenosti od same površine elektrode;
- b) *Sloj laminarnog kretanja* u rastvoru u kojem se slojevi tečnosti kreću u istom smeru i pravcem paralelnim površini elektrode;
- c) *Sloj turbulentnog kretanja* u dubini rastvora u kojem je prisutno kretanje u različitim pravcima.

Uzimajući u obzir da je površina elektrode veoma mala, nakon kratkotrajne elektrolize, u dubini rastvora ostaje gotovo nepromenjena koncentracija analita X ($C_X \approx const$), dok je koncentracija nastalog proizvoda Y, $C_Y \approx 0$. U Nernstovom difuzionom sloju koncentracija proizvoda Y opada linearno sa porastom rastojanja od površine elektrode do vrednosti približno jednake 0. Konačno, pri adekvatnoj vrednosti primenjenog potencijala, svi molekuli/joni analita X koji dospevaju na površinu elektrode podležu elektrolizi dajući molekule/jone proizvoda Y, koji brzo difunduju kroz rastvor, te koncentracija proizvoda u blizini površine elektrode ostaje konstantna ($C_Y \approx const$), a koncentracija analita X je $C_X \approx 0$. Prethodni zaključci dovode se u vezu sa voltametrijskim signalom - intenzitetom struje putem sledećeg izraza (1):

$$I = nFAD_X \left(\frac{\Delta C_X}{\Delta d} \right) \quad (1)$$

I – intenzitet struje (A),

n – broj razmenjenih elektrona (mol e^- na mol analita X),

F – Faradejeva konstanta (96 485,3 C mol⁻¹),

A - površina elektrode (cm^2),

D_X – difuzioni koeficijent za analit X ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$),

C_X – koncentracija analita X (mol cm^{-3}),

$\left(\frac{\Delta C_X}{\Delta d}\right)$ - promena koncentracije analita X (C_X) sa udaljenošću (d (cm)) od

površine elektrode.

Ukoliko se odnos $\left(\frac{\Delta C_X}{\Delta d}\right)$ zameni aproksimacijom $\frac{C_X - C_X^0}{\delta}$, prethodni izraz

(1) dobija sledeći oblik (2):

$$I = \frac{nFAD_X}{\delta} (C_X - C_X^0) = k_X (C_X - C_X^0) \quad (2)$$

gde je δ (cm) – debljina Nernstovog difuzionog sloja, a $k_X = \frac{nFAD_X}{\delta} = \text{const}$. Kako je

po završetku elektrolize $C_X^0 \rightarrow 0$, to će intenzitet struje predstavljati graničnu struju ($I \rightarrow I_l$), i biti proporcionalan isključivo koncentraciji analita u dubini rastvora (3):⁵⁶

$$I_l = \frac{nFAD_X}{\delta} C_X = k_X C_X \quad (3)$$

Dati izraz predstavlja osnovnu relaciju direktne proporcionalnosti intenziteta struje i koncentracije analita u rastvoru, i na njoj se zasniva elektroanalitička kvantitativna analiza elektroaktivnih vrsta u rastvoru.

1.4.2. Nernstov izraz i vrste elektroda

U elektrohemijskoj ćeliji, potencijal radne elektrode zavisi od aktiviteta oksidovanog i redukovanog oblika analita i može se predstaviti **Nernstovom jednačinom** (4):

$$E = E^\circ + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{ox}}{a_{red}} \quad (4)$$

odnosno

$$E = E^\circ + \frac{2,303RT}{nF} \log \frac{a_{ox}}{a_{red}} \quad (5)$$

E – potencijal elektrode

E° - standardni elektrodni potencijal određenog redoks para

R – molarna gasna konstanta ($8,31447 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)

T – temperatura (K)

n – broj razmenjenih elektrona

F – Faradejeva konstanta ($96485,3 \text{ C mol}^{-1}$)

a_{ox} , a_{red} – aktivitet oksidovane i redukovane vrste

Kako aktivitet predstavlja proizvod koeficijenta aktiviteta (γ) i molarne (količinske) koncentracije (C), u slučaju stalne jonske jačine rastvora koja se postiže relativno visokom koncentracijom inertnog pomoćnog elektrolita, Nernstov izraz dobija sledeći oblik (6):

$$E = E^\circ + \frac{0,059}{n} \log \frac{C_{ox}}{C_{red}} \quad (6)$$

Iz jednačine (6) sledi da je potencijal elektrode definisan koncentracijom oksidovanog i redukovanog oblika elektroaktivne vrste na površini elektrode.⁵⁷⁻⁵⁹

Elektrode, koje se primenjuju u voltametriji, mogu se podeliti na *referentne* (poznatog i konstantnog potencijala) i *radne* elektrode (čiji se potencijal meri u odnosu na referentnu elektrodu).

Najčešće primenjivane referentne elektrode jesu: srebro-srebrohloridna i kalomelova elektroda, a predstavljaju elektrode druge vrste.

Kapljuća živina elektroda (*Dropping Mercury Electrode, DME*) koristi se kao radna elektroda u polarografiji. U upotrebi je živina elektroda čije je kapljanje regulisano udarima „čekića”. Iz rezervoara, živu potiskuje igla u kapilaru, a samo otkidanje kapi odnosno kontrola „čekića” je pneumatska uz pomoć komprimovanog azota. Ovakav sistem omogućava primenu višenamenske elektrode odnosno njeno

funkcionisanje kao DME, HMDE ili SMDE (**Slika 3.**). Osnovna prednost DME jeste stalno obnavljanje kapi, što omogućava dobru reproduktivnost merenja zahvaljujući novoj površini kapi. Nedostatak ove elektrode je mogućnost primene samo u katodnom području potencijala i to u opsegu +0,3 do -2,0 V, jer bi pozitivnije vrednosti potencijala dovele do oksidacije žive i nastanka njenog oksida. Prema tome, korišćenjem DME moguće je analizirati samo reduktibilne vrste.^{57,59}



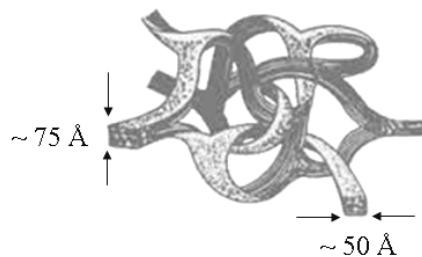
Slika 3. Višenamenska elektroda koja može funkcionisati kao HMDE, DME ili SME (Metrohm)

Elektroda viseće živine kapi (*Hanging Mercury Drop Electrode, HMDE*) formira se na vrhu kapilare pri čemu se kap zadržava tokom jednog snimanja. Naredno snimanje odvija se na novoformiranoj kapi, ali pomenuti sistem omogućava da se dobijaju ujednačene kapi žive što podrazumeva reproduktivnu površinu odnosno masu kapi (**Slika 3.**).

Danas se sve češće, umesto živine elektrode, primenjuju **čvrste elektrode**, te će neke od njih biti detaljnije opisane. Generalno, izbor radne elektrode zavisi od „prozora” radnog potencijala (*working potential window of the electrode*) koji je uslovljen/ograničen vrednostima potencijala na kojima dolazi do oksidacije odnosno redukcije rastvarača (npr. u vodenim rastvorima nastajanjem kiseonika odnosno vodonika). Osnovna prednost čvrstih elektroda nad živinom elektrodom jeste mogućnost primene kako katodnog tako i anodnog potencijala, odnosno praćenje oksidujućih i/ili redukujućih vrsta. Tačnije, redukcija H^+ -jona na živinoj elektrodi iz vodenog rastvora odvija se otežano i na znatno negativnijim vrednostima potencijala u

odnosu na čvrste elektrode, ali na njima je opseg radnog potencijala proširen u anodnoj oblasti do vrednosti potencijala na kojoj dolazi do oksidacije vode i nastajanja kiseonika. Kao što je već rečeno, na živinoj elektrodi u vodenom rastvoru elektrolita moguće je primeniti potencijal samo u katodnoj oblasti; dok je na ugljeničnoj elektrodi moguće primeniti potencijal od približno $-1,5$ V do približno $+1,5$ V. Pri odabiru čvrste elektrode treba uzeti u obzir dva najvažnija faktora: redoks svojstva analizirane elektroaktivne vrste i nivo kapacitivne struje u odabranom opsegu radnog potencijala. Treba istaći da je izuzetan izazov postići reproduktivnost površine čvrste elektrode u odnosu na obnavljajuću površinu žive, ali tom izazovu čvrste elektrode se suprotstavljaju svojim dobrim svojstvima mehaničke otpornosti i šire primenljivosti ne samo za redukujuće, već i za oksidujuće vrste.⁶⁰

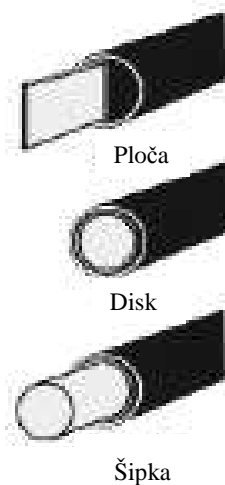
Elektroda od staklastog ugljenika (*Glassy Carbon Electrode, GCE*) je čvrsta elektroda sačinjena od materijala – staklastog ugljenika, koji je značajno čvršći i otporniji od forme grafita. Staklasti ugljenik dobija se izlaganjem polimernih (fenolnih ili polifurfurilalkoholnih) smola izuzetno visokoj temperaturi ($1000 - 3000$ °C) pod pritiskom u inertnoj atmosferi, čime materijal dobija izuzetnu čvrstinu (skoro kao dijamant) i dobru električnu provodljivost. Što je primenjena viša temperatura tokom izrade, to je čvrstina i električna provodljivost staklastog ugljenika bolja.^{61,61} Tehnika dobijanja staklastog ugljenika podrazumeva izlaganje materijala rastućoj temperaturi tokom nekoliko dana nakon čega nastaje visokokonjugovana sp^2 ugljenična mikrostruktura. Tako nastala forma staklastog ugljenika (**Slika 4.**)^{60,63} predstavljena je u vidu izuvijanih, gusto pakovanih traka aromatičnih polimera koje su međusobno povezane kovalentnim C-C vezama različitih energija. Staklasti ugljenik karakteriše se: mogućnošću poliranja zahvaljujući svojoj izuzetnoj čvrstini, nepropustljivošću prema tečnostima i gasovima, kao i hemijskom inertnošću.⁶⁰



Slika 4. Struktura staklastog ugljenika.⁶³

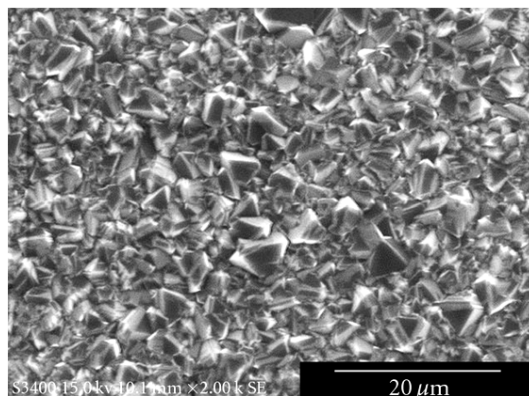
GCE se može primenjivati u širokom opsegu potencijala (do nastajanja vodonika na oko -1,5 V i do nastajanja kiseonika na oko +1,5 V), a izrađuje se u različitim geometrijskim oblicima u vidu šipke, diska ili ploče (**Slika 5.**).

Organska jedinjenja ispoljavaju izraženu sklonost ka adsorpciji na površini GCE.



Slika 5. GCE različitih geometrijskih oblika.⁶⁴

Borom dopirana dijamantska elektroda (*Boron Doped Diamond Electrode, BDDE*) je čvrsta elektroda izrađena od materijala koji predstavlja jednu od alotropskih modifikacija ugljenika u kojoj je jedan C-atom od hiljadu (1:1000) u dijamantskoj strukturi zamenjen atomom bora. Na ovaj način značajno je poboljšana električna provodljivost materijala i gotovo izjednačena sa provodljivošću nekog metalnog provodnika.⁶³ Dijamant predstavlja najtvrdi materijal u prirodi što se objašnjava njegovom kristalnom strukturom u kojoj su sp^3 – hibridizovani C-atomi postavljeni u temenima pravilnog tetraedra. Odlike dijamanta su izuzetna hemijska inertnost i nepropustljivost za vodu i organske rastvarače.⁶⁰



Slika 6. Površina komercijalno dostupne BDD elektrode.⁶⁵

Skлонost organskih molekula ka adsorpciji na površini BDDE (**Slika 6.**) je neznatna, a zahvaljujući svojim karakteristikama moguće ju je primeniti čak i u rastvorima jakih kiselina ili baza.⁶⁶⁻⁶⁹ Elektrohemijski odgovor BDDE u velikoj meri zavisi od elektrohemijske pripreme elektrode^{70,71} koja može biti anodna (*anodic pretreatment*) – primenom visoke pozitivne vrednosti potencijala tokom određenog vremena, ili katodna (*cathodic pretreatment*) – primenom potencijala velike negativne vrednosti. Anodnom pripremom nastaje OT (*oxygen terminated*) odnosno oksidovana površina BDD elektrode, a katodnom pripremom nastaje HT (*hydrogen terminated*) površina BDD elektrode. Takođe, elektrohemijski odgovor zavisi i od vrste elektrolita primenjenog tokom anodne/katodne pripreme.⁶⁰

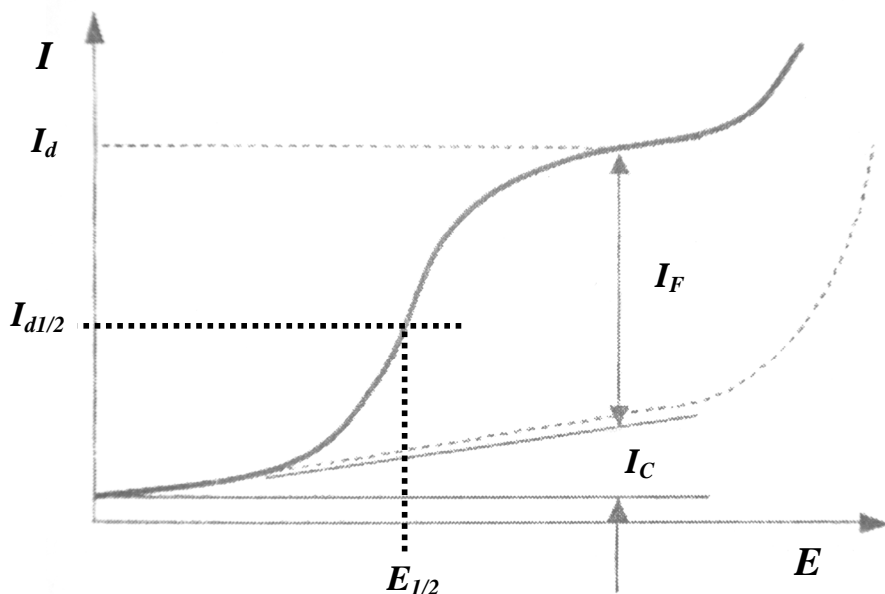
1.4.3. Polarografija (sa jednosmernom strujom)

(Direct Current Polarography, DCP)

Polarografija i voltametrijia predstavljaju elektroanalitičke metode zasnovane na merenjima zavisnosti struja - potencijal, odakle se dobijaju odgovarajuće krive – polarogrami odnosno voltamogrami. Prema IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) smernicama, polarografija predstavlja metodu u kojoj se koristi radna elektroda sa obnavljajućom površinom što prvenstveno podrazumeva upotrebu DME, a zatim i kasnije razvijene SMDE. Terminom voltametrijia obuhvaćene su sve

metode u kojima se kao radna elektroda koristi stacionarna elektroda konstantne površine, kao što su: HMDE, GCE, CPE, BDDE, Au, Pt, od kojih neke bivaju podvrgnute i dodatnoj modifikaciji površine.

Polarografija predstavlja elektroanalitičku metodu sa linearnim (jednosmernim) rastom potencijala tokom vremena i merenjem jednosmerne struje koja protiče kroz DME. Otuda se češće naziva polarografija sa jednosmernom strujom (*Direct Current Polarography*, DCP). DCP se odvija u uslovima polarizacije i depolarizacije pri elektrolizi na elektrodi male površine. Radna elektroda ima veoma malu površinu, te se promenom spoljašnjeg napona lako polarizuje (velika gustina struje, uprkos malom intenzitetu struje). Struja koja protiče kroz radnu elektrodu sastoji se iz dve komponente: faradejske (I_F) i kapacitivne (I_C) struje. Faradejska struja predstavlja merni (korisni) signal koji odgovara redukciji odnosno oksidaciji analita. Kapacitivna struja jeste ometajući signal i nastaje usled pražnjenja dvostrukog električnog sloja na površini radne elektrode. Granična difuziona struja (I_d) dobija se kada sav analit, dospo difuzijom do površine radne elektrode, biva redukovan/oksidovan te je po svojoj vrednosti jednaka maksimalnoj vrednosti faradejske struje (**Slika 7**).



Slika 7. Polutalasni potencijal ($E_{1/2}$), faradejska (I_F), kapacitivna (I_C) i granična difuziona (I_d) struja u polarografiji sa jednosmernom strujom (DCP).

Iz polarograma, može se identifikovati (na osnovu položaja talasa) i kvantifikovati (na osnovu granične difuzione struje) analit koji se redukovao/oksidovao. Položaj talasa karakteriše se polutalasnim potencijalom ($E_{1/2}$) koji predstavlja potencijal pri vrednosti struje $I_d/2$ tj. struji poluvisine talasa, a odnos granične difuzione struje (I_d) i koncentracije elektroaktivne vrste (C) dat je Ilkovičevom jednačinom (koja se odnosi na idealni slučaj reverzibilnog redoks sistema) (7):

$$I_d = 0,607 n D^{1/2} m^{2/3} t^{1/6} C \quad (7)$$

I_d – granična difuziona struja,

n – broj razmenjenih elektrona tokom elektrodne reakcije,

D – difuzioni koeficijent,

m – brzina isticanja žive,

t – vreme kapanja žive,

C – koncentracija analita

Oдавde sledi da je granična difuziona struja direktno proporcionalna koncentraciji elektroaktivnog analita u rastvoru:

$$I_d = k C \quad (8)$$

Vežu između potencijala elektrode i odgovarajuće jačine struje u bilo kojoj tački polarografskog talasa dali su Heyrovsky i Ilkovič sledećom jednačinom:

$$E = E_{1/2} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{I_d - I}{I} \quad (9)$$

u kojoj je $E_{1/2}$ polutalasnih potencijal, a I_d granična difuziona struja. Linearna zavisnost $\log \frac{I_d - I}{I}$ od E , daje vrednost nagiba pravca $n/0,059$ (pri $T = 298$ K).⁶⁸ Ukoliko se iz eksperimentalnih rezultata za nagib pomenute zavisnosti, dobije ceo broj za n (broj

razmenjenih elektrona), onda je reč o procesu koji je elektrohemijski reverzibilan. U suprotnom, radi se o ireverzibilnom procesu tokom koga dolazi do sporog prenosa elektrona. U tom slučaju, potencijal u bilo kojoj tački talasa dat je sledećim izrazom:

$$E = (E_{1/2})_{irev} + \frac{RT}{\alpha n_{\alpha} F} \ln \frac{I_d - I}{I} \quad (10)$$

pri čemu α predstavlja koeficijent prenosa, a n_{α} broj elektrona u najsporijem stupnju. Nagib pravca zavisnosti $\log \frac{I_d - I}{I}$ od E iznosi $\alpha n_{\alpha} / 0,059$ i odavde se može odrediti parametar αn_{α} . Pošto je kod reverzibilnih procesa $\alpha = 1$, a kod ireverzibilnih $\alpha \leq 1$; sledi da je reverzibilni talas strmiji od ireverzibilnog.

U slučaju da se elektrodni proces odvija uz učešće H^+ -jona, u toku redukcije dolazi do pomeranja polutalasnog potencijala ka negativnijim vrednostima sa porastom pH, što je prikazano jednačinom (11):

$$E_{1/2} = E_{1/2}^0 + m \frac{RT}{\alpha n_{\alpha} F} pH \quad (11)$$

u kojoj $E_{1/2}^0$ predstavlja polutaladni potencijal za slučaj kada H^+ -joni ne učestvuju u elektrodnom procesu, a m je broj protona (vodonikovih jona) koji učestvuju u elektrodnom procesu. Na osnovu jednačine (11) može se izračunati m (broj protona) iz vrednosti nagiba zavisnosti $E_{1/2}$ od pH , koja iznosi:

$$nagib = \frac{\Delta E_{1/2}}{\Delta pH} = \frac{0,059}{\alpha n_{\alpha}} m \quad (12)$$

Opšte prihvaćeno pravilo na osnovu proučavanja uticaja pH na elektrohemijsko ponašanje analita bilo bi: ukoliko prenosu elektrona prethodi kiselinso-bazna ravnoteža, redukcija konjugovane kiseline (protonovane forme) odvija se lakše, što znači na manje negativnim vrednostima potencijala, dok se redukcija odgovarajuće konjugovane baze odvija teže i to na negativnijim vrednostima potencijala. U slučaju

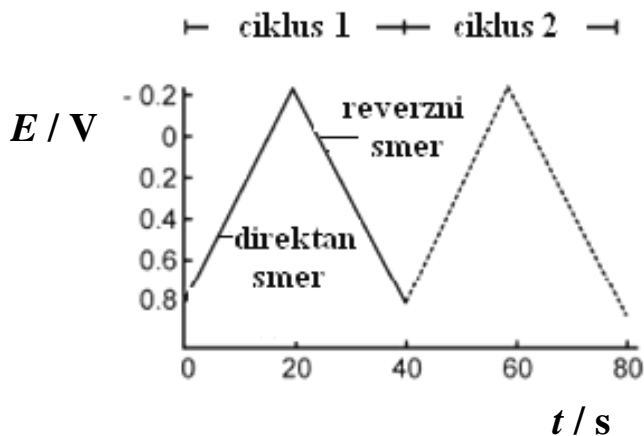
oksidacije, konjugovana kiselina (protonovana forma) se oksiduje teže, a konjugovana baza lakše.⁷³

Kada je granična difuziona struja polarografskih talasa konstantna, a vrednosti polutalasnog potencijala linerano rastu sa porastom pH vrednosti rastvora, postoji mogućnost postojanja više pravaca sa tačkama preseka koje odgovaraju pKa vrednosti odgovarajućeg oblika elektroaktivne vrste prisutne u rastvoru.

1.4.4. Ciklična voltametrija

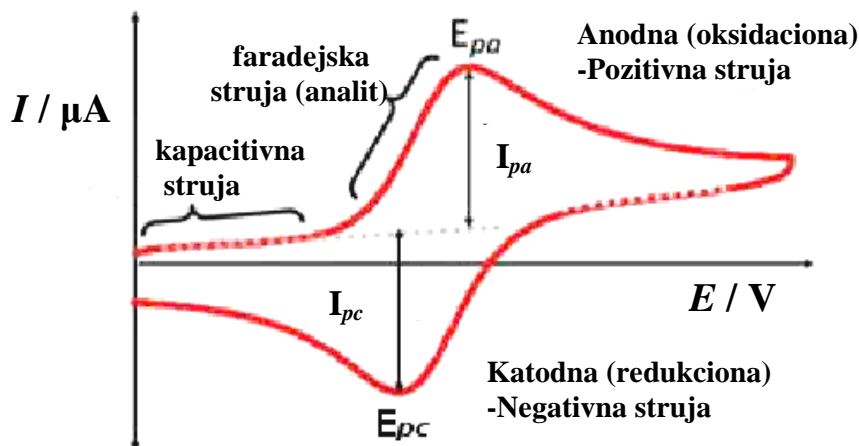
(Cyclic Voltammetry, CV)

Ciklična voltametrija (*Cyclic Voltammetry*, CV) zasnovana je na cikličnoj promeni potencijala najpre sa linearnim rastom do određene maksimalne vrednosti, a zatim linearnim opadanjem do početne vrednosti (**Slika 8.**). Prilikom primene CV bitan je radni prozor potencijala, pri čemu se za početni potencijal bira vrednost pri kojoj nema prolaska struje kroz radnu elektrodu i da je dovoljno udaljen od potencijala na kom se javlja pik ispitivanog analita.



Slika 8. Primer potencijal-ekscitacionog signala u cikličnoj voltametriji (CV).⁷⁴

Tipičan voltamogram predstavlja strujni odgovor u obliku pika (**Slika 9.**). Osnovni parametri pika su: struja pika (I_p) i potencijal pika (E_p).



Slika 9. Tipičan ciklovoltamogram (strujni odgovor) za reverzibilan proces.⁷⁵

Ciklična voltometrija je tehnika sa ograničenom mogućnošću primene u kvantitativnoj analizi, jer je tačnost merenja intenziteta struje mala s obzirom na nepouzdanost u korekciji kapacitivne struje. Veliki značaj CV jeste u dobijanju kvalitativnih informacija o elektrohemijskim reakcijama: utvrđivanje formalnog potencijala, prirode i stepena reverzibilnosti procesa, broja razmenjenih elektrona/protona potrebnih za postavljanje redoks mehanizma, pojavu adsorpcije na površini elektrode te izračunavanje njene zaposednutosti (na osnovu količine naelektrisanja dobijenog iz površine pika).

Intenzitet struje pika **reverzibilnog** procesa definisan je (polazeći od izraza

$$I_p = 0,446 n^{\frac{3}{2}} F A C \left(\frac{FDV}{RT} \right)^{1/2} \text{) Randles-Ševčikovom jednačinom (13) } (T = 298 \text{ K}):^{72,76}$$

$$I_p = 2,69 \cdot 10^5 n^{\frac{3}{2}} A C D^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}} \quad (13)$$

I_p – intenzitet struje pika (A),

n – broj razmenjenih elektrona,

A - površina elektrode (cm²),

C – koncentracija početnog oblika analita u rastvoru koji podleže oksidaciji/redukciji (mol cm⁻³),

D – difuzioni koeficijent ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$),
 v – brzina promene potencijala (V s^{-1}).

Za **reverzibilni** proces (**Slika 9.**), odnos intenziteta struje katodnog pika (I_{pc}) i intenziteta struje anodnog pika (I_{pa}) jednak je jedinici:

$$I_{pc}/I_{pa} \approx 1 \quad (14)$$

Iz izraza (**13**) uočava se jedan od kriterijuma koji je svojstven reverzibilnom elektrodnom procesu – struja pika (I_p) direktno je proporcionalna kvadratnom korenu brzine polarizacije ($v^{1/2}$). Potencijal pika ne pokazuje zavisnost od promene brzine polarizacije.

Za **reverzibilni** proces može se dobiti i broj razmenjenih elektrona tokom elektrodne reakcije iz izraza (**15**):

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = 0,059/n \quad (15)$$

pri čemu su: E_{pa} – potencijal anodnog pika i E_{pc} – potencijal katodnog pika. Takođe, potencijal pika (E_p) i potencijal na poluvisini pika ($E_{p1/2}$) stoje u određenoj relaciji prikazanoj izrazom (za $T = 298 \text{ K}$) (**16**):

$$\left| E_p - E_{p1/2} \right| = 2,218 \frac{RT}{nF} = \frac{57 \text{ mV}}{n} \quad (16)$$

Kod **ireverzibilnog** procesa nema reverznog pika, a intenzitet struje pika u direktnom smeru (polazeći od izraza $I_p = 0,496 n (\alpha n_a)^{\frac{1}{2}} F A C \left(\frac{FDv}{RT} \right)^{\frac{1}{2}}$, gde n predstavlja broj elektrona koji učestvuje u ukupnom procesu, α je koeficijent prenosa, a n_a jeste broj elektrona koji se troši u najsporijem stupnju) dat je Randles-Ševčikovom jednačinom (za $T = 298 \text{ K}$):^{72,76}

$$I_p = 2,99 \cdot 10^5 n (\alpha n_a)^{\frac{1}{2}} A C D^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}} \quad (17)$$

Oдавде sledi da je i kod ireverzibilnih procesa I_p srazmerno $v^{\frac{1}{2}}$, ali sa drugačijom konstantom proporcionalnosti.

Sa desetstrukim porastom brzine promene potencijala, potencijal pika pomera se za $\Delta E_p = 30 \text{ mV}/\alpha n_\alpha$.

Broj razmenjenih elektrona (n_α) u *ireverzibilnoj* i *kvazireverzibilnoj* elektrodnoj reakciji može se dobiti iz vrednosti razlike potencijala (E_p) i potencijala na poluvisini pika ($E_{p/2}$),⁷⁷ primenom sledeće jednačine:

$$\left| E_p - E_{p/2} \right| = 1,857 \frac{RT}{\alpha n_\alpha F} = \frac{47,7 \text{ mV}}{\alpha n_\alpha} \quad (18)$$

Sve prethodno date relacije odnose se na temperaturu od 25 °C odnosno 298 K.

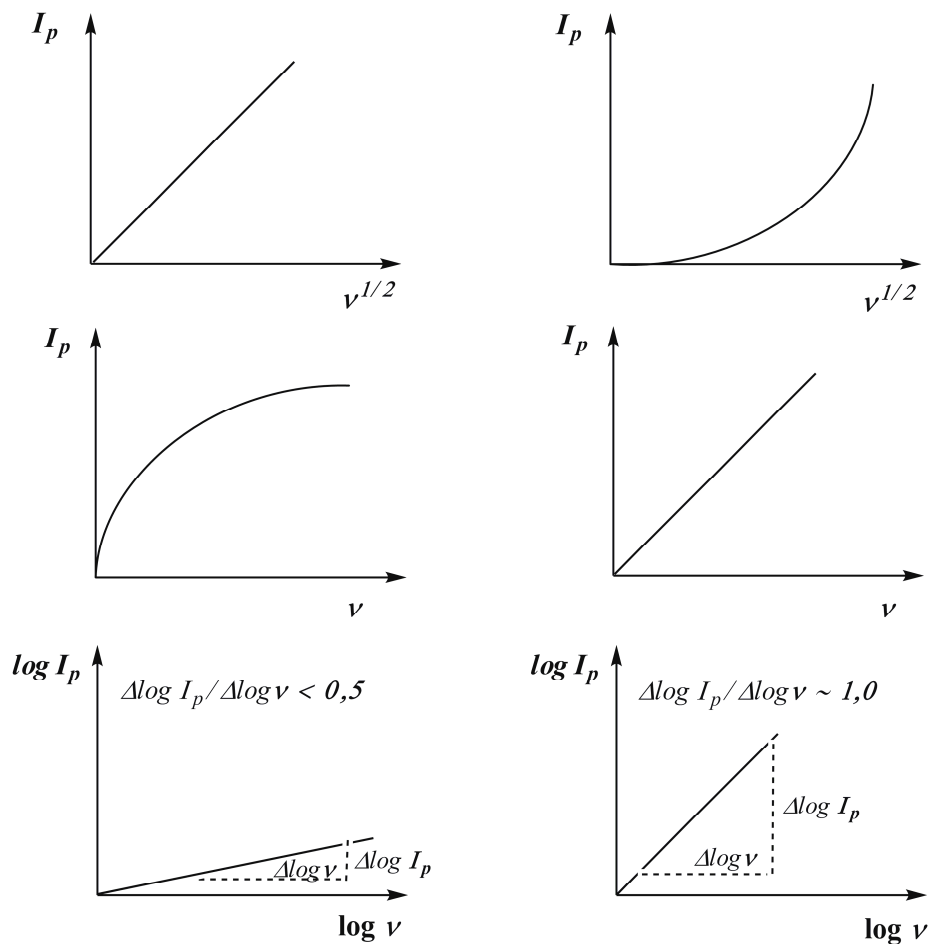
Priroda elektrodnog procesa može se odrediti na osnovu sledećih zavisnosti intenziteta struje pika (I_p) i brzine promene potencijala (v): $I_p = f(v^{1/2})$, $I_p = f(v)$ i $\log I_p = f(\log v)$ (**Slika 10.**). Kod difuzijom kontrolisanog procesa prisutne su sledeće zakonitosti: linearna zavisnost intenziteta struje pika od kvadratnog korena brzine promene potencijala, kao i linerana zavisnost logaritma intenziteta struje pika od logaritma brzine promene potencijala (sa nagibom manjim od 0,5). U slučaju prisutne adsorpcije, linearne zavisnosti jesu: intenzitet struje pika od brzine promene potencijala i logaritam intenziteta struje pika od logaritma brzine promene potencijala (nagib > 0,5). Teorijska vrednost nagiba za zavisnost $\log I_p = f(\log v)$, u slučaju potpune dominacije adsorpcije, iznosi $\sim 1,0$.⁷⁸

U slučaju da je utvrđena adsorpcija, moguće je iz odgovarajućeg izraza (**19**) za intenzitet struje CV pika (I_p) adsorbovane elektroaktivne vrste (tj. njenog oksidovanog/redukovanog oblika) izračunati površinsku zaposednutost elektrode ($\Gamma/\text{mol cm}^{-2}$):

$$I_p = \frac{n^2 F^2}{4RT} v A \Gamma \quad (19)$$

Difuzija

Adsorpcija



Slika 10. Zavisnosti intenziteta struje pika (I_p) i brzine promene potencijala (v): $I_p = f(v^{1/2})$, $I_p = f(v)$ i $\log I_p = f(\log v)$ u slučaju difuzijom odnosno adsorpcijom kontrolisanog procesa.

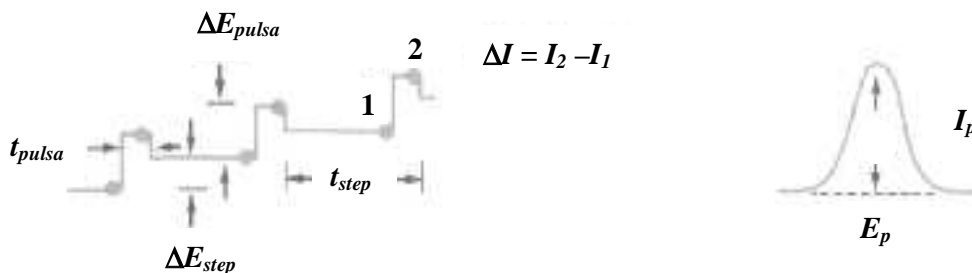
u kome n predstavlja broj razmenjenih elektrona, F je Faradejeva konstanta ($96\,485,3\text{ C mol}^{-1}$), dok je R molarna gasna konstanta ($8,31447\text{ J K}^{-1}\text{ mol}^{-1}$), T predstavlja temperaturu (K), v je brzina promene potencijala (V s^{-1}) i A je površina elektrode (cm^2).⁷⁶

Ustanovljeni kriterijumi za prirodu procesa predstavljaju osnovu za postavljanje odgovarajuće voltametrijske metode za kvantitativnu analizu.

1.4.5. Diferencijalno pulsna voltametrija (Differential Pulse Voltammetry, DPV)

Diferencijalno pulsna voltametrija jeste pulsna tehnika kojom se može postići detekcija i određivanje niskih koncentracija analita.

Promena vrednosti potencijala tokom vremena, koja se saopštava elektrohemijskoj ćeliji, predstavlja ekscitacioni signal u voltametriji. Iz varijabilnosti potencijala proističe karakteristični strujni odgovor, kriva $I - E$. Intenzitet struje meri se u određenim tačkama pred sam početak (tačka 1) i pred sam kraj (tačka 2) trajanja pulsa (Slika 11.), te se odavde dobija odgovarajući DP voltamogram koji predstavlja zavisnost $\Delta I (= I_2 - I_1) = f(E)$.



Slika 11. Potencijal-ekscitacioni signal, odgovarajući DP voltamogram i tipični parametri: ΔE_{pulsa} – amplituda pulsa (mV); ΔE_{step} – stepen povećanja potencijala (mV); t_{pulsa} – širina pulsa (tj. vreme trajanja pulsa odnosno stepena povećanja potencijala) (ms); t_{step} - trajanje celog perioda (odnosno trajanje saopštenog pulsa do narednog) (ms), potencijal pika (E_p / V), struja pika (I_p / A). Struja se meri u tačkama 1 i 2, a kako se metoda zasniva na merenju promene intenziteta struje (ΔI), to se od struje izmerene u tački 2 (I_2) oduzima struja izmerena u tački 1 (I_1).⁷⁹

Visina, odnosno intenzitet struje pika (I_p) direktno je proporcionalan koncentraciji analizirane elektroaktivne vrste (C), što je prikazano jednačinom:

$$I_p = \frac{nFAD^{1/2}C}{\sqrt{\pi \cdot t_{pulsa}}} \left(\frac{1-\sigma}{1+\sigma} \right) \quad (20)$$

gde je $\sigma = \exp\left(\frac{nF\Delta E_{pulsa}}{2RT}\right)$. Veća amplituda pulsa (ΔE_{pulsa}) poželjna je u izvesnoj meri, nakon čega dalji porast rezultuje lošijom rezolucijom.^{60,72}

Potencijal pika (E_p) karakteriše (identifikuje) analit i stoji u određenoj vezi sa polutalasnim potencijalom $E_{1/2}$ (dobijenim iz DC polarograma):

$$E_p = E_{1/2} - \Delta E_{pulsa}/2 \quad (21)$$

pri čemu ΔE_{pulsa} predstavlja amplitudu pulsa. Prema tome, što je manja vrednost ΔE_{pulsa} , potencijal DPV pika je bliži vrednosti polutalasnog potencijala, $E_{1/2}$.

Parametri od važnosti u DPV metodi jesu: amplituda pulsa (ΔE_{pulsa} / mV); stepen povećanja potencijala (ΔE_{step} / mV); širina pulsa (tj. vreme trajanja pulsa odnosno stepena povećanja potencijala) (t_{pulsa} / ms); trajanje celog perioda (odnosno trajanje saopštenog pulsa do narednog) (t_{step} / ms).

DPV tehnika odlikuje se dobrom selektivnošću, odnosno rezolucijom (razdvojenošću) pikova bliskih potencijala (dovoljna je razdvojenost pikova od 50 mV za detekciju), što omogućava njenu primenu u analizi smeše elektroaktivnih analita. Svojstva ove tehnike minimizuju vrednost rezidualne struje, otuda proističe i mogućnost postizanja veoma niske osetljivosti (10^{-8} M) tokom određivanja analita.^{56,59,60,76}

DPV tehnika može imati ulogu i u dobijanju informacija o redoks mehanizmu, s obzirom da je poluširina pika ($W_{1/2}$) (**Slika 12.**) definisana sledećim izrazom (**22**):

$$W_{1/2} = 3,52 \frac{RT}{nF} \quad (22)$$

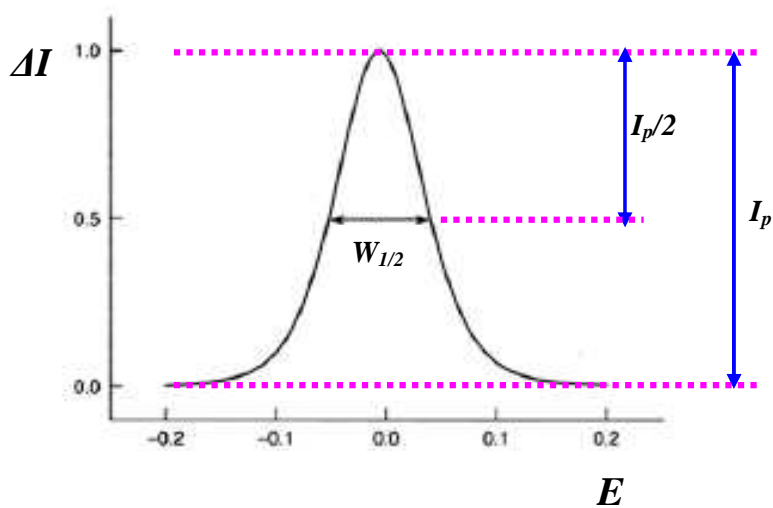
R – molarna gasna konstanta ($8,31447 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$),

T – temperatura (K),

n – broj razmenjenih elektrona,

F – Faradejeva konstanta ($96\,485,3 \text{ C mol}^{-1}$).

Tako u slučaju razmene 1 elektrona tokom reverzibilne elektrodne reakcije ($n = 1$), poluširina pika je $W_{1/2} \sim 90 \text{ mV}$; dok prilikom razmene 2 elektrona ($n = 2$), poluširina pika iznosi $W_{1/2} \sim 45 \text{ mV}$.^{56,60}



Slika 12. DP voltamogram i poluširina pika ($W_{1/2}$).

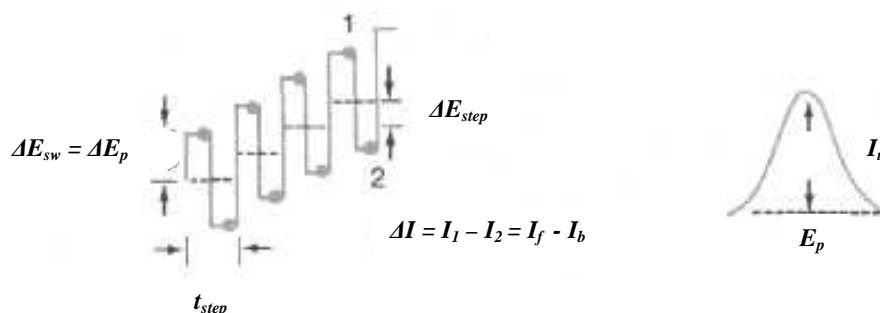
U slučaju ireverzibilnih redoks procesa, E_p se udaljava od $E_{1/2}$, a pik je niži i širi (manja osetljivost i rezolucija) u odnosu na reverzibilne sisteme.^{59,60}

1.4.6. Voltometrija pravougaonih talasa

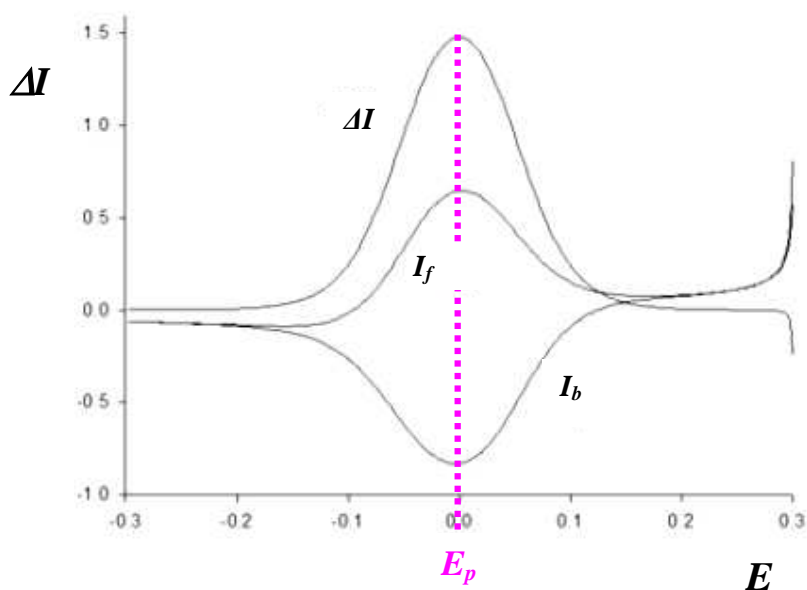
(Square Wave Voltammetry, SWV)

Pored DPV, voltometrija pravougaonih talasa (SWV) predstavlja još jednu izuzetno važnu pulsnu voltometrijsku tehniku, i to sa izuzetno brzom promenom potencijala i relativno velikom amplitudom pulsa. Promena vrednosti potencijala tokom

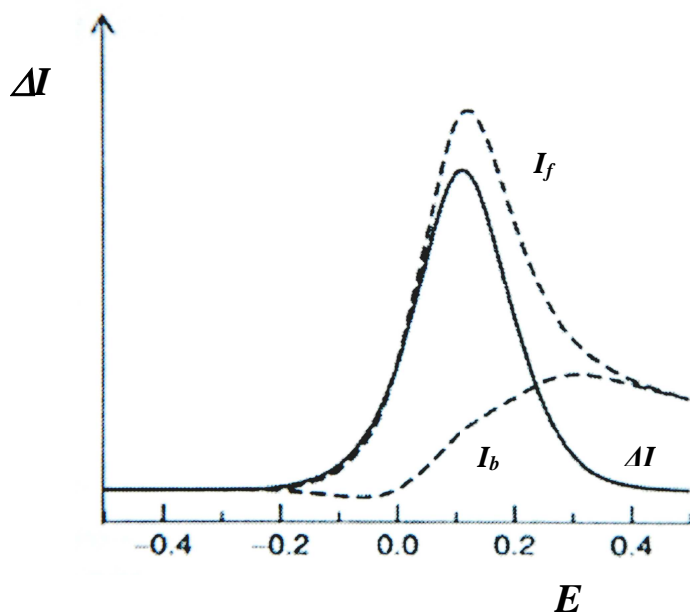
vremena predstavlja ekscitacioni signal koji rezultuje odgovarajućim strujnim odgovorom. Kod SWV trajanje potencijalnog stepena jednako je dužini trajanja pulsa pravougaonog talasa ($t_{step} = 5 - 10$ ms). Ovo je takođe diferencijalna tehnika, jer se struja meri 2 puta tokom svakog ciklusa: na kraju direktnog (*forward*) pulsa i na kraju povratnog (*reverse, backward*) pulsa. Potencijal-ekscitacioni signal prikazan je na **Slici 13.**, kao i odgovarajući SW voltamogram koji predstavlja zavisnost $\Delta I (= I_f - I_b) = f(E)$. Visoka osetljivost SWV metode (10^{-8} M) proističe otuda što je ukupna ΔI veća od izmerenih pojedinačnih struja (I_f i I_b koje su različitih smerova i predznaka odnosno jedna predstavlja anodnu struju, a druga katodnu), što praktično znači da je ΔI zapravo I_{total} koja po svojoj vrednosti odgovara zbiru apsolutnih vrednosti I_f i I_b). Položaj, odnosno potencijal pika (E_p) odgovara polutalasnom potencijalu ($E_{1/2}$), a visina pika (ΔI odnosno I_{total}) proporcionalna je koncentraciji analita (**Slika 14, 15.**).



Slika 13. Potencijal-ekscitacioni signal, odgovarajući SW voltamogram i tipični parametri: $\Delta E_{sw} (= \Delta E_p)$ – amplituda pulsa (mV); ΔE_{step} – stepen povećanja potencijala (mV); t_{step} – trajanje celog perioda (odnosno trajanje saopštenog pulsa do narednog) (ms); E_p – potencijal pika (V), I_p – struja pika (A). Struja se meri u tačkama 1 i 2, a kako je metoda zasnovana na merenju promene intenziteta struje (ΔI), to se od struje izmerene u tački 1 (I_1 odnosno I_f) oduzima struja izmerena u tački 2 (I_2 odnosno I_b).⁷⁹



Slika 14. SW voltamogram i prikaz merenih struja tokom direktnog (*forward*; I_f) i povratnog (*reverse, backward*; I_b) pulsa i njihova razlika ($\Delta I = I_f - I_b$) u funkciji primenjenog potencijala u slučaju *reverzibilnog* elektrodnog procesa.



Slika 15. SW voltamogram i prikaz merenih struja u funkciji primenjenog potencijala tokom: direktnog (*forward*; I_f) i povratnog (*reverse, backward*; I_b) pulsa i njihova razlika ($\Delta I = I_{total} = I_f - I_b$) u slučaju *ireverzibilnog* elektrodnog procesa.⁶⁰

Svojstvo ove tehnike da dobijeni pik predstavlja istovremeno rezultat redukcije i oksidacije, a informacije se dobijaju iz jednog eksperimenta, predstavlja izuzetnu prednost nad ostalim voltometrijskim tehnikama i primenljiva je za utvrđivanje stepena reverzibilnosti redukcionog/oksidacionog procesa. Raščlanjivanjem SWV pika, intenziteta struje I_{total} , dobijaju se dve sastavne komponente (direktna - *forward* i povratna - *backward*) sa odgovarajućim intenzitetima struje, I_f i I_b . U slučaju **reverzibilnog** elektrodnog procesa dobija se $I_f \sim I_b$ i $E_{p,f} \sim E_{p,b}$; dok kod **ireverzibilnog** procesa ne postoji pik u *backward* komponenti ili je on slabo izražen kao na **Slici 15.**, te je $I_f \sim I_{total}$. Za određeni proces kod koga nije zabeležen odgovarajući CV pik u reverznom smeru, primenom SWV može biti ustanovljena kvazireverzibilnost procesa. Ovo se najčešće dešava kod transfera jednog elektrona tokom elektrodnog procesa, samim tim i manjim intenzitetom CV struje, odnosno objašnjava se većom osetljivošću i sofisticiranijim mogućnostima SWV u poređenju sa CV.

Osnovne prednosti SWV metode jesu: brzina izvođenja analize (nekoliko sekundi potrebno za dobijanje SW voltamograma, dok je za DP voltamogram potrebno do 3 minuta), koja doprinosi i manjem onečišćenju radne površine elektrode kao i manjem utrošku samog analita.^{77,80} Pored toga, odsustvo nefaradejske (kapacitivne) struje povećava odnos signal : šum, te otuda proizilazi i visoka osetljivost. Zbog svoje brzine izvođenja i visoke osetljivosti, SWV predstavlja tehniku pogodnu za kombinovanje sa drugim instrumentalnim metodama (LC, CE) u cilju elektrohemijske detekcije i kvantifikacije analita.^{59,60,76,77,79,81}

Parametri od važnosti za SWV jesu: amplituda pulsa (ΔE_{sw} (mV)), stepen povećanja potencijala (ΔE_{step} (mV)), širina pulsa (tj. vreme trajanja pulsa odnosno stepena povećanja potencijala) (t_p (ms)), trajanje celog perioda (odnosno trajanje saopštenog pulsa do narednog) (t_{step} (ms)) koji se češće izražava putem frekvencije ($f = 1/t_{step} = 1/2t_p$ (Hz)) odakle se obično izražava i efektivna brzina promene potencijala ($v_{eff} = f \cdot \Delta E_{step}$ npr. ako je $\Delta E_{step} = 10$ mV i $f = 200$ Hz, onda je $v_{eff} = 2$ V s⁻¹).^{56,63,76,79}

Prednost pulsni tehnika DPV i SWV jeste izuzetno niska vrednost kapacitivne struje, a dodatnim podešavanjem amplitude pulsa (samim tim i širine pika) postiže se bolji odnos signal : šum tj. bolja osetljivost i selektivnost. Međutim, smanjenje

osetljivosti, koje se javlja kao posledica ireverzibilnosti procesa, manje je kod DPV u odnosu na SWV.

1.4.7. Adsorptivne voltametrijske tehnike:

Diferencijalno pulsna voltametrija sa adsorpcionim obogaćivanjem i rastvaranjem

(Adsorptive Stripping Differential Pulse Voltammetry, AdSDPV);

Voltametrija pravougaonih talasa sa adsorpcionim obogaćivanjem i rastvaranjem

(Adsorptive Stripping Square Wave Voltammetry, AdSSWV)

Kod adsorptivnih tehnika analit se najpre akumulira/adsorbuje na površini radne elektrode, a u narednom koraku sledi njegovo voltametrijsko određivanje redukcijom ili oksidacijom. Veoma su pogodne za analizu organskih jedinjenja, kao i jona metala u tragovima (koji se adsorbuju u formi kompleksa ili se prvo adsorbuje kompleksirajući reagens, a zatim sledi kompleksiranje na samoj površini elektrode). Važni parametri kod ovih tehnika jesu: vreme akumulacije (t_{acc}/s) i potencijal akumulacije (E_{acc}/V). Intenzitet struje pika raste sa porastom vremena akumulacije do postizanja određenog maksimuma, odnosno dok površina elektrode ne postane zasićena analitom. Nivo granice detekcije koji se može postići ovim tehnikama iznosi 10^{-10} M. Strujni signal kod adsorptivnih tehnika ne zavisi od brzine difuzije analita, već samo od brzine promene kojoj podleže adsorbovana vrsta na površini elektrode. Sa porastom brzine polarizacije raste i intenzitet struje pika, ali samo kod reverzibilnih procesa, te je kod njih pogodnije primeniti AdSSWV (upravo zbog mogućnosti veoma brzih promena potencijala). Kod ireverzibilnih procesa, prednost se daje AdSDPV.

1.5. Validacija analitičke metode

Validacija metode za kvantitativnu analizu predstavlja postupak tokom kojeg se, na osnovu eksperimentalno dobijenih rezultata, izračunavaju/dobijaju karakteristični parametri putem kojih se proverava primenljivost/pouzdanost predložene metode. Time se potvrđuje da je primenjena analitička metoda odgovarajuća za namenjenu upotrebu.

Prilikom pristupa validaciji, vrši se procena šta je od validacionih parametara potrebno odrediti, odnosno svaka metoda zahteva poseban pristup u skladu sa svojom namenom (npr. određivanje analita dominantno zastupljenog u uzorku ili određivanje analita zastupljenog u tragovima u kompleksnom matriksu). Prema tome, svaka metoda zahteva individualni pristup validaciji radi utvrđivanja njene primenljivosti, a dobijene vrednosti parametara potrebno je da zadovoljavaju definisane vrednosti/zahteve.⁸²⁻⁸⁵

Prethodno već validiranu analitičku metodu potrebno je revalidirati u sledećim slučajevima: pre uvođenja analitičke procedure u rutinsku upotrebu, u slučaju promene uslova pod kojima je metoda validirana (promena opreme, uzoraka, matriksa), kada dođe do promene bilo kog parametra metode (pH, koncentracija) koji značajno utiču na metodu, pri izvođenju merenja od strane različitih osoba, u slučaju transfera metode u drugu laboratoriju.⁵⁴ Treba uzeti u obzir da ukoliko dođe do promena tokom razvoja metode, potrebno je ažurirati instrukcije za analitičku proceduru i podacima o validaciji obezbediti korisne informacije o metodi.

Najčešće određivani validacioni parametri propisani su ICH smernicama i to su: specifičnost/selektivnost, linearnost i opseg koncentracija, tačnost, preciznost, granica (limit) detekcije (*limit of detection, LOD*), granica (limit) određivanja (*limit of quantification, LOQ*) i robusnost. Dodatni (preporučeni) parametar jeste stabilnost.

Specifičnost odnosno **selektivnost** predstavlja mogućnost metode da detektuje/odredi analit u prisustvu drugih komponenti koje se očekuju u analiziranom uzorku (npr. ekscipijensi). Specifična/selektivna metoda ima sposobnost razlikovanja analita i od drugih (potencijalno) prisutnih interferencija: komponenti matriksa, nečistoća, degradacionih proizvoda. Selektivnost metode potvrđena je kada se odgovor analita razlikuje od svih ostalih odgovora u uzorku, odnosno kada je izolovani analit oslobođen interferencija.^{54,60,82,86}

Linearnost odražava mogućnost metode da u određenom opsegu koncentracija analita daje direktno proporcionalnu/linearnu zavisnost analitičkog signala od koncentracije analiziranog analita. Kalibracija predstavlja postupak utvrđivanja linearnosti (potrebno najmanje 5 merenja). Linearnost se procenjuje vizuelno, posmatranjem grafičkog prikaza zavisnosti analitičkog signala od koncentracije analiziranog jedinjenja. Neophodno je da linearnost bude ponovljiva, dok se opsezi mogu razlikovati u prisustvu različitih matriksa. Metodom standardnog dodatka testira se metoda na efekte matriksa (neaktivnih sastojaka u doziranim oblicima ili endogenih supstanci iz bioloških tečnosti), pri čemu je neophodno da se izvodi u datom opsegu kalibracije. **Opseg linearnosti** predstavlja interval koncentracija između donje i gornje vrednosti koncentracije analita u uzorku u kome analitička procedura ima zadovoljavajuću tačnost, preciznost i linearnost. Linearnost se predstavlja jednačinom linearne regresije: $Y = bX + a$, pri čemu je Y izmereni analitički signal, X je vrednost koncentracije analita, a predstavlja odsečak (na Y -osi kada je $X = 0$), dok je b nagib pravca. Osetljivost metode definisana je vrednošću nagiba pravca ($b = \Delta Y / \Delta X$).^{54,60,82}

Tačnost predstavlja odraz usaglašenosti između prave (nominalne, usvojene tačne vrednosti) količine analita i vrednosti dobijene primenom predložene analitičke metode. Najčešće se izražava putem *recovery* (%) vrednosti (procentnog prinosa) dobijene primenom izraza:

$$recovery (\%) = (C_X / C_{ST}) \times 100 \quad (23)$$

gde C_X predstavlja dobijeni/izmereni sadržaj, a C_{ST} predstavlja tačni/nominalni sadržaj analita.^{54,60,82}

Preciznost predstavlja stepen slaganja između pojedinačnih rezultata određivanja primenom uzastopnog višestrukog uzorkovanja homogenog uzorka, a može biti izražena putem: ponovljivosti (pod istim uslovima u toku kratkog vremenskog intervala, *intra-day preciznost*), srednje preciznosti (unutar laboratorijskih varijacija: analitičara, opreme, dana testiranja (*inter-day preciznost*)) i reproduktivnosti (međulaboratorijska preciznost za standardizaciju metode). Preciznost se izražava putem relativne standardne devijacije, *RSD* (%) koja se izračunava primenom izraza:

$$RSD (\%) = (SD / \overline{C_X}) \times 100 \quad (24)$$

pri čemu je SD - standardna devijacija i \overline{C}_x - srednja vrednost dobijenog/izmerenog sadržaja.^{54,60,82}

Granica (limit) detekcije (Limit of Detection, LOD) predstavlja najmanju količinu analita koja može biti detektovana predloženom analitičkom metodom, ali ne i određena sa pouzdanošću i prihvatljivom tačnošću. Najčešće se izražava količinskom koncentracijom (C/M) ili masenom koncentracijom ($\gamma/\mu\text{g ml}^{-1}$) analita. LOD predstavlja važan validacioni parametar kod određivanja leka u tragovima u biološkim uzorcima, nečistoća i degradacionih proizvoda u doziranim oblicima. Često je pogrešno poistovećivanje LOD sa osetljivošću metode. Za LOD važi odnos signal : šum = 3(2) : 1. Najčešće primenjavani izraz za izračunavanje limita detekcije, jeste iz kalibracione krive $LOD = 3SD/b$, odnosno $3SD_a/b$; pri čemu su: SD – standardna devijacija, SD_a – standardna devijacija odsečka, b – vrednost nagiba.^{54,60,82}

Granica (limit) određivanja (Limit of Quantification, LOQ) predstavlja najmanju količinu analita u uzorku koja se može odrediti predloženom metodom uz odgovarajuću/zadovoljavajuću tačnost i preciznost. Kao i LOD , LOQ se izražava količinskom ili masenom koncentracijom (C/M ili $\gamma/\mu\text{g ml}^{-1}$) analita. Za LOQ važi odnos signal : šum = 10 : 1. Granica određivanja izračunava se najčešće iz parametara kalibracione krive i to $LOQ = 10SD/b$, odnosno $10SD_a/b$ (SD – standardna devijacija, b – vrednost nagiba, SD_a – standardna devijacija odsečka).^{54,60,82,86}

Robusnost je validacioni parametar koji odražava kapacitet metode da se odupre malim, namernim promenama parametara metode čime se istovremeno definiše i mera pouzdanosti metode u rutinskoj primeni. Cilj procene robusnosti jeste da se utvrdi i odredi eksperimentalna slabost metode, kako bi se kritičan faktor kontrolisao i time obezbedili uslovi za očuvanje definisanog opsega.^{60,82}

Stabilnost analita-leka u njegovom doziranom obliku, biološkom uzorku zavisi od: uslova čuvanja, hemijskih svojstava leka, matriksa, ambalaže. Analit se karakteriše kao stabilan ukoliko se dobijeni odgovor, nakon izvesnog vremena čuvanja uzorka, ne razlikuje značajno od signala dobijenog u sveže pripremljenom uzorku. Procedure za utvrđivanje stabilnosti analita trebalo bi da obuhvataju procenu uticaja postupka prikupljanja i rukovanja uzorcima, dugoročnog i kratkoročnog skladištenja, kao i višestrukog ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja. **Dugoročna stabilnost (Long term stability)** podrazumeva zamrzavanje uzorka sa analitom tokom 2 meseca, i nakon toga

poređenje dobijenih rezultata sa onima iz svežeg uzorka pre zamrzavanja. **Kratkoročna stabilnost** (*Short term stability*) proverava se odmrzavanjem uzorka i držanjem na sobnoj temperaturi u toku najmanje 4 sata (do najviše 24 sata). Stabilnost nakon **zamrzavanja i odmrzavanja** (*Freeze and thaw stability*) ispituje se u 3 uzastopna cikusa tokom tri dana. Stabilnost se izražava putem *RSD (%)* vrednosti i preporučeno je da bude u granicama $\pm 20\%$,⁶⁰ odnosno $\pm 15\%$.⁸⁷ Stabilnost se može izraziti i putem odstupanja u odnosu na nominalnu vrednost, koje se izračunava prema formuli:

$$\text{Odstupanje (\%)} = \frac{C_x - C_0}{C_0} \times 100 \quad (25)$$

u kojoj je C_x – izmerena koncentracija, C_0 – početna koncentracija analita.

1.6. Ispitivanje interakcije DNK – lek

Mnoge organske i neorganske supstance, a među njima i neki lekovi, ostvaruju određenu vrstu interakcije sa DNK (dezoksiribonukleinskom kiselinom). Svaki lanac DNK predstavlja polimer nukleotida koji se sastoji iz: šećera (dezoksiriboze), fosfatnog ostatka i za šećer vezane odgovarajuće purinske (adenin (A) i guanin (G)) ili pirimidinske (timin (T) i citozin (C)) baze. Kondenzacija nukleotida u polimerni lanac odvija se eliminisanjem dve fosfatne grupe pod katalizom enzima DNK-polimeraze. Komplementarnost dva lanca održava se uspostavljanjem vodoničnih veza između odgovarajućih baza (A-T i G-C). Prema tome, DNK u ćeliji ima formu dvostruko lančane spirale, a informacija zapisana putem redosleda vezivanja pomenute četiri baze predstavlja osnovu kodiranja (prenosa) genetičkog materijala. Praktično, kodon je triplet nukleotida i označava odgovarajuću aminokiselinu u sintezi proteina.^{15,88} Otuda DNK ima neizostavnu ulogu u funkcionisanju ćelije, a samim tim i tokom razvoja, rasta i funkcionisanja celokupnog organizma.

S obzirom da je DNK neizbežna komponenta u strukturi i funkcionisanju ljudi odnosno sisara, postala je važno mesto ispitivanja i delovanja lekova kod određenih oboljenja: tumora, bakterijskih i virusnih infekcija. Direkne interakcije lekova i DNK mogu biti: **kovalentne (ireverzibilne)** i **nekovalentne (reverzibilne)**. Formiranje kovalentnih veza između DNK-baza i lekova dovodi do potpune disfunkcije DNK i

posledično do odumiranja ćelije. Lekovi sa ovakvim dejstvom primenjuju se kod malignih tumora. **Ireverzibilno** vezujući agensi jesu:

a) pozitivno naelektrisani kompleksi metala kojima elektronima bogata mesta u DNK (najčešće guaninu) predstavljaju ligande,

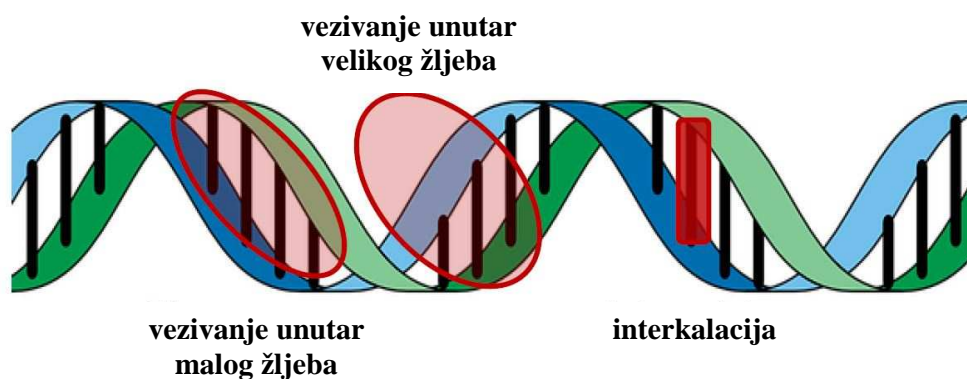
b) aktivirane forme nekih antitumorskih antibiotika koje dovode do inter- i intralančanih ukrštenih veza;

c) alkilujući agensi, najčešće primenjivani, koji dovode do adicije određenih alkil-grupa na molekul DNK.

Reverzibilno (nekovalentno) vezivanje leka (**Slika 16.**) podrazumeva :

- a) interkalaciju – umetanje između dva para baza;
- b) vezivanje unutar malog žljeba (*minor groove*);
- c) vezivanje unutar velikog žljeba (*major groove*);
- d) vezivanje na spoljašnjoj strani heliksa.

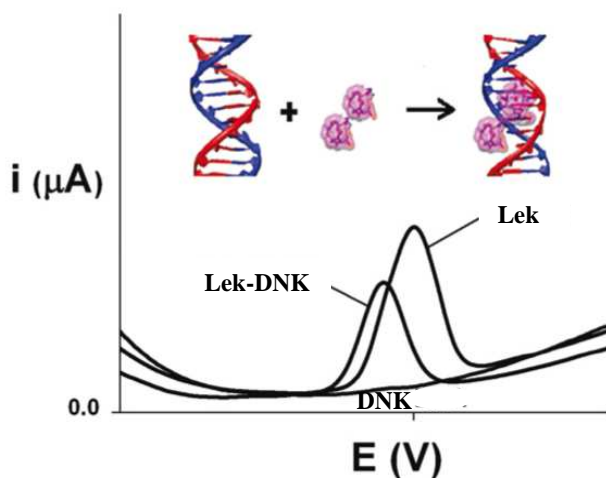
Reverzibilne interakcije DNK-lek mogu rezultovati: konformacionim promenama u strukturi DNK ili ometanjem fiziološke interakcije DNK-protein, što konačno može rezultovati cepanjem DNK-lanca. Stabilnost nastalog kompleksa DNK-lek zavisi od jačine uspostavljenih interakcija (veza): elektrostatičkih, vodoničnih veza, dipol-dipol (Van der Vals). Lekovi sa ovakvim mehanizmom dejstva su poželjniji za primenu u terapiji tumora od ireverzibilno vezujućih agenasa.^{15,89-93}



Slika 16. Shematski prikaz reverzibilnih (nekovalentnih) interakcija jedinjenja i DNK.⁹⁴

Postoje različite analitičke metode za detekciju i kvantifikaciju interakcije DNK-lek, a među njima sve aktuelnija postaje elektrohemijska metoda. Primena elektrohemijske metode moguća je zahvaljujući činjenici da DNK predstavlja elektroaktivnu vrstu usled redoks svojstava purinskih/pirimidinskih baza. Guanin (G) podleže oksidaciji ($E_{p,G} \sim -0,25$ V pri neutralnoj pH) nakon prethodne redukcije veze N(7)—C(8) što je zabeleženo na DME/HMDE.^{95,96} Adenin i citozin (A/C) podležu redukciji i ovo je potvrđeno na radnoj Hg-elektrodi ($E_{p,A/C} \sim -1,45$ V pri pH $\sim 7,0$).⁹⁶⁻⁹⁸ Timin (T) se redukuje samo u nevodenim rastvaračima i na izuzetno negativnom potencijalu.⁹⁹

DNK-modifikovana elektroda nastaje hemijskom modifikacijom površine radne elektrode molekulima nukleinske kiseline. U zavisnosti od prirode materijala od kojeg je izrađena elektroda, imobilizacija DNK na površini elektrode može se postići: elektrohemijskom adsorpcijom, fizičkom adsorpcijom, kovalentnim vezivanjem, elektropolimerizacijom određenih monomera (npr. pirola u polipirol) koji obuhvata DNK-molekule i zajedno prionu na površinu elektrode. Svaka redoks promena na površini DNK-modifikovane elektrode beleži se u vidu električnog signala (intenziteta struje ili potencijala). Najčešće su primenom DNK-modifikovane elektrode proučavane reverzibilne (nekovalentne) interakcije DNK i elektroaktivnog analita. Na živinoj radnoj elektrodi, prateći uglavnom katodne procese, utvrđeno je da u slučaju hidrofobnih interakcija (interkalacija) dolazi do pomeranja potencijala pika analita (leka) ka pozitivnijim vrednostima, dok elektrostatičke interakcije uzrokuju pomeranje potencijala pika ka negativnijim vrednostima, a u oba slučaja zabeleženo je smanjenje intenziteta struje pika leka u prisustvu DNK (**Slika 17.**).^{92,100,101} Interkalatori su okarakterisani kao planarne aromatične strukture koje se mogu umetnuti između parova DNK-baza.¹⁰²

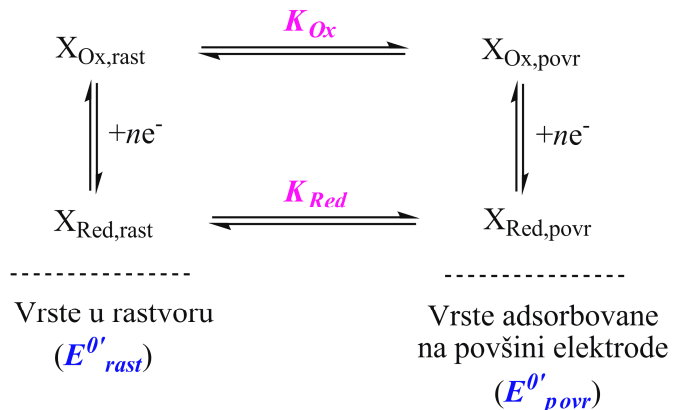


Slika 17. Prikaz reverzibilne interakcije DNK-lek tipa interkalacije detektovane voltametrijskom metodom u katodnoj oblasti potencijala.⁹¹

Detektovana interakcija može se dodatno okarakterisati primenom izraza za promenu formalnog potencijala ($\Delta E^{O'}$):

$$\Delta E^{O'} = E_{povr}^{O'} - E_{rast}^{O'} = \frac{RT}{nF} \ln \frac{K_{Red}}{K_{Ox}} \quad (26)$$

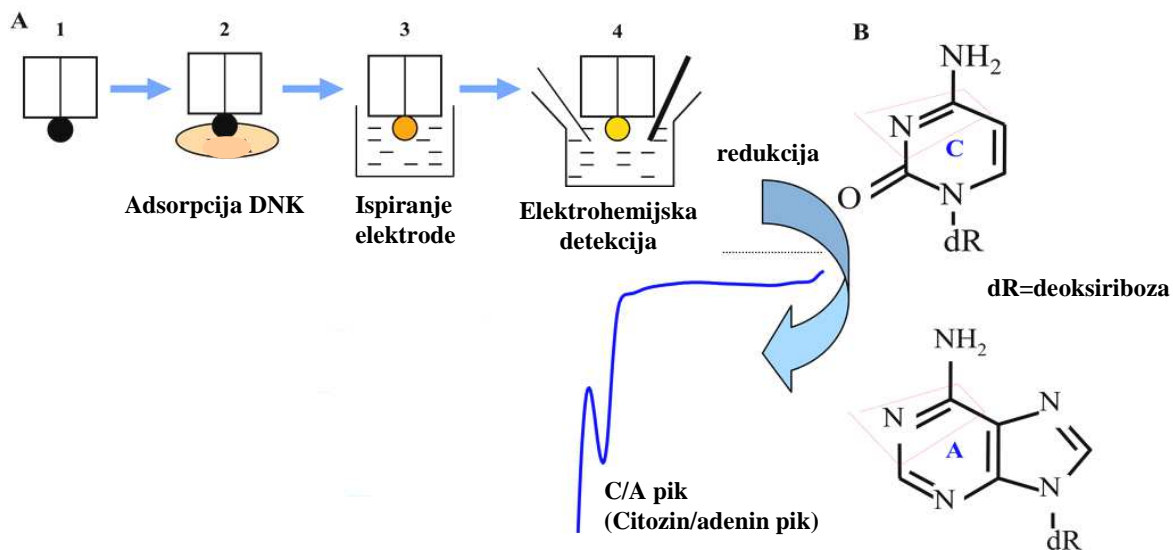
u kome $E_{povr}^{O'}$ i $E_{rast}^{O'}$ predstavljaju formalne potencijale redoks vrste adsorbovane na površini elektrode odnosno prisutne u rastvoru, a K_{Red} i K_{Ox} predstavljaju konstante površinskog vezivanja/adsorbovanja redukovanog odnosno oksidovanog oblika redoks vrste (**Shema 2.**). Odavde se može izračunati vrednost odnosa pomenutih konstanti, K_{Red}/K_{Ox} na osnovu eksperimentalno dobijene promene formalnog potencijala ($\Delta E^{O'}$).^{92,103}



Shema 2. Prikaz ravnoteža, konstanti vezivanja, formalnih potencijala prisutnih redoks vrsta na površini elektrode i u rastvoru.

Generalno, procedura pripreme/primene DNK-modifikovane elektrode obuhvata sledeće korake (**Slika 18.**):¹⁰⁴

- imobilizaciju DNK na površini radne elektrode,
- uranjanje pripremljene elektrode u analizirani rastvor (ili samo osnovni elektrolit),
- merenje intenziteta strujnog odgovora.



Slika 18. (A: 1-3) Imobilizacija DNK na površini radne elektrode, (A: 4) uranjanje pripremljene elektrode u osnovni elektrolit, (B) merenje intenziteta strujnog odgovora.¹⁰⁵

Na ovaj način moguće je detektovati bilo kakvu DNK promenu: strukture, konformacije (orijentacija u prostoru), koncentracije, ili kompleksiranja (usled nekovalentnih interakcija DNK-ligand).

U slučaju VAR iskorišćena je elektrohemijska aktivnost DNK odnosno katodno/anodna aktivnost DNK-baza (adenin i citozin/guanin) za ispitivanje moguće interakcije leka i DNK.¹⁰⁶⁻¹¹¹

1.6.1. Adsorptivna transfer „stripping” tehnika

(Adsorptive Transfer Stripping Technique, AdTS)

Za ispitivanje potencijalne interakcije jedinjenja (leka) i DNK koristi se adsorptivna transfer *stripping* tehnika (*Adsorptive Transfer Stripping Technique, AdTS*) koja se zasniva na svojstvu adsorpcije DNK na površini elektrode HMDE⁹⁷ i to se može postići iz veoma male zapremine rastvora (5 – 10 µl). Na ovaj način formira se DNK-modifikovana elektroda. Voltamogrami formiranog sloja DNK na elektrodi snimaju se *ex situ* pažljivim uranjanjem novoformirane elektrode u uobičajenu elektrohemijsku ćeliju koja sadrži nekoliko mililitara odgovarajućeg osnovnog elektrolita. Prema tome, pod istim uslovima snimaju se zasebni voltamogrami nakon adsorpcije: same DNK, zatim samog leka i na kraju smeše DNK i leka (**Slika 18.**).

2. CILJ RADA

Postavljeni ciljevi ove doktorske disertacije bili su:

- ④ Detaljno proučavanje elektrohemijskog ponašanja vareniklina i brimonidina radi postavljanja njihovih redoks-mehanizama, tj. utvrđivanje:
 - broja razmenjenih elektrona i protona za postavljanje redoks-mehanizama,
 - prirode procesa na površini elektrode (difuzija, adsorpcija);

- ④ Definisane sličnosti i razlika u elektrohemijskom ponašanju vareniklina i brimonidina u skladu sa njihovim hemijskim strukturama molekula;

- ④ Optimizacija uslova za postavljanje novih voltametrijskih metoda korišćenjem različitih elektroda;

- ④ Razvoj i validacija novih elektroanalitičkih metoda za određivanje vareniklina i brimonidina u: laboratorijskim uzorcima, farmaceutskim doziranim oblicima i biološkim uzorcima (određivanje vareniklina u *pool* uzorku plazme; određivanje brimonidina u *pool* uzorku očne vodice, uz opterećenje pomenutih bioloških uzoraka odgovarajućim standardima vareniklina odnosno brimonidina);

- ④ Na osnovu uporedne analize postavljenih elektroanalitičkih metoda uz primenu različitih elektroda putem dobijenih statističkih parametara; predložiti metodu izbora uz odgovarajuću elektrodu za određivanje vareniklina odnosno brimonidina u određenom uzorku;

- ④ Ispitivanje potencijalne interakcije vareniklina sa DNK.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Oprema

A. Potenciostat/galvanostat μ AUTOLAB (Ecochemie, Utrecht, Holandija)

Metrohm 663 VA Stand, IME 663 (*Inteface* za Metrohm elektrode) (Herisau, Švajcarska),

I Interna elektrohemijska ćelija sa troelektrodnim sistemom:

1. radna:

a) elektroda viseće živine kapi (*Hanging Mercury Drop Electrode*, HMDE),

b) kapljuća živina elektroda (*Dropping Mercury Electrode*, DME)

2. referentna: (Ag|AgCl|3M KCl),

3. pomoćna: (GC) elektroda.

II Eksterna elektrohemijska ćelija sa troelektrodnim sistemom:

1. radna (čvrsta elektroda):

a) borom dopirana dijamantska elektroda (*Boron Doped Diamond Electrode*, BDDE) (Windsor Scientific Ltd. $d=3$ mm)

b) elektroda od staklastog ugljenika (*Glassy Carbon Electrode*, GCE) (CH Instruments, Inc., SAD, $d=3$ mm)

2. referentna: srebro/srebro-hloridna elektroda (Ag|AgCl|3M KCl)

3. pomoćna: platinska elektroda (Pt).

B. Kompjuterizovani polarograf AMEL 433-A (Amel Instruments, Milano, Italija)

I Interna elektrohemijska ćelija sa troelektrodnim sistemom:

1. radna: elektroda viseće živine kapi (*Hanging Mercury Drop Electrode*, HMDE),

2. referentna: (Ag|AgCl|3M KCl),

3. pomoćna: (Pt) elektroda.

II Eksterna elektrohemijska ćelija sa troelektrodnim sistemom:

2. radna (čvrsta elektroda):

- a) borom dopirana dijamantska elektroda (*Boron Doped Diamond Electrode*, BDDE), (Windsor Scientific Ltd. $d = 3$ mm)
- b) elektroda od staklastog ugljenika (*Glassy Carbon Electrode*, GCE) (CH Instruments, Inc., SAD, $d = 3$ mm)
2. referentna: srebro/srebro-hloridna elektroda (Ag|AgCl|3M KCl)
3. pomoćna: platinska elektroda (Pt)

C. Polarograf PAR 174 (Princeton Applied Research Corp., SAD)

Troelektrodna elektrohemijaska ćelija:

1. radna: kapljuća živina elektroda (*Dropping Mercury Electrode*, DME),
 2. referentna: (Ag|AgCl|3M KCl),
 3. pomoćna: (Pt) elektroda.
- pH metar Radiometer model PHM 220 (Radiometer, Kopenhagen, Danska)
 - Kombinovana pH elektroda model GK2401 (Radiometer, Kopenhagen, Danska)
 - Analitička vaga Scaltec SBC 31 (Scaltec Instruments GmbH, Nemačka)
 - Tehnička vaga Adventurer TM AR 5120 (OHAUS, Kina)
 - Magnetna mešalica (TIM 9000, Radiometer, Kopenhagen, Danska)
 - Centrifuga Hettich EBA 8S (Hettich, Nemačka)
 - Ultrazvučno kupatilo („Iskra” UZ 4R, Slovenija)

3.2. Računarski programi

- GPES 4.9 (*General Purpose Electrochemical System 4.9*)
- NOVA
- Origin 6 i 7
- OriginPro 8
- Microsoft Office Excell 2003 (Microsoft Corporation, SAD)
- Chemdraw Ultra 11.0 / paket ChemBio Office 2008

3.3. Hemikalije

- ✦ Vareniklin-tartarat, $C_{13}H_{13}N_3 \cdot C_4H_6O_6$ ($M_r = 361,35$) (Agencija za lekove i medicinska sredstva, Beograd, Srbija)
- ✦ DNK dvostrukog lanca izolovana iz telećeg timusa (*ds*DNK, $M = 10 \cdot 10^6 - 15 \cdot 10^6$ g mol⁻¹) (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Nemačka)
- ✦ Brimonidin, $C_{11}H_{10}BrN_5$ ($M_r = 292,14$) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- ✦ Brimonidin-tartarat, $C_{11}H_{10}BrN_5 \cdot C_4H_6O_6$ ($M_r = 442,23$) (Agencija za lekove i medicinska sredstva, Beograd, Srbija)
- ✦ Borna kiselina, H_3BO_3 (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- ✦ Glacijalna sirćetna kiselina 100%, CH_3COOH (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- ✦ Fosforna kiselina 85%, H_3PO_4 (Honeywell Speciality Chemicals Sellze, Hannover, Nemačka)
- ✦ Natrijum-hidroksid, $NaOH$ (Carlo Erba, Milano, Italija)
- ✦ Sumporna kiselina, H_2SO_4 (Fisher Chemicals, Velika Britanija)
- ✦ Natrijum-dihidrogenfosfat monohidrat, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- ✦ Natrijum-hidrogenfosfat heptahidrat, $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- ✦ Amonijum-formiat, $HCOONH_4$ (Sigma Aldrich, Nemačka)
- ✦ Natrijum-hlorid, $NaCl$ (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- ✦ Standard za kalibraciju elektrode pH = 7,000 ± 0,010 (Radiometer Analytical S. A., Villeurbanne Cedex, Francuska)
- ✦ Standard za kalibraciju elektrode pH = 4,000 ± 0,010 (Radiometer Analytical S. A., Villeurbanne Cedex, Francuska)
- ✦ Hlorovodonična kiselina, HCl (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- ✦ Kalijum-hlorid, KCl (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- ✦ Natrijum-acetat, CH_3COONa (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- ✦ Amonijum-hidroksid, NH_4OH (Sigma Aldrich, Nemačka)
- ✦ Amonijum-hlorid, NH_4Cl (Fisher Chemicals, Velika Britanija)
- ✦ Apsolutni etanol, C_2H_5OH (Sigma Aldrich, Darmstadt, Nemačka)

- ✦ Metanol, CH₃OH p. a. (Centrohem, Srbija)
- ✦ Acetonitril (Sigma Aldrich, Nemačka)
- ✦ Aluminijum-oksidi, Al₂O₃ (veličina čestica 0,05 μm), sredstvo za pripremu suspenzije za poliranje čvrste elektrode (Metrohm Autolab, Utreht, Holandija)
- ✦ Aktivni ugalj (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ✦ Azot 3,5 (Messer Tehnogas, Beograd, Srbija)
- ✦ Redestilovana voda

3.4. Laboratorijski materijal

- ✦ Mikropipeta 10 – 100 μl (LLG, Meckenheim, Nemačka)
- ✦ Mikropipeta 5 – 10 μl (Socorex, Lausanne, Švajcarska)
- ✦ Odmerni sudovi 10 ml, 50ml, 100 ml
- ✦ Čaše 50 ml
- ✦ Stakleni štapići
- ✦ Stakleni levkovi
- ✦ Staklene bočice sa šlifovanim čepom 150 ml
- ✦ Pipete 5 ml, 10 ml
- ✦ Kivete za centrifugu
- ✦ Plastični špric i igla
- ✦ Tarionik i pistil
- ✦ Magnet za mešanje rastvora
- ✦ Membranski filtri (0,20 μm)
- ✦ Obični filtri
- ✦ Papirna vata
- ✦ Podloga za poliranje čvrste elektrode (Metrohm Autolab, Utreht, Holandija)
- ✦ Stalak za izvođenje transfer (AdTS) tehnike

3.5. Procedure

3.5.1. Priprema rastvora i uзорci za analizu

3.5.1.1. Priprema polaznih rastvora i pufera za elektrohemijsko proučavanje vareniklina i brimonidina

Osnovni (polazni) rastvor vareniklina koncentracije $2,0 \cdot 10^{-3}$ M pripreman je tačnim odmeravanjem 0,0072 g vareniklin-tartarata i rastvaranjem u redestilovanoj vodi u normalnom sudu zapremine 10,00 ml, koji je podeljen u Eppendorf® mikrokivete i zatim zamrznut. Po potrebi je odmrzavana neophodna zapremina rastvora koja je dalje u toku radnog dana razblaživana redestilovanom vodom do postizanja potrebne koncentracije.

Polazni rastvor brimonidina koncentracije $6,0 \cdot 10^{-4}$ M pripremljen je rastvaranjem 0,0066 g u smeši apsolutni etanol : voda (4 : 1) u odmernom sudu od 25,00 ml. Radi lakšeg rastvaranja, rastvor je mešan na ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 30 minuta. Pripremljeni polazni rastvor čuvan je u frižideru/zamrzivaču i od njega je po potrebi odmeravana/odmrzavana odgovarajuća zapremina za pripremu razblaženijih radnih rastvora odgovarajućih koncentracija.

Osnovni (polazni) rastvor DNK dvostrukog lanca (*double stranded, dsDNK*) telećeg timusa, pripremljen je odmeravanjem približno 1,00 mg DNK ($M = 10 - 15 \cdot 10^6$ g mol⁻¹) i rastvaranjem u 10,00 ml $2,0 \cdot 10^{-3}$ M fosfatnog pufera (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH = 7,0). Prema tome, konačna koncentracija polaznog rastvora DNK utvrđena je spektrofotometrijskom metodom i iznosila je $1,3 \cdot 10^{-4}$ M.

Briton-Robinsonov univerzalni pufer (pH = 2,0 – 12,0) pripreman je na uobičajeni način.¹¹² Kisela komponenta pripremljena je rastvaranjem: 2,47 g H₃BO₃, 2,30 ml 98 % CH₃COOH i 2,70 ml 85 % H₃PO₄ u 1,00 l redestilovane vode. Bazna komponenta pripremana je rastvaranjem 4,00 g NaOH u 1,00 l redestilovane vode u plastičnoj boci.

Rastvori pufera odgovarajućih pH vrednosti dobijene su mešanjem/titriranjem kisele komponente baznom komponentom (ili obrnuto) na magnetnoj mešalici do postizanja odgovarajuće konstantne pH vrednosti koja je merena uronjenom kombinovanom pH elektrodom, a vrednost očitavana pH-metrom.

Rastvori osnovnih elektrolita (puferi) odgovarajućih pH vrednosti i jonske jačine $I = 0,1$ M; pripremani su prema standardnoj proceduri¹¹² (**Tabela 1.**) i čuvani u frižideru ($t = 4 - 8^{\circ}$ C).

Tabela 1. Rastvori osnovnih elektrolita (puferi) odgovarajućih pH vrednosti ($I=0,1$ M).

| pH | Sastav osnovnog elektrolita |
|------|---|
| 2,2 | HCl + KCl |
| 3,6 | CH ₃ COOH + CH ₃ COONa |
| 4,6 | CH ₃ COOH + CH ₃ COONa |
| 5,4 | CH ₃ COOH + CH ₃ COONa |
| 6,2 | NaH ₂ PO ₄ + Na ₂ HPO ₄ |
| 7,0 | NaH ₂ PO ₄ + Na ₂ HPO ₄ |
| 8,0 | NaH ₂ PO ₄ + Na ₂ HPO ₄ |
| 8,5 | NH ₃ + NH ₄ Cl |
| 9,2 | NH ₃ + NH ₄ Cl |
| 10,2 | NH ₃ + NH ₄ Cl |

Rastvori 0,5 – 0,005 M H₂SO₄ pripremani su tačnim odmeravanjem pipetom potrebne zapremine koncentrovane sumporne kiseline i dodavanjem odgovarajućoj zapremini redestilovane vode (ukupna zapremina 15,00 ml).

3.5.1.2. Priprema doziranog oblika vareniklina - Champix[®] tableta za analizu

Za određivanje vareniklina u farmaceutskom doziranom obliku korišćen je na grčkom tržištu komercijalno dostupan oblik vareniklin-tartarata, Champix[®] (1 tableta sadrži 1,00 mg VAR; Pfizer Inc.).

U tarioniku sa pistilom fino je sprášeno 10 Champix[®] tableta, a zatim odmerena masa dobijenog praška koja sadrži onoliko VAR koliko je potrebno da se pripremi rastvor ekvivalentne koncentracije osnovnom rastvoru, $2,0 \cdot 10^{-3}$ M. Odmerena masa je zatim rastvorena u redestilovanoj vodi u normalnom sudu, a zatim dobijena suspenzija centrifugirana i potom supernatant filtriran kroz membranski filter kako bi se odvojile nerastvorne komponente. Ovako dobijeni rastvor korišćen je u daljim voltametrijskim ispitivanjima ili skladišten u frižideru do skorog korišćenja.

3.5.1.3. Dozirani oblik brimonidina – Alphagan[®] kapi za oči

Dozirani oblik, u kome je određivan sadržaj brimonidina, jeste Alphagan[®] (Allergan, Irska) – kapi za oči (0,2 % rastvor brimonidin-tartarata, sadrži 1,3 mg brimonidina u 1 ml). Komponente pomenutih kapi za oči, osim farmakološki aktivnog brimonidina, jesu: polivinil-alkohol, natrijum-hlorid, natrijum-citrat, limunska kiselina, voda, hlorovodonična kiselina ili natrijum-hidroksid za regulaciju pH vrednosti rastvora i benzalkonijum-hlorid. Uprkos kompleksnom sastavu, nije bila potrebna priprema doziranog oblika u vidu ekstrakcije, filtracije ili uparavanja, a zatim dodatnog rastvaranja, odnosno navedene komponente nisu ispoljavale nikakvu interferenciju sa analitom - brimonidinom. Prema tome, odgovarajuća zapremina komercijalnih kapi za oči direktno je dodata osnovnom elektrolitu odmerenom u ćeliji i zatim su snimani/dobijeni odgovarajući voltamogrami.

3.5.1.4. Priprema uzorka humane krvne plazme

Uzorak humane plazme zdravih dobrovoljaca (~ 5,00 ml) dobijen je sa Katedre za biohemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu uz saglasnost Etičkog komiteta Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Potrebna količina uzorka plazme za ispitivanje po potrebi je odmrzavana i pripremana tako što je 0,40 ml plazme i 4,00 ml koncentrovanog metanola pomešano kako bi se istaložili proteini, a zatim centrifugirano tokom 25 min na 3900 r.p.m.

(*rotation per minute* = r.p.m., obrtaja u minuti). Bistar supernatant (~ 2,00 ml) pažljivo je izvučen uz pomoć šprica sa iglom, a zatim profiltriran kroz membranski filter (0,20 µm) i tako pripremljena plazma korišćena je u daljim ispitivanjima ili skladištena u zamrzivaču u Eppendorf® mikrokiveta do skorog korišćenja.

Krvna plazma predstavlja složeni biološki uzorak – krv bez krvnih ćelija, koja se dobija centrifugiranjem pune krvi. Na ovakav način dobijena plazma sadrži fibrinogen, za razliku od seruma. Radi sprečavanja koagulacije, u epruvete u kojima se sakuplja krv, dodaje se antikoagulans (heparin, EDTA, oksalat, citrat).

Uzorci plazme korišćeni su kao matriks u ispitivanjima i opterećivani odgovarajućim standardnim rastvorima vareniklina kako bi bio ispitan eventualni uticaj matriksa odnosno potencijalnih interferencija na kvalitet voltometrijskog signala, odnosno mogućnost određivanja vareniklina u ovoj vrsti uzorka.

3.5.1.5. Priprema uzorka humane očne vodice

Biološki materijal (očna vodica) prikupljen je od 10 odraslih dobrovoljaca (u zapremini ~ 1,5 ml), sa postojećom bolešću oka – kataraktom, koja je sanirana operativnim putem. Prilikom same operacije na oku, očnu vodicu je uzimao kvalifikovani specijalista oftalmologije. Na samom početku operacije, nakon primenjene lokalne anestezije, punkcija je izvedena na perifernom delu rožnjače tako što se vrh igle postavi u sredinu prednje komore i lagano aspirira 100 - 150 µl očne vodice. Aspirirani uzorak je odmah iz šprica prenet u plastičnu Eppendorf® mikrokivetu i zamrznut najpre na temperaturi od -15 °C, a nakon 4 sata na temperaturi dubokog zamrzavanja od -70 °C. Za svaki potreban transport uzoraka bio je obezbeđen hladan lanac u vidu prenosivog kontejnera - zamrzivača, čime je bilo sprečeno eventualno odmrzavanje i zatim ponovno zamrzavanje uzoraka.⁵⁰

Pre same upotrebe uzorka za ispitivanje, potrebna zapremina očne vodice je odmrznuta i napravljen je tzv. *pool* uzorak (objedinjeni uzorak u zapremini ~1,5 ml), koji je dalje tretiran taložnim reagensom za proteine (metanolom), a potom je centrifugiran u cilju uklanjanja istaloženih proteina iz uzorka. Nakon centrifugiranja, špricom sa iglom je izvučen supernatant iznad neznatnog taloga proteina, podeljen u

plastične Eppendorf® mikrokivete i odložen u zamrzivač. Određena zapremina tako pripremljene očne vodice je dodavana odgovarajućoj zapremini odabranog pufera koji je prethodno odmeren u elektrohemijisku ćeliju.

Očna vodica predstavlja viskoznu, prozirnu tečnost, po sastavu sličnu plazmi, ali sa niskim sadržajem proteina. Najveći deo očne vodice čini voda (>98%), u kojoj se nalaze: elektroliti, aminokiseline i proteini (200 puta manje zastupljeni nego u plazmi), glutation (tripeptid), askorbat, urea, glukoza, imunoglobulini. Do izvesne promene sastava očne vodice može doći usled nastalih patoloških procesa u oku.¹¹³

Uzorci očne vodice koristili su se u ispitivanjima kao matriks koji je opterećivan sa odabranim koncentracijama standarda brimonidina. Na ovaj način trebalo je ispitati da li preostale komponente očne vodice (nakon uklanjanja proteina) utiču (značajno) na kvalitet analitičkog signala.

3.5.2. Priprema čvrstih elektroda – GCE i BDDE

Tokom ispitivanja vareniklina, pre svakog merenja, elektroda od staklastog ugljenika (GCE) pripremana je tako što je 5 min stajala u smeši aktivni uglj : acetonitril = 1 : 3 na magnetnoj mešalici, sa ciljem što boljeg uklanjanja adsorbovanih organskih supstanci sa površine. Nakon ispiranja redestilovanom vodom, vršeno je poliranje tokom 2 min pastom Al₂O₃ (Ø 0,05 µm) na odgovarajućoj podlozi za poliranje, i zatim dobro ispirana redestilovanom vodom.

Primena borom dopirane dijamantske elektrode (BDDE) u ispitivanju vareniklina podrazumevala je pripremu pre svakog merenja tako što je nakon poliranja pastom Al₂O₃ (Ø 0,05 µm) na odgovarajućoj podlozi za poliranje u trajanju od 1 min i ispiranja redestilovanom vodom, izlagana elektrohemijskoj pripremi (*electrochemical pretreatment*). To je podrazumevalo uranjanje BDDE, referentne i pomoćne elektrode u rastvor 0,25 M H₂SO₄ u kome je vršena katodna priprema (*cathodic pretreatment*) elektrode primenom konstantnog potencijala $E = -2,0$ V tokom 120 s, odnosno anodna priprema (*anodic pretreatment*) elektrode podrazumevala je primenu potencijala $E = +2,0$ V u toku 60 s. Na taj način je katodnom pripremom dobijena *hydrogen terminated*

(HT) površina, a anodnom pripremom je dobijena *oxygen terminated* (OT) površina BDD elektrode.^{114,115}

U elektrohemijским proučavanjima brimonidina, borom dopirana dijamantska elektroda pripremana je najpre ručnim poliranjem vodenom suspenzijom Al_2O_3 na odgovarajućoj podlozi za tu namenu, potom ispirana redestilovanom vodom i na kraju, tokom katodne odnosno anodne pripreme, izlagana dejstvu potencijala od +1,2 V odnosno -1,5 V tokom 60 s, u rastvoru 0,25 M H_2SO_4 . Na ovaj način površine elektrode su okarakterisane kao "*hydrogen-terminated*" (HT) odnosno "*oxygen-terminated*" (OT).^{114,115} Procedura pripreme elektrode ponavljana je pre svakog merenja, jer je ovakvim pristupom eksperimentalno potvrđena bolja reproduktivnost merenja u odnosu na samo jedno poliranje na početku radnog dana. Sa ciljem da se postupak pripreme elektrode učini uniformnim, bržim i jednostavnijim, najpre je preliminarno ispitana, a zatim i primenjena, pojednostavljena priprema BDD elektrode u analizi očne vodice. Naime, BDDE je polirana samo na početku radnog dana u trajanju od 2 min, a zatim je pre svakog merenja primenjivana anodna priprema (*anodic pretreatment*) elektrode što je podrazumevalo primenu potencijala $E = +1,2$ V u trajanju 60 s u 0,25 M H_2SO_4 , s obzirom da je određivanje BRIM u očnoj vodici zasnovano na oksidacionom piku.

Za proučavanja brimonidina, GCE pripremana je ručnim poliranjem pastom Al_2O_3 (\varnothing 0,05 μm) na odgovarajućoj podlozi za poliranje u trajanju od 2 min, zatim ispirana redestilovanom vodom i na kraju uranjana u epruvetu sa apsolutnim etanolom u trajanju od 2 min na ultrazvučnom kupatilu. Potpuna priprema završavana je ispiranjem redestilovanom vodom uz pažljivo brisanje papirnom vatom bez dodirivanja radne površine elektrode.

3.5.3. Elektrohemijsko ispitivanje vareniklina i brimonidina

3.5.3.1. Uslovi i procedure za ispitivanje uticaja pH na elektrohemijsko ponašanje vareniklina – CV i DCP

Za ispitivanje elektrohemijskog ponašanja vareniklina, primenjena je ciklična voltametrij (CV) uz HMDE, odnosno polarografija jednosmerne struje (DCP) uz DME. U elektrohemijsku ćeliju odmeravano je pipetom 15,00 ml osnovnog elektrolita (BR puffer) različitih pH vrednosti (2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 9,5; 10,0; 10,5; 11,0; 11,5 i 12,0) i zatim uveden gas N₂ tokom 10 min. Nakon snimanja odgovarajućeg voltamograma osnovnog elektrolita (*blank* proba), dodata je odgovarajuća zapremina osnovnog rastvora vareniklina. Za CV ispitivanja osnovnom elektrolitu u ćeliji dodato je 0,15 ml prethodno pripremljenog osnovnog rastvora vareniklina, te je konačna koncentracija iznosila $1,0 \cdot 10^{-5}$ M VAR. DCP ispitivanja obavljana su u ćeliji u kojoj je koncentracija iznosila $1,0 \cdot 10^{-4}$ M VAR. Nakon dodatka standaradnog rastvora radi postizanja željenih koncentracija VAR u ćeliji, rastvoru je još 3 min dovođen gas N₂, nakon čega su snimani odgovarajući voltamogrami/polarogrami. DPV ispitivanje uz primenu HMDE izvedeno je pri koncentraciji $1,0 \cdot 10^{-5}$ M VAR.

Isti postupak primenjivan je i kod CV uz primenu GCE odnosno BDDE, a ukupna koncentracija VAR u ćeliji iznosila je $2,5 \cdot 10^{-4}$ M.

Sva ispitivanja vršena su na sobnoj temperaturi $t = 25$ °C ($T = 298$ K) i uz uvođenje gasa N₂ kako bi se redukovao prisutni kiseonik radi uklanjanja moguće interferencije kiseonika u katodnoj oblasti.

3.5.3.2. Uslovi i procedure za elektrohemijsko proučavanje brimonidina - CV i DCP

Odgovarajuća zapremina osnovnog rastvora dodata je rastvoru odgovarajućeg pomoćnog elektrolita (pufera) u elektrohemijskoj ćeliji, tako da je ukupna zapremina od 10,00 ml imala konačnu koncentraciju brimonidina $5,0 \cdot 10^{-5}$ M za DCP ispitivanja. Za CV ispitivanja konačna koncentracija u elektrohemijskoj ćeliji iznosila je $1,0 \cdot 10^{-5}$ M BRIM uz upotrebu HMDE, $2,5 \cdot 10^{-4}$ M uz upotrebu BDDE, dok je uz upotrebu GCE iznosila $1,0 \cdot 10^{-4}$ M.

Pre svakog merenja, u novi rastvor u elektrohemijskoj ćeliji uveden je gas N_2 u trajanju od 10 minuta čime je uklonjena mogućnost interferencije kiseonika u katodnoj oblasti. Uvođenje gasa u ispitivani rastvor nastavljano je nakon svakog obavljenog merenja i tokom pripreme elektrode (poliranje u trajanju od 1 minuta i elektrohemijska priprema u trajanju od 1 minuta).

3.5.3.3. Procedura za AdSSW metodu u ispitivanju adsorptivnih svojstava vareniklina na HMDE

Odgovarajuća zapremina (15,00 ml) osnovnog elektrolita Briton-Robinsonovog pufera pH = 5,0 i 8,0 preneti je u elektrohemijsku ćeliju i uvođenjem gasa, čistog N_2 , u trajanju od 10 minuta izvršena deaeracija rastvora. Tokom variranja vremena akumulacije, rastvor je mešan brzinom od 300 r.p.m. (*rotation per minute* = r.p.m.). Po isteku izabranog vremena akumulacije (t_{acc}), zaustavljano je mešanje rastvora i nakon kratkog perioda pauze i smirivanja rastvora, snimljen je odgovarajući AdSSW voltamogram. Tom prilikom, za proces redukcije vareniklina uz upotrebu HMDE primenjen je potencijal u rasponu -0,2 V do -1,2 V.

3.5.3.4. Procedura adsorptivne transfer „stripping” tehnike (AdTS)

Adsorpcija DNK iz vrlo male zapremine kapi (5,0 μ l) dešava se na površini HMDE tokom izabranog perioda akumulacije $t_{acc} = 120$ s. Nakon što je formiran

adsorbovani sloj DNK na površini elektrode, pažljivo se spere elektroda redestilovanom vodom, zatim uroni u elektrohemijsku ćeliju sa rastvorom osnovnog elektrolita i na kraju snimi odgovarajući voltamogram DNK (Poglavlje 1.6., **Slika 18.**). Na isti način postiže se adsorpcija vareniklina na površini elektrode, dok je adsorpcija smeše vareniklina i DNK ispitivana tokom različitog vremena inkubacije $t_{inc} = 2 - 30$ minuta. Elektroda sa adsorbovanim slojem nakon ispiranja redestilovanom vodom uranja se u rastvor osnovnog elektrolita, a zatim se snima odgovarajući SW voltamogram.

3.5.3.5. Procedura ispitivanja interakcije vareniklina i DNK

Ispitivanju potencijalne interakcije VAR i DNK, prethodilo je modifikovanje HMDE najpre vareniklinom zatim sa DNK, tako da su nastale HMDE/VAR odnosno HMDE/DNK modifikovane elektrode. Pomenuta modifikacija izvršena je pod istim uslovima: jonska jačina ($5,0 \cdot 10^{-2}$ M NaCl), pH vrednost (fosfatni pufer, pH = 7,0), koncentracija rastvora ($20 - 100 \cdot 10^{-6}$ M VAR odnosno dsDNK) i vreme inkubacije (2 - 30 minuta); tako da je postignuta maksimalna adsorpcija kako VAR tako i DNK. Na kraju su uz primenu adsorptivne transfer „*stripping*” tehnike snimljeni odgovarajući SW voltamogrami.

Za ispitivanje interakcije vareniklina i DNK napravljena je njihova smeša odgovarajućih istih koncentracija koja je izlagana različitim vremenima inkubacije (2 - 30 minuta), a zatim su snimani odgovarajući SW voltamogrami.

4. REZULTATI

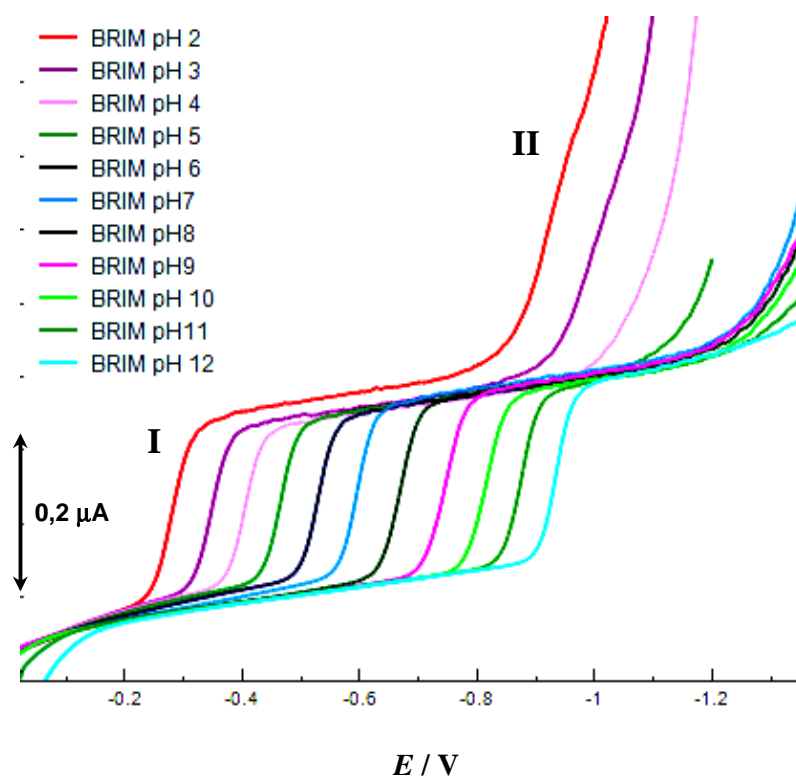
I

DISKUSIJA

4.1. Elektrohemijsko ponašanje brimonidina i vareniklina

4.1.1. Proučavanje elektrohemijskog ponašanja brimonidina i vareniklina primenom DCP

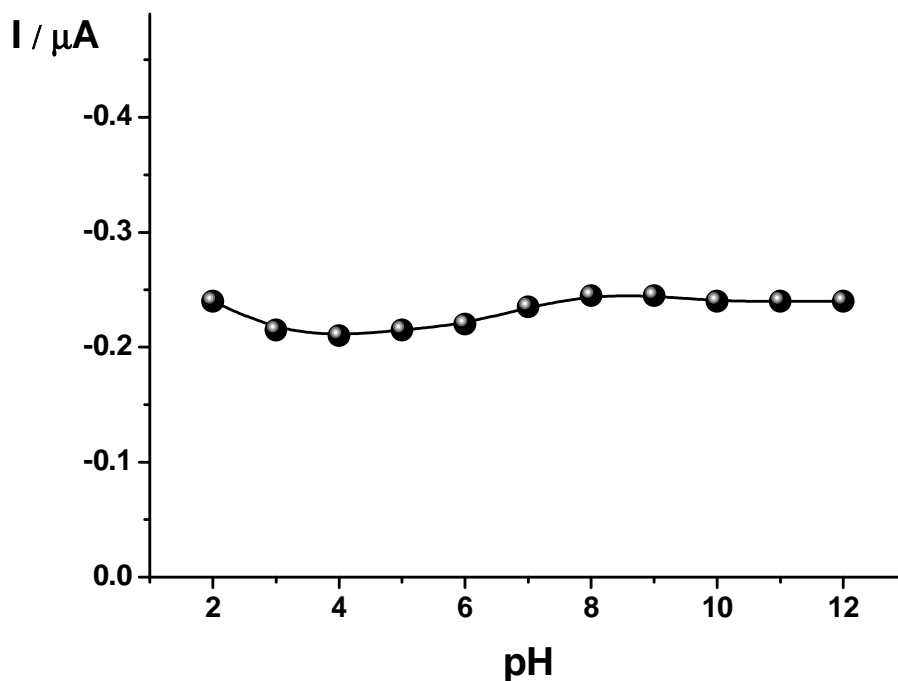
Elektrohemijsko ponašanje brimonidina proučavano je u univerzalnom Briton-Robinsonovom puferu različitih pH vrednosti (2,0 – 12,0) uz primenu polarografije jednosmerne struje (DCP). DC polarografija primenjena je uz korišćenje kapljuće živine elektrode (DME). S obzirom na ograničenje radne živine elektrode da se može koristiti samo u katodnoj oblasti potencijala, proučavana je preventivno redukcija BRIM. Na **Slici 19.** prikazane su karakteristične polarografske krive dobijene redukcijom brimonidina koje ukazuju da je BRIM polarografski aktivan u celokupnoj ispitivanoj pH oblasti. Dobro izražen polarografski talas (I) odlikuje se približno konstantnim



Slika 19. Polarogrami $5,0 \cdot 10^{-5}$ M brimonidina u rastvorima Briton-Robinsonovih pufera dobijeni pri različitim pH vrednostima u oblasti od 2,0 do 12,0.

vrednostima struja u celokupnoj ispitivanoj pH oblasti, dok se vrednosti polutalasnih potencijala pomeraju od početne ka negativnijim vrednostima ($E_{1/2} = -0,290$ V na pH = 2,0 do $E_{1/2} = -0,935$ V na pH = 12,0). Na odgovarajućem polarogramu pri pH = 2,0 i 3,0 uočava se veoma slabo izražen drugi katodni talas (II).

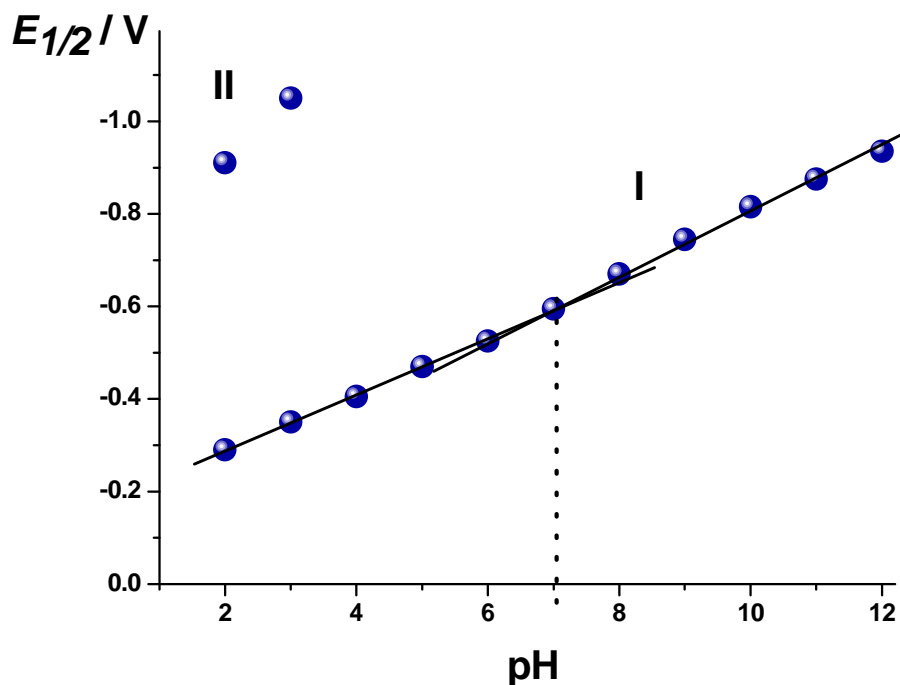
Visine prvog polarografskog katodnog talasa (I), odnosno intenziteti graničnih struja kreću se u rasponu od $-0,21 \mu\text{A}$ na pH = 4,0 do $-0,245 \mu\text{A}$ na pH = 7,0 i 8,0 odnosno intenziteti struja u celokupnoj ispitivanoj pH oblasti su veoma ujednačeni (Slika 20.).



Slika 20. Zavisnost intenziteta struje prvog (I) polarografskog talasa $5,0 \cdot 10^{-5}$ M brimonidina od promene pH vrednosti rastvora (Briton-Robinsonov pufer pH = 2,0-12,0).

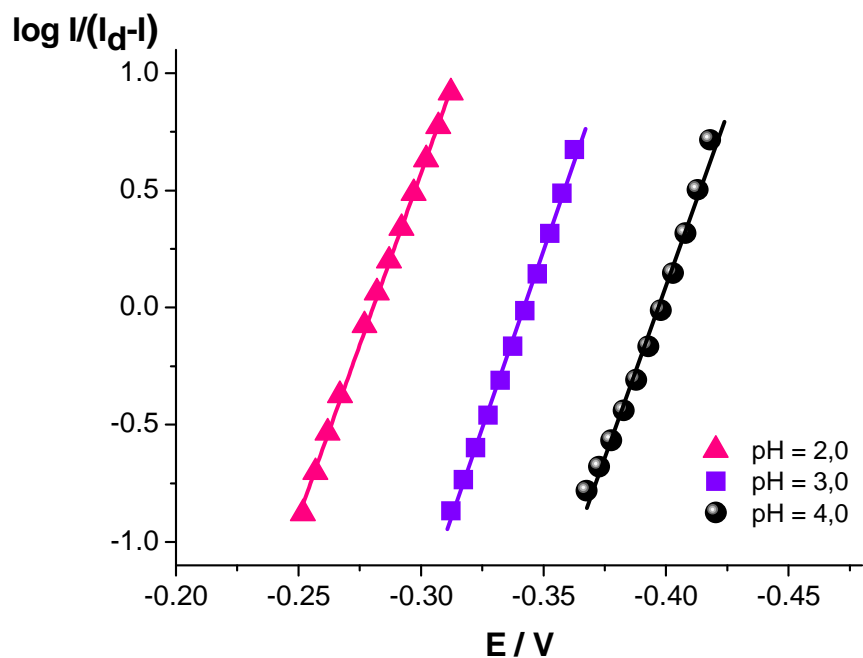
Na **Slici 21.** uočava se da sa porastom pH vrednosti rastvora dolazi do promene polutalasnog potencijala polarografskog talasa, pri čemu ovu zavisnost ilustruju dva linearna segmenta različitih nagiba. Kod prvog segmenta, promena polutalasnog

potencijala iznosi 60 mV/pH; dok kod drugog segmenta iznosi 66 mV/pH. Tački preseka ova dva pravca odgovara pH vrednost približno 7,0.



Slika 21. Zavisnost polutalasnog potencijala prvog (I) i drugog (II) polarografskog talasa $5,0 \cdot 10^{-5}$ M brimonidina od promene pH vrednosti rastvora (Briton-Robinsonov pufer pH = 2,0-12,0).

Logaritamska analiza polarografskih talasa brimonidina izvršena je pri različitim pH vrednostima Briton-Robinsonovog pufera. Na **Slici 22.** predstavljena je zavisnost $\log I/(I_d - I)$ od potencijala u kiselj oblasti. Na sve tri izabrane pH vrednosti 2,0; 3,0 i 4,0; dobijena je linearna zavisnost sa približno istim vrednostima nagiba. Njihove izračunate vrednosti kao i vrednosti parametara αn_α date su u **Tabeli 2.** Na osnovu izračunatih vrednosti parametara αn_α datih u **Tabeli 2.** i primenom jednačine (12) (Poglavlje 1.4.3.) dobijene su eksperimentalne vrednosti broja razmenjenih protona (m).



Slika 22. Logaritamska analiza polarografskih talasa $5,0 \cdot 10^{-5}$ M brimonidina u Britton-Robinsonovom puferu u kiseljoj oblasti pH od 2,0 do 4,0.

Tabela 2. Nagibi pravih $\log I/(I_d - I) = f(E)$, vrednosti parametara αn_α i broja protona m dobijenih logaritamskom analizom polarografskih talasa brimonidina.

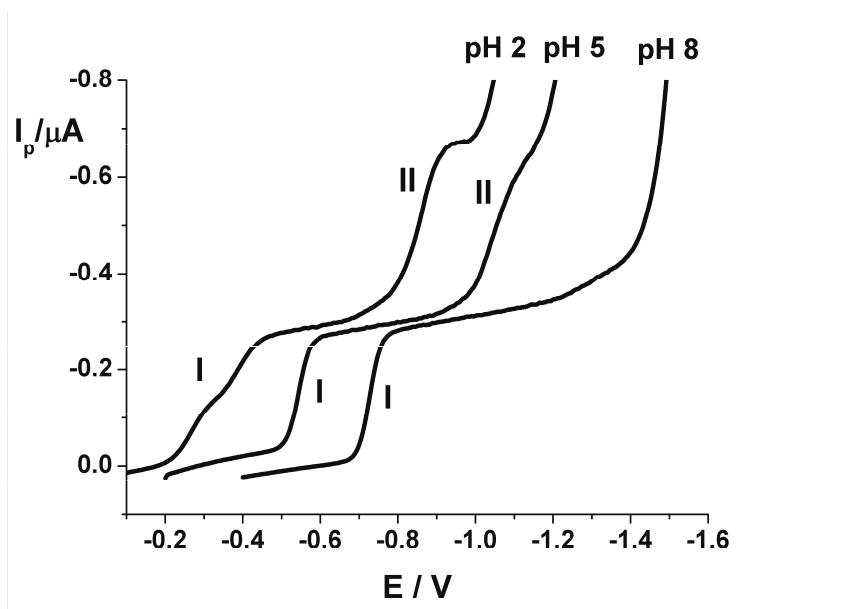
| pH | Nagib (V^{-1}) | $\frac{2,303 \cdot RT}{\alpha n_\alpha \cdot F}$ (V)* | R | αn_α | m^{**} | |
|-----|--------------------|---|--------|-------------------|-----------------|-----------|
| | | | | | Eksperimentalno | Teorijski |
| 2,0 | 29,314 | 0,0341 | 0,9995 | 1,73 | 1,76 | 2 |
| 3,0 | 30,399 | 0,0328 | 0,9986 | 1,80 | 1,84 | |
| 4,0 | 29,496 | 0,0339 | 0,9946 | 1,74 | 1,78 | |

* $\frac{2,303 \cdot RT}{\alpha n_\alpha \cdot F} = \frac{1}{\text{nagib}}$, ** $m = [(\Delta E_{1/2}/\Delta pH)/0,0591] \cdot \alpha n_\alpha$

Izračunate vrednosti parametara αn_α na izabranim pH vrednostima (2,0; 3,0 i 4,0) su u intervalu 1,73 - 1,80; dok su vrednosti m veće od 1,50 i nalaze se u rasponu 1,76 - 1,84. Za izračunavanje parametara prikazanih u **Tabeli 2.** primenjena je jednačina prvog linearnog segmenta $E_{1/2} = -0,060 \cdot pH - 0,167$ ($R = 0,9993$) (**Slika 21.**) odakle je $\Delta E_{1/2}/\Delta pH = 60$ mV.

Primenom polarografije jednosmerne struje (DCP) i kapljuće živine elektrode (DME), proučavano je i elektrohemijsko ponašanje vareniklina u univerzalnom Briton-Robinsonovom puferu različitih pH vrednosti (2,0 – 12,0).

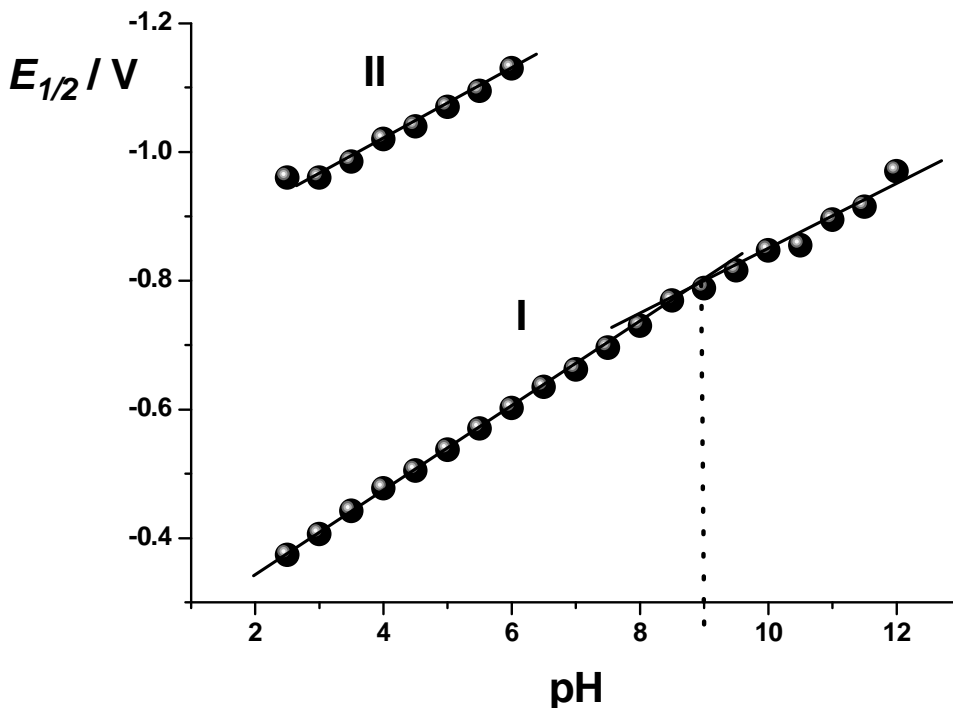
Na **Slici 23.** prikazani su reprezentativni polarogrami koji prikazuju aktivnost vareniklina u kiseljoj, slabo kiseljoj i slabo baznoj sredini, a ispoljena je prisustvom: dva katodna talasa u kiseljoj sredini (I i II); i jednog katodnog talasa (I) u oblasti neutralne odnosno bazne sredine. Uočava se da su visine polarografskih talasa odnosno intenziteti granične struje prvog i drugog katodnog talasa približno konstantne i jednake, dok se odgovarajući polutalasnici potencijali oba talasa pomeraju ka negativnijim vrednostima sa porastom pH vrednosti rastvora. Na polarogramu pri pH = 2,0 može se uočiti razdvajanje (*splitting*) prvog talasa (I).



Slika 23. Reprezentativni DC polarogrami pri koncentraciji vareniklina $1,0 \cdot 10^{-4}$ M u Briton-Robinsonovom puferu na pH = 2,0; 5,0 i 8,0.

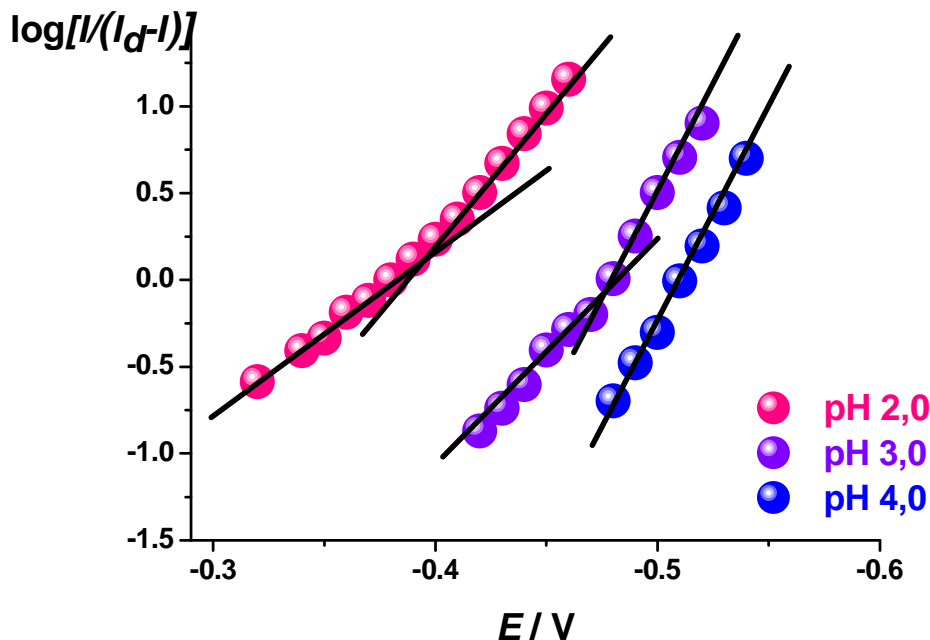
Uticao pH vrednosti rastvora na elektrohemijsko ponašanje vareniklina u katodnoj oblasti potencijala prikazan je zavisnošću polutalasnih potencijala ($E_{1/2}$) prvog i drugog polarografskog talasa (I i II) od pH vrednosti rastvora, što je prikazano na **Slici 24.** Vrednosti polutalasnih potencijala pomeraju se ka negativnijim vrednostima, i to za

prvi polarografski talas (I) počevši od -0,38 V do -0,95 V; a za drugi talas (II) počevši od -0,95 V do -1,18 V. Za prvi polarografski talas (I) dobijena su dva linearna segmenta različitih nagiba sa tačkom preseka kojoj odgovara pH ~ 9,0. Promena polutalasnog potencijala polarografskog talasa kod prvog segmenta iznosi 64 mV/pH; a kod drugog segmenta iznosi 49 mV/pH.



Slika 24. Uticaj pH vrednosti rastvora na polutaladni potencijal $1,0 \cdot 10^{-4}$ M vareniklina ($E_{1/2}$) prvog (I) i drugog (II) polarografskog talasa u Britton-Robinsonovom puferu (pH = 2,0 – 12,0).

Na **Slici 25.** predstavljena je zavisnost $\log[I/(I_a - I)]$ od potencijala, odnosno logaritamska analiza prvog polarografskog talasa vareniklina u Britton-Robinsonovom puferu u kiseljoj sredini pri pH = 2,0; 3,0 i 4,0. Dobijene zavisnosti predstavljene su sa po dva linearna segmenta na pH = 2,0 i 3,0; dok na pH = 4,0 postoji samo jedan linearan segment. Manji nagibi prisutni su pri pozitivnijim vrednostima potencijala i odgovaraju delu do razdvajanja talasa, a veći nagibi javljaju se pri negativnijim vrednostima potencijala i odgovaraju delu talasa nakon razdvajanja.



Slika 25. Logaritamska analiza ($\log[I/(I_d - I)] = f(E)$) prvog (I) polarografskog talasa $1,0 \cdot 10^{-4}$ M vareniklina u Briton-Robinsonovom puferu pH = 2,0; 3,0 i 4,0.

Rezultati logaritamske analize prvog polarografskog talasa vareniklina pri pH vrednosti 2,0; 3,0 i 4,0 pokazuju linearnu zavisnost $\log[I/(I_d - I)]$ od potencijala, a izračunate vrednosti nagiba linearnih segmenata, vrednosti parametara αn_α i m prikazani su u **Tabeli 3**.

Tabela 3. Nagibi pravih $\log I/(I_d - I) = f(E)$, vrednosti parametara αn_α i broja protona m dobijenih logaritamskom analizom polarografskih talasa $1,0 \cdot 10^{-4}$ M VAR.

| pH | Segment / Nagib(V ⁻¹) | $\frac{2,303 \cdot RT}{\alpha n_\alpha \cdot F}$ (V)* | R | αn_α | m** | |
|-----|--------------------------------------|---|--------|-------------------|-----------------|-----------|
| | | | | | Eksperimentalno | Teorijski |
| 2,0 | I / 10,521 | 0,0950 | 0,9944 | 0,62 | 0,67 | 1 |
| | II / 16,247 | 0,0615 | 0,9996 | 0,96 | 1,04 | |
| 3,0 | I / 14,039 | 0,0712 | 0,9930 | 0,83 | 0,90 | |
| | II / 22,462 | 0,0445 | 0,9977 | 1,32 | 1,43 | |
| 4,0 | 25,190 | 0,0396 | 0,9820 | 1,49 | 1,61 | 2 |

* $\frac{2,303 \cdot RT}{\alpha n_\alpha \cdot F} = \frac{1}{\text{nagib}}$, ** $m = [(\Delta E_{1/2}/\Delta pH)/0,0591] \cdot \alpha n_\alpha$

Izračunate vrednosti parametara αn_{α} na izabranim pH vrednostima (2,0 i 3,0) nalaze se u intervalu 0,62 – 1,32; dok su vrednosti m veće od 0,50 i nalaze se u rasponu 0,67 – 1,43. Pri pH = 4,0 dobijene su vrednosti $\alpha n_{\alpha} = 1,49$ i $m = 1,61$. Za izračunavanje parametara prikazanih u **Tabeli 3.** primenjena je jednačina prvog linearnog segmenta $E_{1/2} = -0,064 \cdot pH - 0,213$ ($R = 9997$) (**Slika 24.**) odakle je $\Delta E_{1/2}/\Delta pH = 64$ mV.

4.1.1.1. Uticaj pH vrednosti sredine na polarografsko ponašanje brimonidina i vareniklina (DCP)

Proučavanjem polarografskog ponašanja brimonidina i vareniklina utvrđena je aktivnost oba leka u celokupnoj ispitivanoj oblasti pH vrednosti od 2,0 do 12,0. Rezultati ukazuju da BRIM i VAR podležu procesu redukcije i da pH vrednost ima značajnog uticaja na ovaj proces.

O polarografskom ponašanju i dešavanjima na površini elektrode prve informacije dobijaju se na osnovu samog oblika i izgleda polarografskih krivih (**Slike 19, 23.**).

U slučaju brimonidina, na svim ispitivanim vrednostima pH (2,0 – 12,0) jasno je izražen jedan polarografski talas koji se odlikuje konstantnošću u pogledu visine i nagiba, što upućuje na zaključak da se radi o jednostepenoj redukciji.

Kod vareniklina (**Slika 23.**), jasno je izražen prvi talas (I) u celokupnoj ispitivanoj pH oblasti, koji se u kiseloj sredini razdvaja/cepa, što ukazuje na prisustvo dva talasa veoma bliskih polutalasnih potencijala ($\Delta E_{1/2} \sim 0,1$ V). Sa porastom pH vrednosti, ova razlika polutalasnih potencijala se smanjuje što se na polarogramima manifestuje prisustvom samo jednog talasa pri pH > 4,0. Takođe, na polarogramima vareniklina jasno je izražen i drugi katodni talas (II) u kiseloj sredini, koji je približno iste visine kao prvi katodni talas. Odavde se može pretpostaviti da oba talasa predstavljaju redukciju sa učešćem istog broja elektrona.

Poredeći polarografsko ponašanje brimonidina i vareniklina, uočavaju se izvesne sličnosti i razlike. Sličnost se ogleda u prisustvu prvog katodnog talasa u celokupnoj ispitivanoj oblasti pH. Različitost se odražava na nivou drugog talasa, koji je prisutan kod vareniklina u kiseloj sredini, a izostaje kod brimonidina (prisutan samo pri pH = 2,0, ali nedovoljno izražen). Takođe, uočava se razdvajanje prvog talasa vareniklina u kiseloj sredini, dok kod brimonidina nije primećena ova pojava.

Uticaj pH na položaj polarografskog talasa brimonidina predstavljen je u vidu dva linearna segmenta (**Slika 24.**). Jednačinom $E_{1/2} = -0,060 \cdot pH - 0,167$ ($R = 0,9993$) opisan je prvi segment, a jednačinom $E_{1/2} = -0,066 \cdot pH - 0,148$ ($R = 0,9981$) opisan je

drugi linearni segment. U preseku ovih pravaca dobijena je vrednost $pH \sim 7,1$ što približno odgovara vrednosti $pK_a = 7,4$ brimonidina.^{42,43,116}

Na **Slici 24.** prikazan je uticaj pH vrednosti na polutaladni potencijal prvog i drugog polarografskog talasa (I i II) vareniklina. Razlika polutalasnih potencijala ova dva katodna talasa u kiselost oblasti iznosi $\Delta E \sim 0,5$ V. Jednačinom $E_{1/2} = -0,064 \cdot pH - 0,213$ ($R = 0,9997$) opisan je prvi segment, a jednačinom $E_{1/2} = -0,049 \cdot pH - 0,347$ ($R = 0,9934$) opisan je drugi linearni segment prvog polarografskog talasa (I) vareniklina. Za drugi polarografski talas (II) dobijena je jednačina $E_{1/2} = -0,056 \cdot pH - 0,792$ ($R = 0,9982$). S obzirom na prisustvo dva linearna segmenta različitih nagiba koja se odnose na prvi polarografski talas vareniklina (I) inače prisutnog u celokupnoj ispitivanoj pH oblasti, dobijena je tačka preseka pri $pH = 9,0$ što je približno jednako $pK_a = 9,2$ vrednosti vareniklina.⁴⁰

Postojanje pravolinijskih zavisnosti sa određenim nagibima i pomeranje vrednosti polutalasnih potencijala sa porastom pH , znači da je proces redukcije pod značajnim uticajem kiselosti sredine. Pozitivnije vrednosti polutalasnih potencijala u kiselost sredini objašnjavaju se olakšanom redukcijom uz učešće protona.

Poredeći zavisnost $E_{1/2} = f(pH)$ prvog polarografskog talasa brimonidina i vareniklina uočavaju se izvesne sličnosti i razlike. Naime, kod oba leka prisutna je linearna zavisnost polutalasnih potencijala od pH vrednosti sredine predstavljena u vidu dva linearna segmenta, kao i pomeranje polutalasnih potencijala ka negativnijim vrednostima sa porastom pH . Razlika se manifestuje različitim vrednostima pH odnosno pK_a koje odgovaraju tačkama preseka linearnih segmenata. Eksperimentalno potvrđene pK_a vrednosti podrazumevaju da se vareniklin kao slabija baza lakše redukuje od brimonidina zbog lakše protonacije, te otuda i prisustvo drugog polarografskog talasa kao posledica dodatne redukcije već redukovane forme vareniklina.

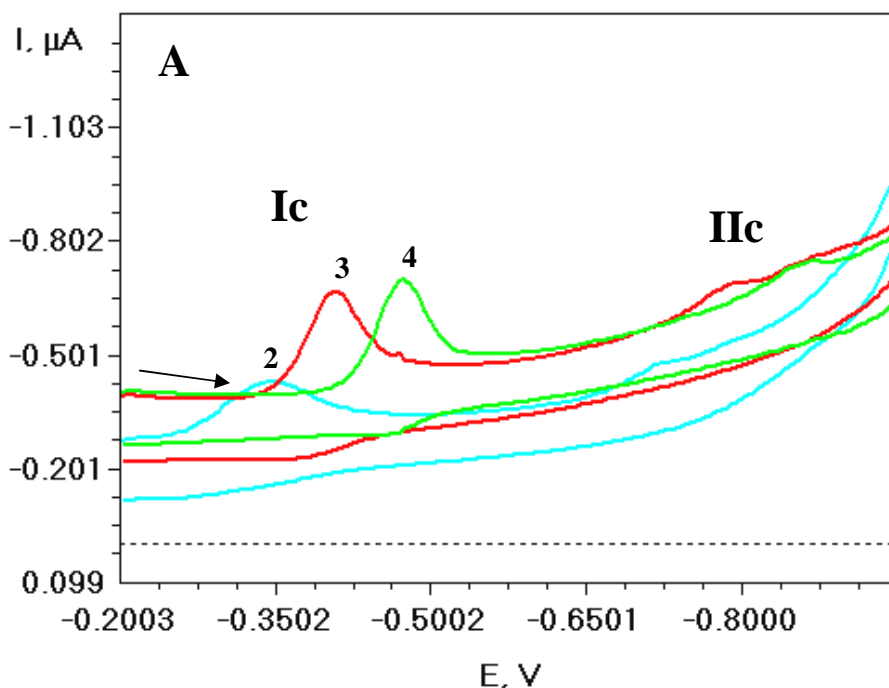
U slučaju kada protonacija elektroaktivne grupe prethodi transferu elektrona, može se javiti promena nagiba $\Delta E_{1/2}/\Delta pH$ pri $pH > pK_a$. Ukoliko prvi linearni segment ima veći nagib od drugog, brzina uspostavljanja kiselinsko-bazne ravnoteže je veća. U slučaju kada prvi linearni segment ima manji nagib u odnosu na drugi, ravnoteža se uspostavlja sporije.⁷³ Kako je VAR jača baza od BRIM, te se očekuje brža i lakša protonacija VAR, na osnovu prethodno izloženog može se zaključiti da se pri $pH > pK_a$

(VAR), sporije uspostavlja kiselinsko-bazna ravnoteža, a kao posledica toga javlja se smanjenje nagiba linearne zavisnosti ($\Delta E_{1/2}/\Delta pH$), što je nasuprot događanju u slučaju BRIM.

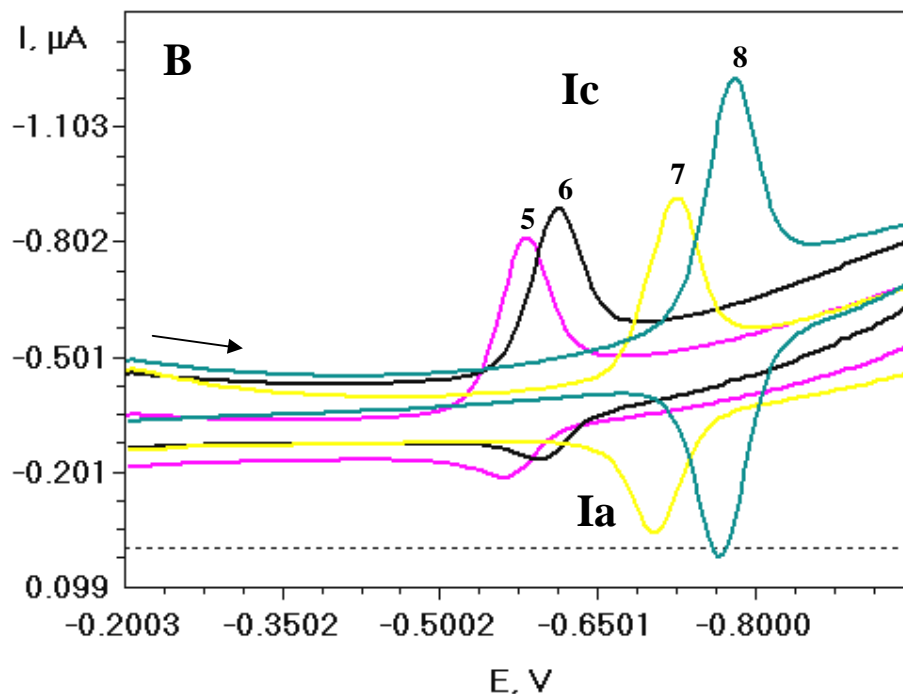
4.1.2. Proučavanje elektrohemijskog ponašanja vareniklina i brimonidina primenom ciklične voltametrije (CV)

4.1.2.1. HMDE

Primenom ciklične voltametrije na elektrodi viseće živine kapi (HMDE) praćena je redukcija $1,0 \cdot 10^{-5}$ M vareniklina u širokoj oblasti pH vrednosti od 2,0 do 12,0 u Briton-Robinsonovom puferu. Ciklovoltamogrami ukazuju na postojanje prvog, glavnog katodnog pika (I_c) u celokupnoj ispitivanoj pH oblasti, koji odgovara prvom polarografskom talasu (I) vareniklina. Samo u kiseljoj sredini javlja se drugi katodni pik (II_c) na negativnijim vrednostima potencijala, koji odgovara drugom polarografskom talasu (II) vareniklina. U povratnom (reverznom) smeru, javlja se anodni ciklovoltametrijski pik (I_a), koji se u baznoj sredini izjednačava sa prvim katodnim pikom po visini (intenzitetu struje pika) i približnom položaju (vrednosti potencijala)



Slika 26A. Reprezentativni ciklovoltamogrami dva katodna pika (I_c , II_c) $1,0 \cdot 10^{-5}$ M vareniklina u BR puferu pri pH vrednostima: (2) 2,0; (3) 3,0; (4) 4,0; i pri brzini promene potencijala $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ na HMDE.

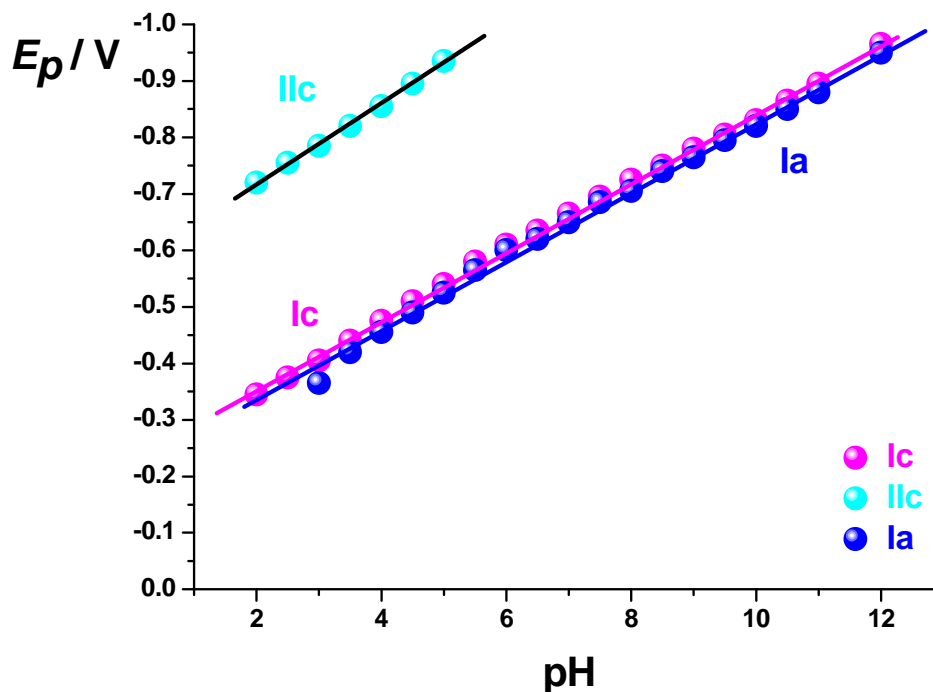


Slika 26B. Reprezentativni voltamogrami prvog katodnog (Ic) i anodnog (Ia) ciklovoltametrijskog pika $1,0 \cdot 10^{-5}$ M vareniklina u BR puferu pri pH vrednostima: (5) 5,5; (6) 6,0; (7) 8,0; (8) 9,0; i pri brzini promene potencijala $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ na HMDE.

pika). Snimanja su izvedena pri različitim brzinama promene potencijala: 20, 50 i 100 mV s^{-1} . Nekoliko reprezentativnih ciklovoltamograma dobijenih pri različitim pH vrednostima i pri brzini polarizacije od 50 mV s^{-1} prikazani su na **Slikama 26A, 26B**.

Promena potencijala ciklovoltametrijskih pikova (Ic, I_{2c} i Ia) vareniklina u zavisnosti od pH vrednosti sredine prikazana je na **Slici 27**. Sa porastom pH, potencijal katodnog pika (Ic) vareniklina pomera se ka negativnijim vrednostima, te je ova linearna zavisnost opisana jednačinom $E_p = -0,061 \cdot \text{pH} - 0,231$ ($R = 0,9991$). Anodni pik (Ia) vareniklina takođe pokazuje linearnu zavisnost promene potencijala pika pomerajući se ka negativnijim vrednostima sa porastom pH, što je opisano sledećom jednačinom: $E_p = -0,062 \cdot \text{pH} - 0,211$ ($R = 0,9976$). Vrednosti potencijala drugog katodnog pika (I_{2c}) takođe su pod uticajem pH vrednosti sredine, tako da je linearna

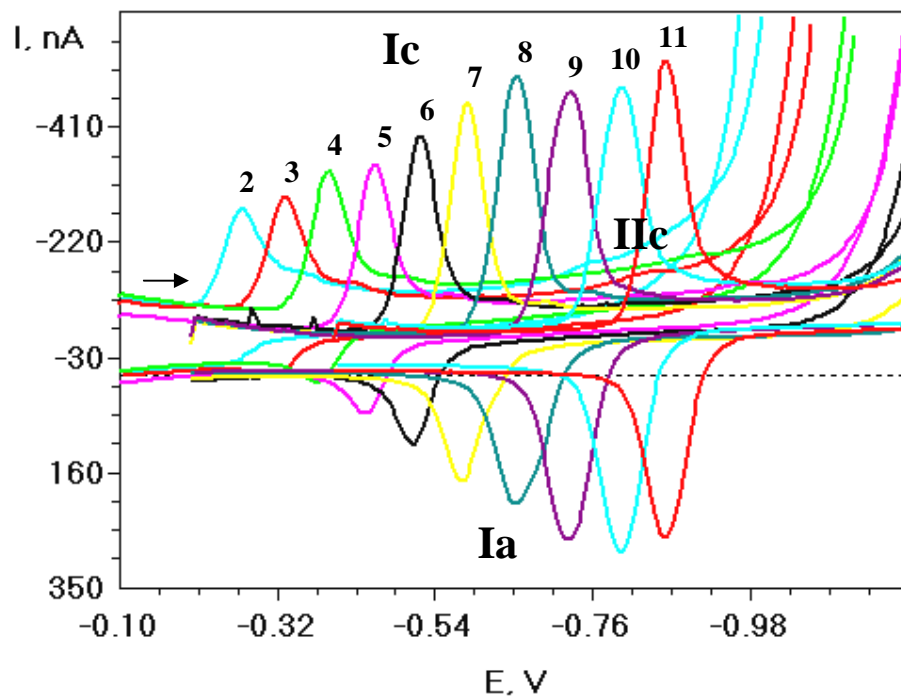
zavisnost i pomeraj potencijala pika ka negativnijim vrednostima sa porastom pH opisana jednačinom: $E_p = -0,071 \cdot pH - 0,574$ ($R = 0,9987$).



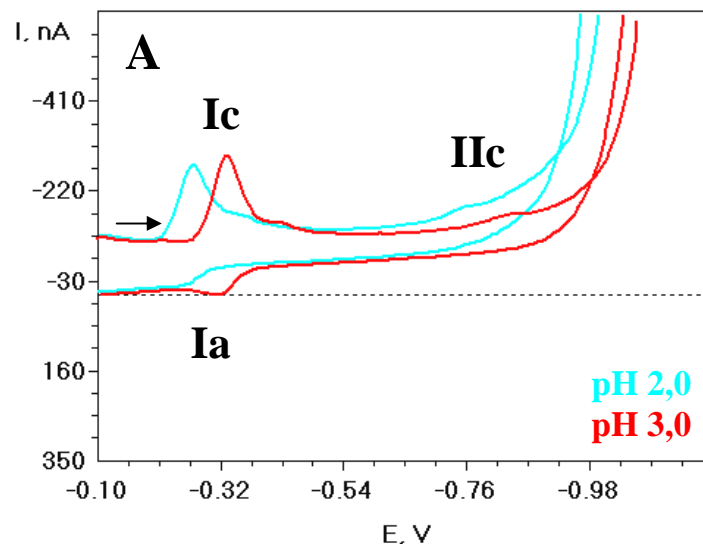
Slika 27. Zavisnost potencijala ciklovoltametrijskog prvog i drugog katodnog (Ic, IIc) i anodnog (Ia) pika $1,0 \cdot 10^{-5}$ M vareniklina od pH pri brzini promene potencijala $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ na HMDE.

Redukcija brimonidina praćena je primenom ciklične voltametrije na elektrodi viseće živine kapi (HMDE) pri koncentraciji $1,0 \cdot 10^{-5}$ M BRIM u Briton-Robinsonovom puferu (pH = 2,0 – 11,0). Na **Slici 28.** predstavljeni su reprezentativni ciklovoltamogrami na različitim pH vrednostima dobijeni pri brzini promene potencijala od 50 mV s^{-1} . Rezultati ukazuju na postojanje glavnog katodnog pika (Ic) u celokupnoj ispitivanoj pH oblasti, koji odgovara prvom polarografskom talasu (I). U kiseljoj sredini na negativnijim vrednostima potencijala javlja se dodatni katodni pik (IIc), koji je bolje uočljiv na voltamogramima prikazanim na **Slici 28A.** (izdvojenim iz **Slike 28.**) i koji odgovara drugom polarografskom talasu (II). U reverznom (povratnom) smeru, prisutan je anodni pik (Ia) koji u baznoj sredini dostiže visinu približno jednaku glavnom

katodnom piku (I_c). Snimanja su izvedena pri različitim brzinama promene potencijala: 5, 10, 20, 40, 50, 80, 100 i 200 mV s^{-1} .

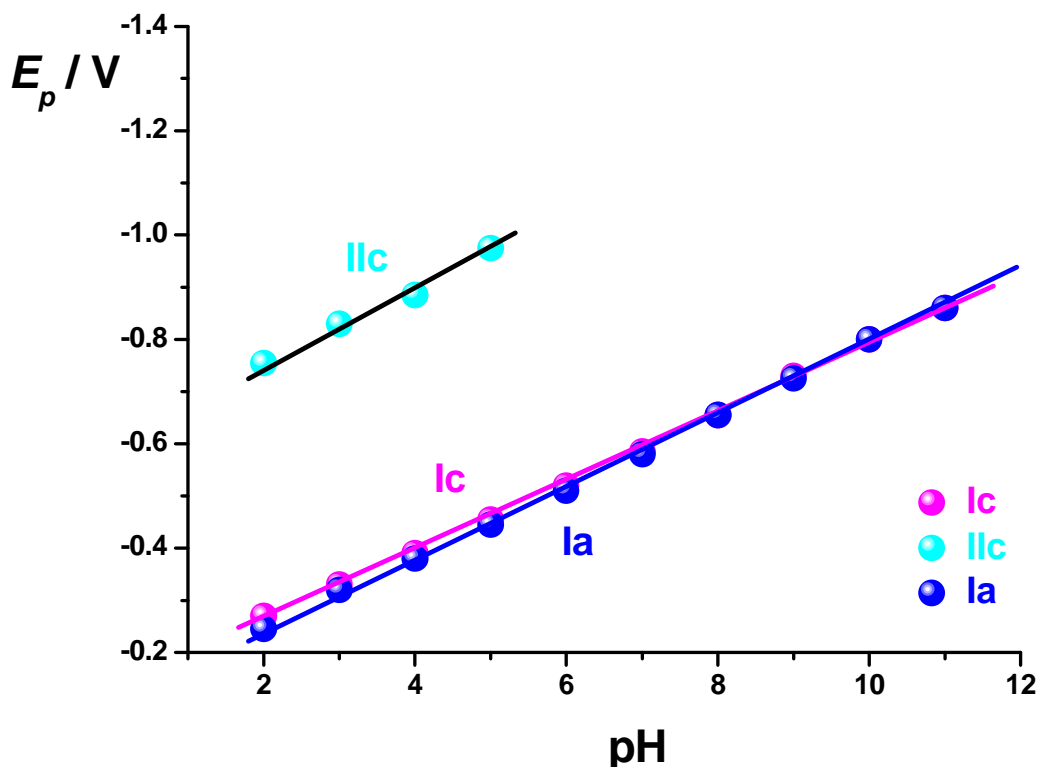


Slika 28. Reprezentativni voltamogrami dva katodna (I_c , II_c) i anodnog (I_a) ciklovoltametrijskog pika $1,0 \cdot 10^{-5}$ M brimonidina u BR puferu pri pH vrednostima: (2) 2,0; (3) 3,0; (4) 4,0; (5) 5,0; (6) 6,0; (7) 7,0; (8) 8,0; (9) 9,0; (10) 10,0 i (11) 11,0; i pri brzini promene potencijala $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ na HMDE.



Slika 28A. Reprezentativni ciklovoltamogrami dva katodna (Ic, IIc) i anodnog (Ia) pika $1,0 \cdot 10^{-5}$ M brimonidina u BR puferu u kiseljoj sredini pri pH = 2,0 i 3,0; i pri brzini promene potencijala $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ na HMDE.

Zavisnost potencijala prvog i drugog katodnog pika (Ic i IIc), kao i anodnog pika (Ia) brimonidina od pH vrednosti sredine prikazana je na **Slici 29**. Uočava se da sa porastom pH dolazi do pomeranja potencijala sva tri ciklovoltametrijska pika ka negativnijim vrednostima. U slučaju prvog katodnog pika (Ic) linearna zavisnost predstavljena je jednačinom: $E_p = -0,066 \cdot pH - 0,128$ ($R = 0,9995$). Anodni pik (Ia) ispoljava takođe linearnu zavisnost potencijala pika od pH, što je prikazano jednačinom: $E_p = -0,069 \cdot pH - 0,106$ ($R = 0,9996$). Drugi katodni pik (IIc), prisutan samo u kiseljoj sredini, takođe ukazuje na linearnu zavisnost E_p od pH , što je opisano jednačinom: $E_p = -0,071 \cdot pH - 0,611$ ($R = 0,9940$).

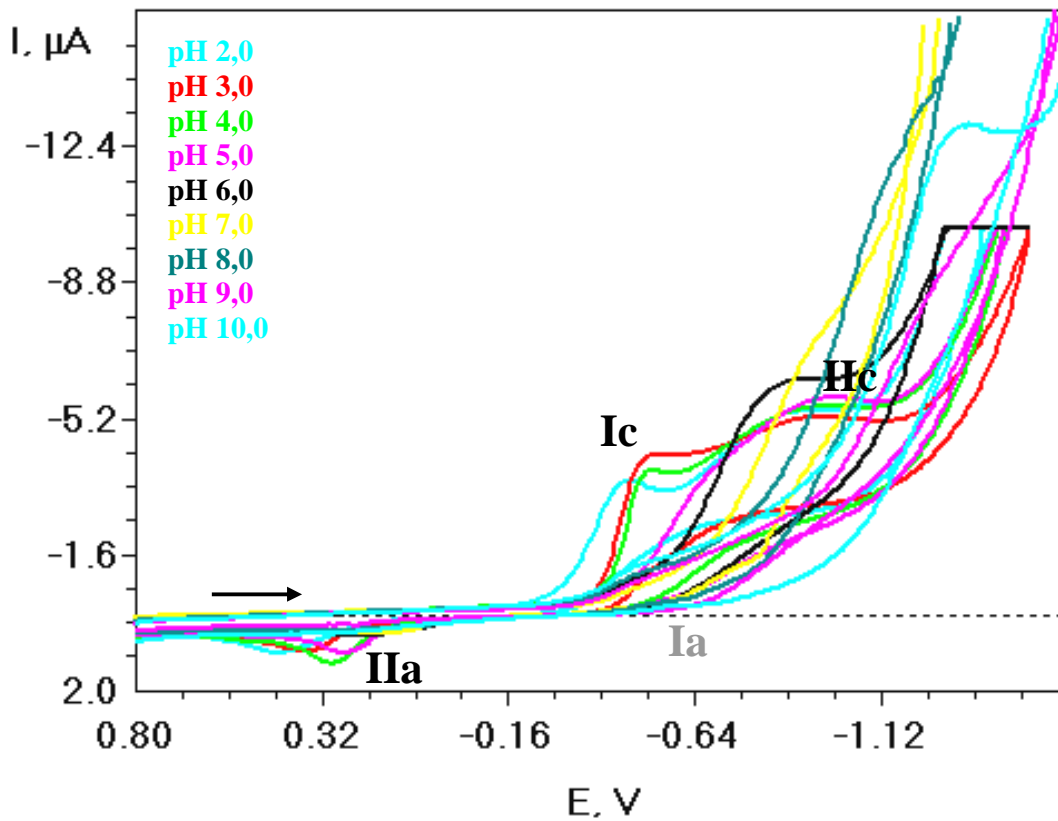


Slika 29. Zavisnost potencijala prvog i drugog katodnog (Ic, IIc) i anodnog (Ia) ciklovoltametrijskog pika $1,0 \cdot 10^{-5}$ M brimonidina od pH pri brzini promene potencijala $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ na HMDE.

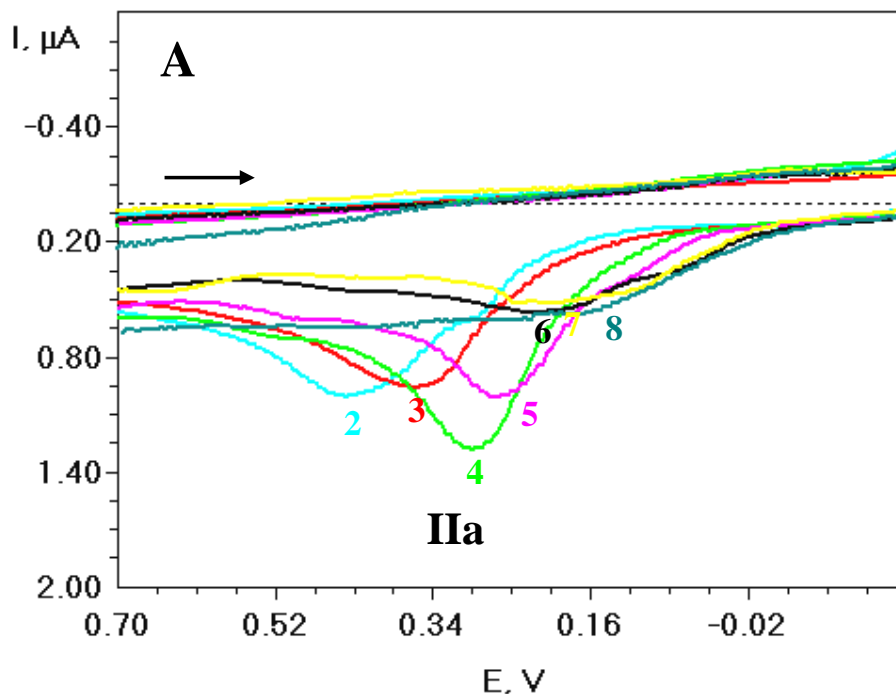
4.1.2.2. BDDE

Elektrohemijsko ponašanje $2,5 \cdot 10^{-4}$ M vareniklina proučavano je primenom ciklične voltametrije u rastvorima 0,5 - 0,005 M H_2SO_4 i Briton-Robinsonovom puferu $\text{pH} = 2,0 - 10,0$. Na datoj **Slici 30.** prikazani su ciklovoltamogrami na određenim pH vrednostima sredine. Uočava se prvi glavni katodni pik (Ic) prisutan u celokupnoj ispitivanoj pH oblasti, sa pomeranjem potencijala pika od -0,35 V do -1,25 V sa porastom pH vrednosti. Njemu odgovarajući anodni pik (Ia) jedva je primetan i slabo izražen samo u uskoj pH oblasti 7,0 - 9,0. Drugi katodni pik (IIc) prisutan je samo u slabo kiseljoj sredini ($\text{pH} = 2,0 - 5,0$). Anodni pik (IIa) prisutan je na svim vrednostima $\text{pH} \leq 8,0$; pri čemu se potencijal pika pomera od 0,25 V do 0,6 V sa porastom pH

vrednosti. Prikazani ciklovoltamogrami dobijeni su pri brzini promene potencijala $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$. Zbog bolje preglednosti, anodni pik (IIa) izdvojen je na **Slici 30A**.



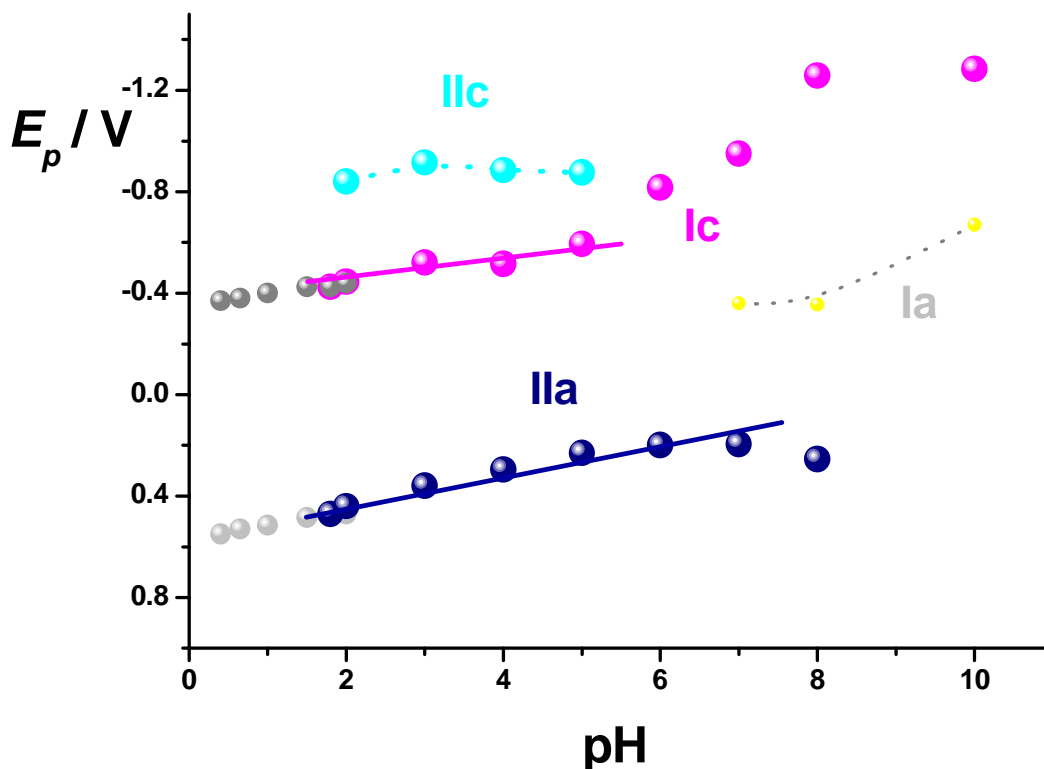
Slika 30. Reprezentativni ciklovoltamogrami dva katodna (Ic, IIc) i anodnog (IIa) pika $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ vareniklina u Briton-Robinsonovom puferu pri pH = 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 i 10,0; i pri brzini polarizacije $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$ na BDDE.



Slika 30A. Reprezentativni ciklovoltamogrami anodnog (IIa) pika $2,5 \cdot 10^{-4}$ M vareniklina u Briton-Robinsonovom puferu pri određenim pH vrednostima: (2) 2,0; (3) 3,0; (4) 4,0; (5) 5,0; (6) 6,0; (7) 7,0; (8) 8,0; i pri brzini polarizacije $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$ na BDDE.

Na **Slici 31.** prikazana je zavisnost potencijala prvog i drugog katodnog (Ic, IIc) kao i prvog i drugog anodnog (Ia, IIa) ciklovoltametrijskog pika od pH vrednosti sredine u širokom rasponu $\text{pH} = 0,1 - 10,0$. U slučaju prvog katodnog pika (Ic) dolazi do pomeranja potencijala pika ka negativnijim vrednostima sa porastom pH, pri čemu su pomeraji veći počev od blago kisele sredine, a naročito izraženi u baznoj sredini. Prisutna linearna zavisnost u kiseljoj sredini predstavljena je jednačinom: $E_p = -0,048 \cdot \text{pH} - 0,349$ ($R = 0,9420$). Nasuprot tome, drugi katodni pik (IIc) pokazuje približno ujednačene vrednosti potencijala pika, odnosno ne ispoljava značajne promene potencijala pika sa promenom pH vrednosti. Kod anodnog pika (IIa) zabeležen je uticaj pH vrednosti sredine, tako da sa porastom pH dolazi do pomeranja potencijala pika ka manje pozitivnim vrednostima, te je linearna zavisnost opisana jednačinom: $E_p = -0,055 \cdot \text{pH} + 0,540$ ($R = 0,9625$). Prvi anodni pik (Ia) jedva je primetan (u baznoj

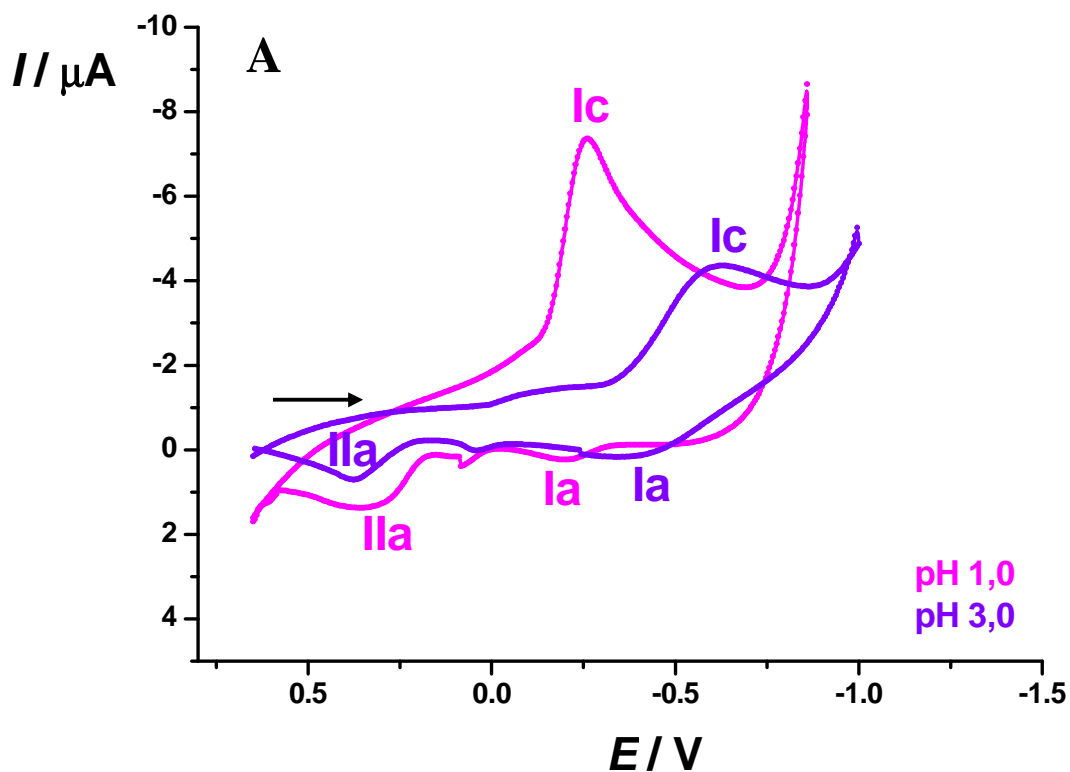
sredini) i potencijal pika pomera se ka negativnijim vrednostima sa porastom pH vrednosti sredine. Potencijali određenih pikova (Ic i IIa) u rastvorima H₂SO₄ takođe su dati na slici, ali nisu dodatno analizirani zbog nemogućnosti poređenja sa ostalim elektrodama.



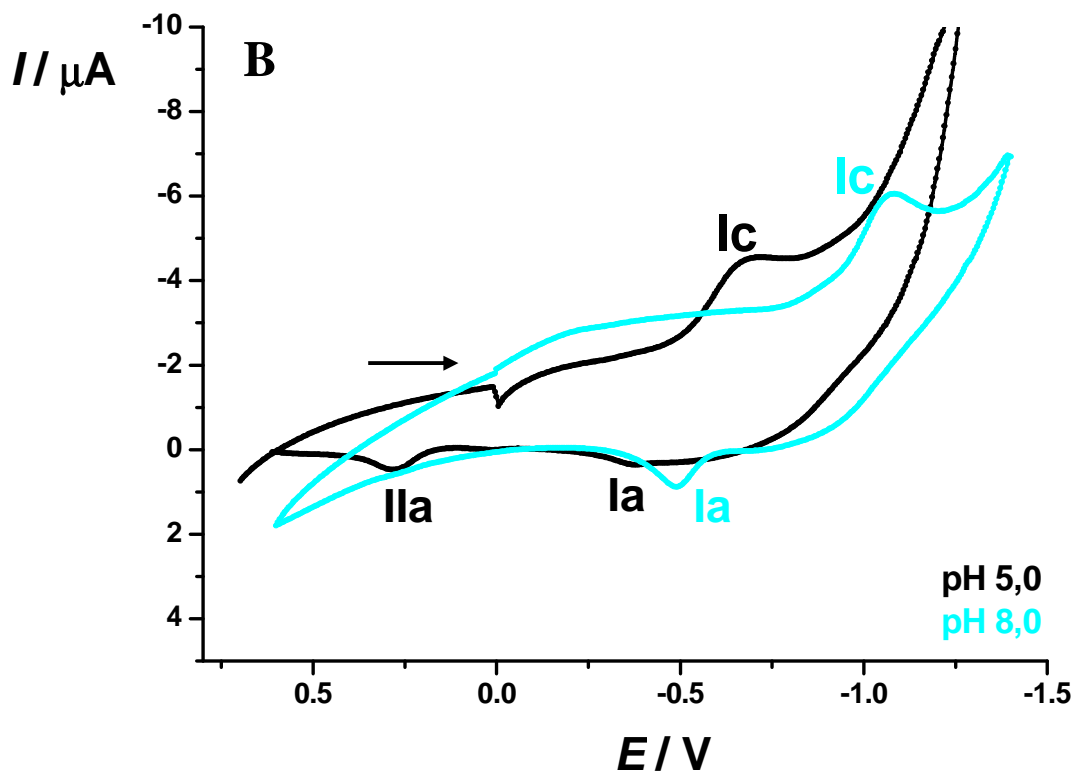
Slika 31. Zavisnost potencijala ciklovoltametrijskih pikova $2,5 \cdot 10^{-4}$ M vareniklina od pH vrednosti pri brzini promene potencijala od 20 mV s^{-1} : prvog katodnog pika (I_c) u (●) $0,5 \text{ M} - 0,005 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ odnosno u (●) BR puferu; drugog katodnog pika (II_c) u (●) BR puferu; prvog anodnog pika (I_a) u (●) BR puferu; drugog anodnog pika (II_a) u (●) $0,5 \text{ M} - 0,005 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ odnosno u (●) BR puferu.

Cikličnom voltametrijom proučavano je elektrohemijsko ponašanje $2,5 \cdot 10^{-4}$ M brimonidina u rastvoru H₂SO₄ (pH = 0,6 – 1,6) i Briton-Robinsonovom puferu (pH = 2,0 – 9,0) u oblasti potencijala od -1,4 V do +0,7 V. Reprezentativni ciklovoltamogrami

na izabranim pH vrednostima (1,0; 3,0; 5,0 i 8,0) prikazani su na **Slikama 32A, 32B**. na kojima se uočava jedan dobro izražen katodni pik (Ic) i dva slabo izražena anodna pika (Ia i IIa). Katodni pik (Ic) prisutan je u celokupnoj ispitivanoj pH oblasti, dok je anodni pik (IIa) zabeležen samo u oblasti $\text{pH} \leq 5,0$. Prvi anodni pik (Ia) jedva je primetan u kiseljoj sredini, a jasno uočljiv postaje u pH oblasti 7,0 – 9,0. Takođe, uočava se pomeranje katodnog pika (Ic) i njemu odgovarajućeg anodnog pika (Ia) sa promenom pH, za razliku od anodnog pika (IIa) kod koga je pomeranje značajno manje.



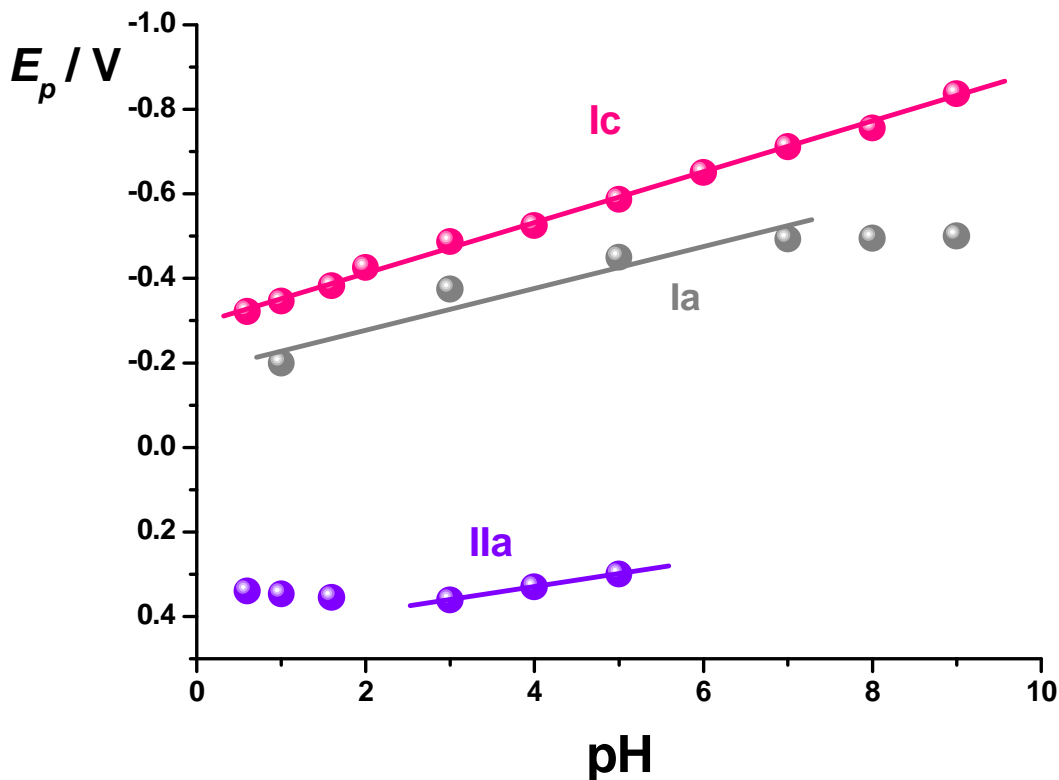
Slika 32A. Reprezentativni ciklovoltamogrami katodnog (Ic) i prvog odnosno drugog anodnog (Ia, IIa) pika $2,5 \cdot 10^{-4}$ M brimonidina na izabranim $\text{pH} = 1,0$ i $3,0$; i pri brzini promene potencijala $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$ na BDDE.



Slika 32B. Reprezentativni ciklovoltamogrami katodnog (I_c) i prvog odnosno drugog anodnog (I_a , II_a) pika $2,5 \cdot 10^{-4}$ M brimonidina na izabranim $\text{pH} = 5,0$ i $8,0$; i pri brzini promene potencijala $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$ na BDDE.

Na **Slici 33.** prikazana je zavisnost potencijala ciklovoltametrijskog pika brimonidina od pH vrednosti sredine. Kod katodnog pika (I_c) jasno se uočava linearna zavisnost E_p od pH koja ukazuje na pomeranje potencijala pika ka negativnijim vrednostima sa porastom pH , što se može opisati jednačinom: $E_p = -0,060 \cdot \text{pH} - 0,292$ ($R = 0,9984$). Kod anodnog pika (II_a) zapaža se neznatno pomeranje potencijala pika u jako kiseljoj sredini, dok u blago kiseljoj sredini sa porastom pH vrednosti dolazi do izvesnog pomeranja potencijala pika ka manje pozitivnim vrednostima što je opisano jednačinom: $E_p = -0,030 \cdot \text{pH} - 0,452$ ($R = 0,9999$). Anodni pik (I_a) jedva je primetan u kiseljoj sredini, zatim beleži linearno pomeranje ka negativnijim vrednostima potencijala sa porastom pH što je prikazano jednačinom: $E_p = -0,052 \cdot \text{pH} - 0,209$ ($R =$

0,8472), dok u baznoj sredini pokazuje konstantnost u pogledu svog položaja uprkos promeni pH vrednosti sredine.

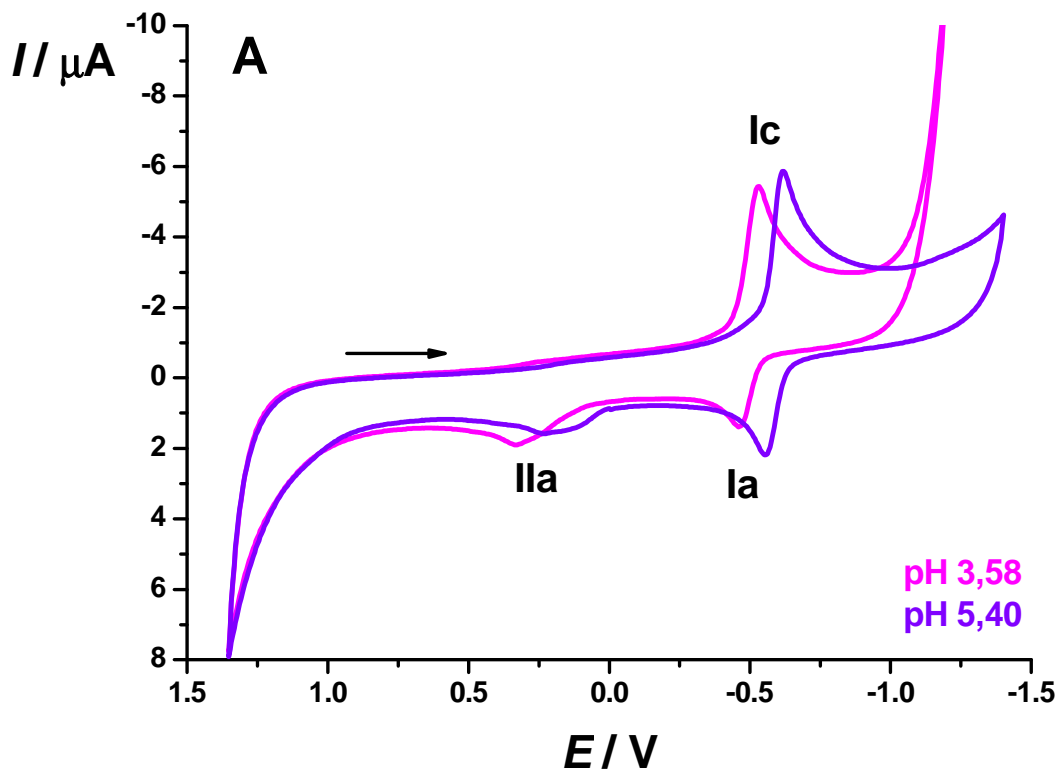


Slika 33. Zavisnost potencijala katodnog (Ic) i prvog odnosno drugog anodnog pika (Ia, IIa) ciklovoltametrijskog pika $2,5 \cdot 10^{-4}$ M brimonidina pri brzini promene potencijala $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$ na BDDE.

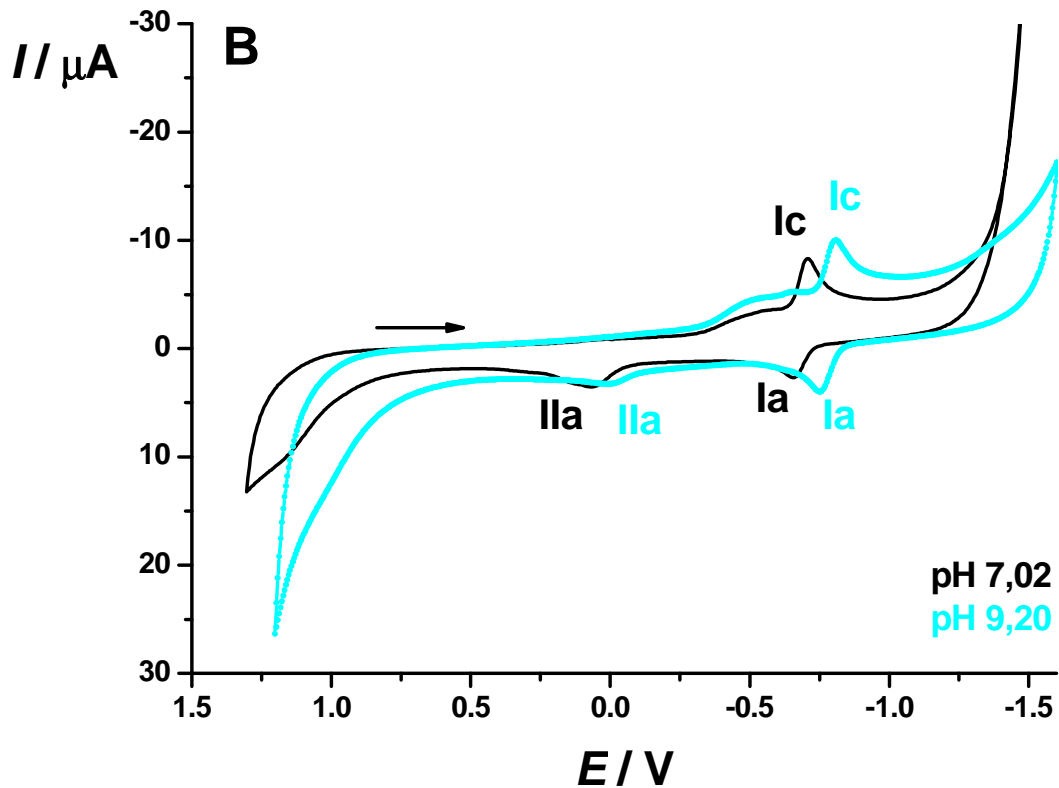
4.1.2.3. GCE

Elektrohemijsko ponašanje $1,0 \cdot 10^{-4}$ M vareniklina proučavano je u pH oblasti 2,15 - 9,2; primenom ciklične voltametrije na elektrodi od staklastog ugljenika (GCE). Odgovarajuće pH vrednosti dobijene su upotrebom sledećih osnovnih elektrolita: HCl/KCl pH = 2,15; $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ pH = 3,58; 4,60 i 5,40; $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH = 6,20; 7,02 i 8,05; $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ pH = 9,2. Na **Slikama 34A, 34B.** prikazani su reprezentativni ciklovoltamogrami vareniklina, koji ukazuju na prisustvo jednog katodnog pika (Ic) u direktnom smeru i prvog odnosno drugog

anodnog pika (Ia, IIa) u reverznom (povratnom) smeru u celokupnoj ispitivanoj pH oblasti pri brzini promene potencijala $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

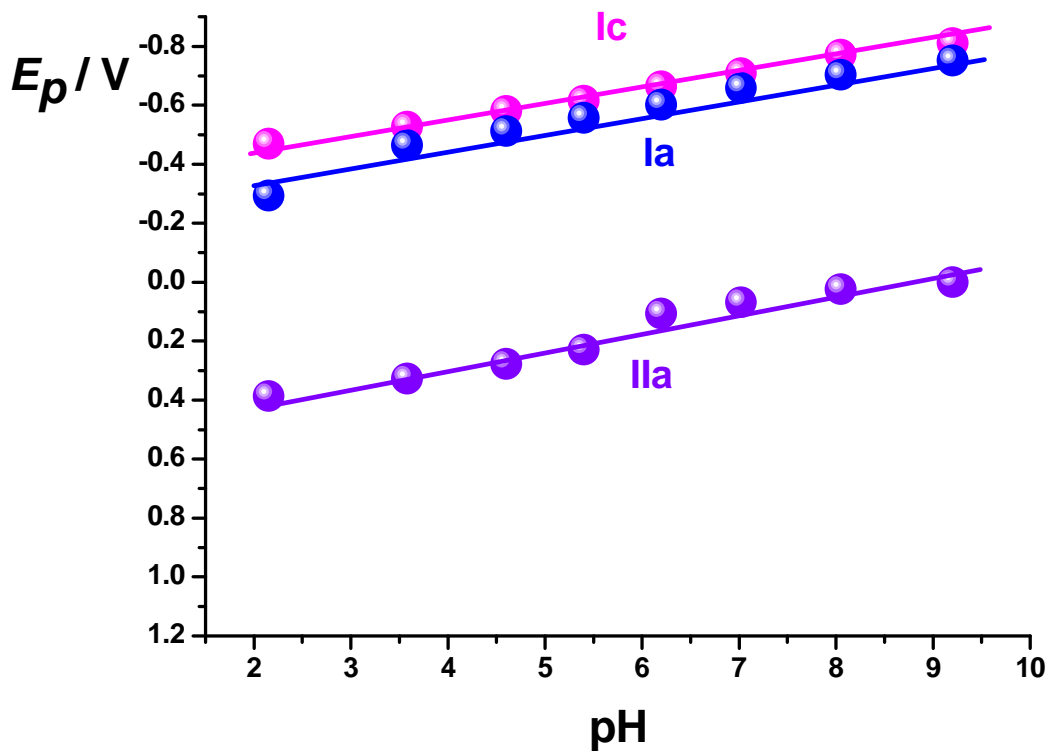


Slika 34A. Reprezentativni ciklovoltamogrami katodnog (Ic) i prvog odnosno drugog anodnog (Ia, IIa) pika $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ vareniklina na izabranim pH = 3,58 i 5,40; i pri brzini promene potencijala $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.



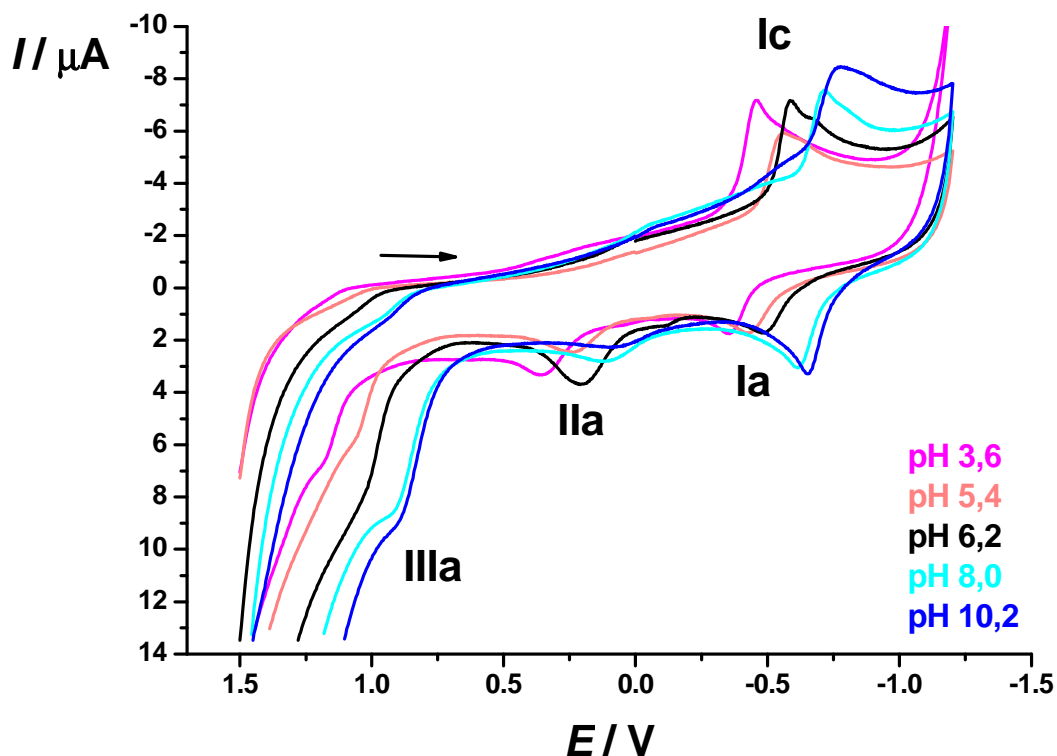
Slika 34B. Reprezentativni ciklovoltamogrami katodnog (Ic) i prvog odnosno drugog anodnog (Ia, IIa) pika $1,0 \cdot 10^{-4}$ M vareniklina na izabranim pH = 7,02 i 9,20; i pri brzini promene potencijala $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Uticaj pH vrednosti sredine na potencijal katodnog (Ic), prvog i drugog anodnog (Ia, IIa) ciklovoltometrijskog pika prikazan je na **Slici 35**. Linearna zavisnost katodnog pika (Ic) ukazuje na pomeranje potencijala pika ka negativnijim vrednostima sa porastom pH, što je opisano jednačinom: $E_{p, Ic} = -0,052 \cdot pH - 0,340$ ($R = 0,9976$). Veoma slično događanje zabeleženo je i kod prvog anodnog pika (Ia), te je dobijena prava linearne zavisnosti istog nagiba: $E_{p, Ia} = -0,053 \cdot pH - 0,274$ ($R = 0,9972$). Pomeranje potencijala drugog anodnog pika (IIa) ka manje pozitivnim vrednostima dato je jednačinom: $E_{p, IIa} = -0,061 \cdot pH + 0,533$ ($R = 0,9750$), što ukazuje na olakšanu oksidaciju u baznoj u odnosu na kiselu sredinu.



Slika 35. Zavisnost potencijala katodnog (Ic) i prvog odnosno drugog anodnog (Ia, IIa) ciklovoltametrijskog pika $1,0 \cdot 10^{-4}$ M vareniklina pri brzini promene potencijala $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

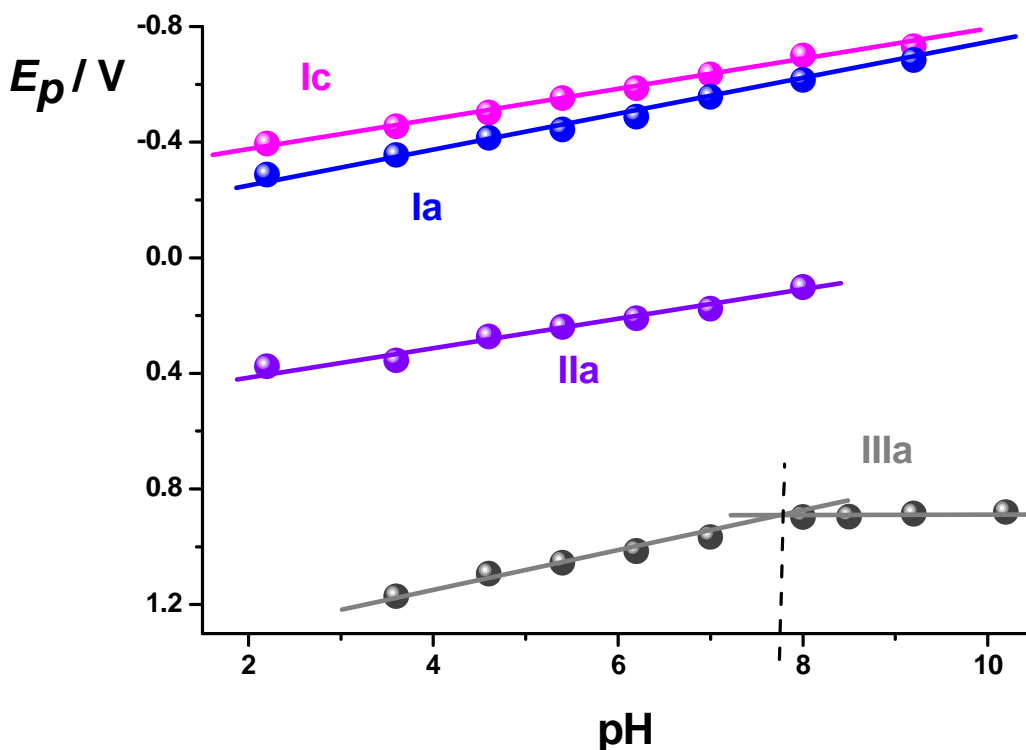
Elektrohemijsko ponašanje $1,0 \cdot 10^{-4}$ M brimonidina primenom ciklične voltametrije na elektrodi od staklastog ugljenika (GCE) proučavano je u pH oblasti od 2,2 do 10,2. Odgovarajuće pH vrednosti obezbeđene su upotrebom sledećih osnovnih elektrolita: HCl/KCl pH = 2,2; CH₃COOH/CH₃COONa pH = 3,6 i 5,4; NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH = 6,0; 7,0 i 8,0; NH₃/NH₄Cl pH = 8,5; 9,2 i 10,2. Na **Slici 36** prikazani su reprezentativni ciklovoltamogrami brimonidina pri brzini promene potencijala $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$, koji ukazuju na prisustvo jednog katodnog pika (Ic) u direktnom smeru i prvog, drugog i trećeg anodnog pika (Ia, IIa, IIIa) u reverznom (povratnom) smeru u celokupnoj ispitivanoj pH oblasti.



Slika 36. Reprezentativni ciklovoltamogrami $1,0 \cdot 10^{-4}$ M brimonidina pri odabranim pH vrednostima (acetatni pufer pH = 3,6 i 5,4; fosfatni pufer pH = 6,2 i 8,0; amonijačni pufer pH = 10,2) i pri brzini promene potencijala $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; granične vrednosti potencijala -1,2 V i +1,6 V.

Na **Slici 37.** prikazan je uticaj pH vrednosti sredine na potencijal katodnog (Ic), prvog, drugog i trećeg anodnog (Ia, IIa, IIIa) ciklovoltametrijskog pika brimonidina. Kod svih pikova uočavaju se linearne zavisnosti E_p od pH . U slučaju katodnog pika (Ic), linearna zavisnost predstavljena je jednačinom: $E_{p,Ic} = -0,057 \text{ V} \cdot pH - 0,232 \text{ V}$ ($R = 0,9983$) koja ukazuje da sa porastom pH vrednosti dolazi do pomeranja potencijala pika ka negativnijim vrednostima. Prvi anodni pik (Ia) takođe beleži pomeranje potencijala pika ka negativnijim vrednostima potencijala, što je opisano jednačinom: $E_{p,Ia} = -0,061 \text{ V} \cdot pH - 0,133 \text{ V}$ ($R = 0,9945$). Sa porastom pH vrednosti sredine dolazi do pomeranja potencijala drugog anodnog pika (IIa) ka manje pozitivnim vrednostima, što ukazuje na olakšanu oksidaciju u neutralnoj i slabo baznoj sredini u odnosu na kiselu sredinu.

Opisana zavisnost predstavljena je jednačinom: $E_{p,IIa} = -0,053 \text{ V} \cdot \text{pH} + 0,534 \text{ V}$ ($R = 0,9869$). Kod trećeg anodnog pika (IIIa) prisutna su dva linearna segmenta sa tačkom preseka na $\text{pH} \sim 7,8$; pri čemu je prvi segment određenog nagiba opisan jednačinom: $E_{p,IIIa} = -0,059 \text{ V} \cdot \text{pH} + 1,379 \text{ V}$ ($R = 0,9874$), dok je drugi segment paralelan sa apscisom (pH – osom) što ukazuje da u oblasti $\text{pH} > 8,0$ nema uticaja stepena baznosti sredine na položaj pika.

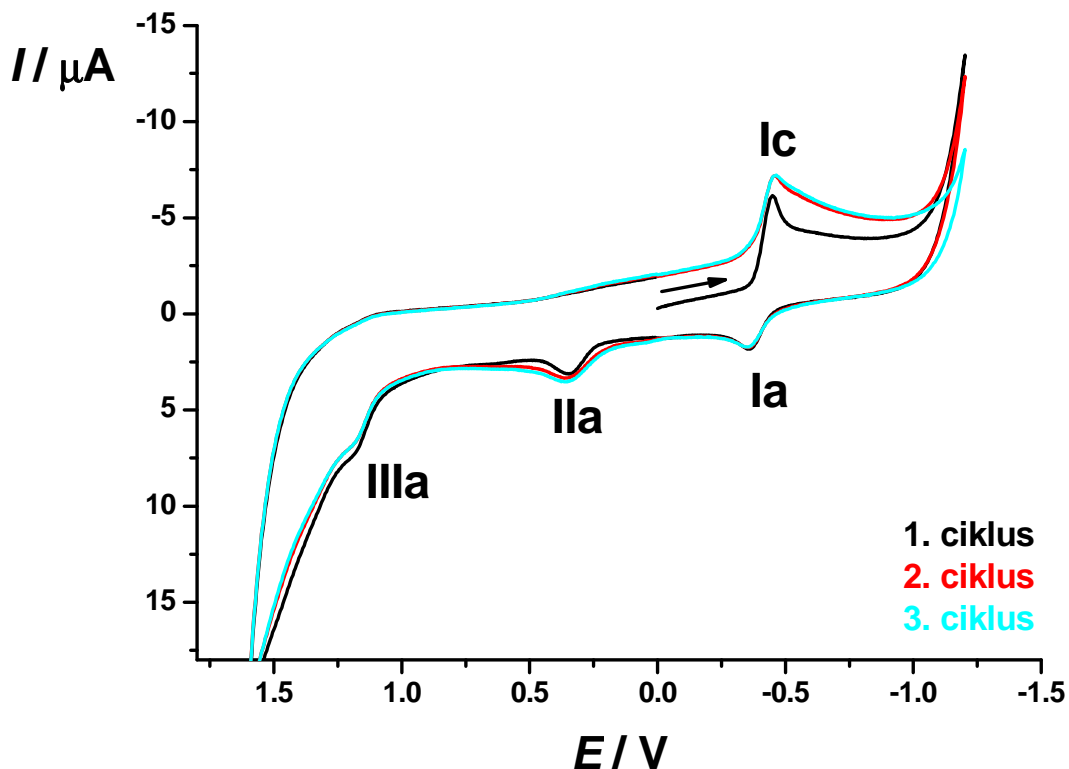


Slika 37. Zavisnost potencijala katodnog (Ic), prvog, drugog i trećeg anodnog (Ia, IIa, IIIa) ciklovoltametrijskog pika $1,0 \cdot 10^{-4}$ M brimonidina pri brzini promene potencijala $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$ na GCE.

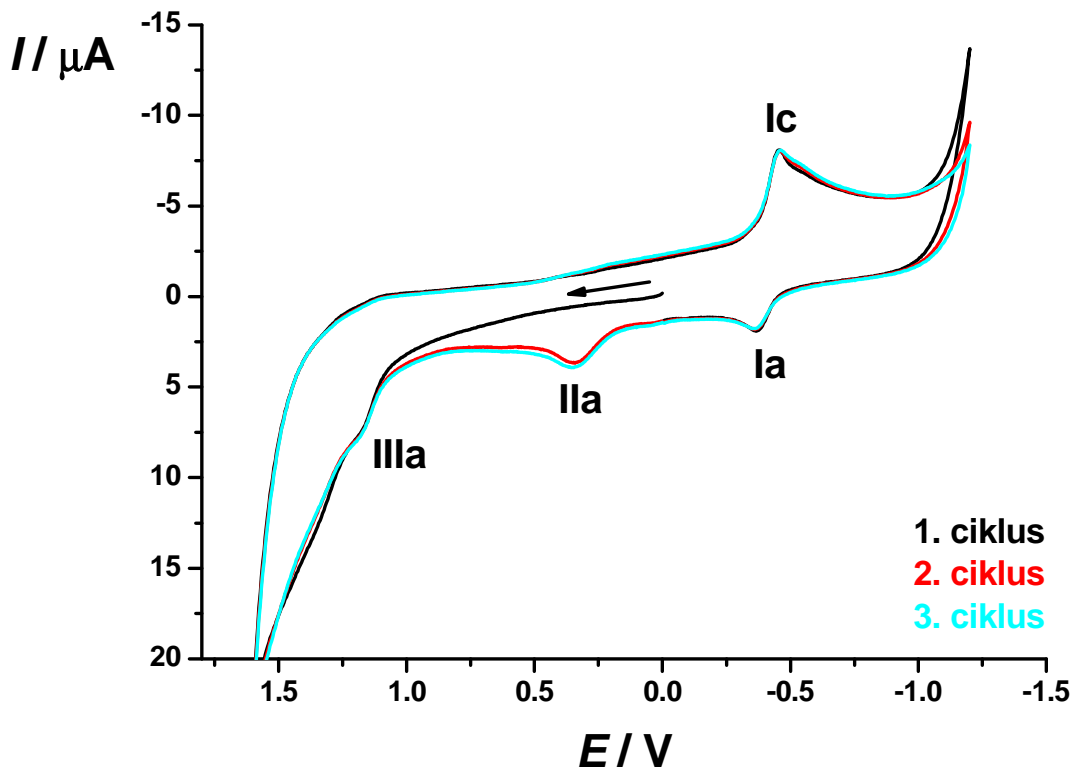
Dodatna ispitivanja voltametrijskog ponašanja brimonidina na GCE vršena su sukcesivnim cikliziranjem uz promenu smera potencijala.

Na **Slikama 38, 39**, predstavljeni su ciklovoltamogrami $1,0 \cdot 10^{-4}$ M brimonidina u tri sukcesivna ciklusa sa početnim potencijalom 0,0 V na izabranoj $\text{pH} = 3,6$ u acetatnom puferu. Na **Slici 38**, početni smer promene potencijala je ka negativnoj

graničnoj vrednosti od -1,2 V; dok je na **Slici 39.** dat prikaz ciklovoltamograma sa početnim smerom ka pozitivnoj graničnoj vrednosti potencijala od +1,6 V. Poređenjem događaja na datim slikama uočava se sledeće: krećući se najpre do negativne granične vrednosti potencijala, prisutni su jedan katodni pik (Ic) i tri anodna pika (Ia, IIa i IIIa) tokom sva tri ciklusa (**Slika 38.**); dok prilikom promene potencijala najpre prema pozitivnoj graničnoj vrednosti u prvom ciklusu izostaje drugi anodni pik (IIa), a ostali pikovi (Ic, Ia, IIIa) su prisutni. U drugom i trećem ciklusu prisutna su tri anodna pika (Ia, IIa, IIIa) i jedan katodni pik (Ic) (**Slika 39.**). Izostanak drugog anodnog pika (IIa) u prvom ciklusu počev od 0,0 V ka pozitivnoj graničnoj vrednosti potencijala ukazuje na odsustvo elektroaktivne vrste koja bi se mogla oksidovati. Nasuprot tome, kada je početni smer potencijala od 0,0 V ka negativnoj graničnoj vrednosti, prisutan je drugi anodni pik (IIa) za koji se može pretpostaviti da je posledica oksidacije prethodno nastalog redukovanog oblika elektroaktivne vrste.

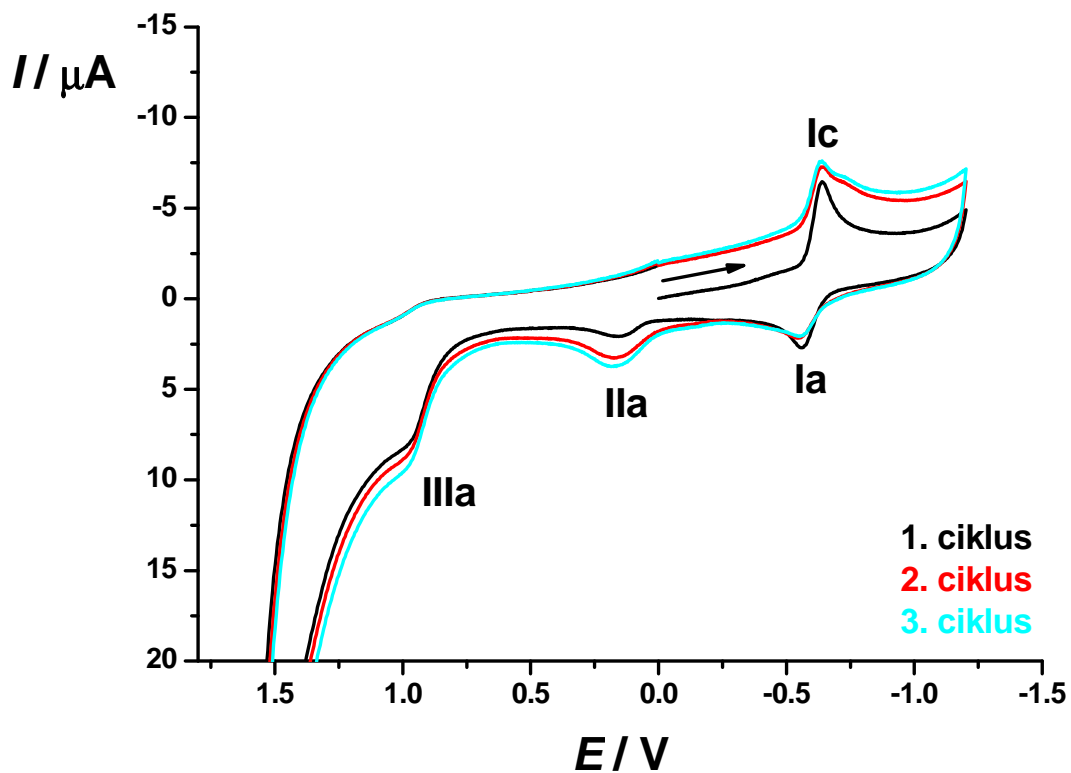


Slika 38. Ciklovoltamogrami $1,0 \cdot 10^{-4}$ M brimonidina u acetatnom puferu pH = 3,6 pri brzini promene potencijala $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$; početni potencijal 0,0 V; negativni granični potencijal -1,2 V i pozitivni granični potencijal +1,6 V.



Slika 39. Ciklovoltamogrami $1,0 \cdot 10^{-4}$ M brimonidina u acetatnom puferu pH = 3,6 pri brzini promene potencijala $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$; početni potencijal 0,0 V; pozitivni granični potencijal +1,6 V i negativni granični potencijal -1,2 V.

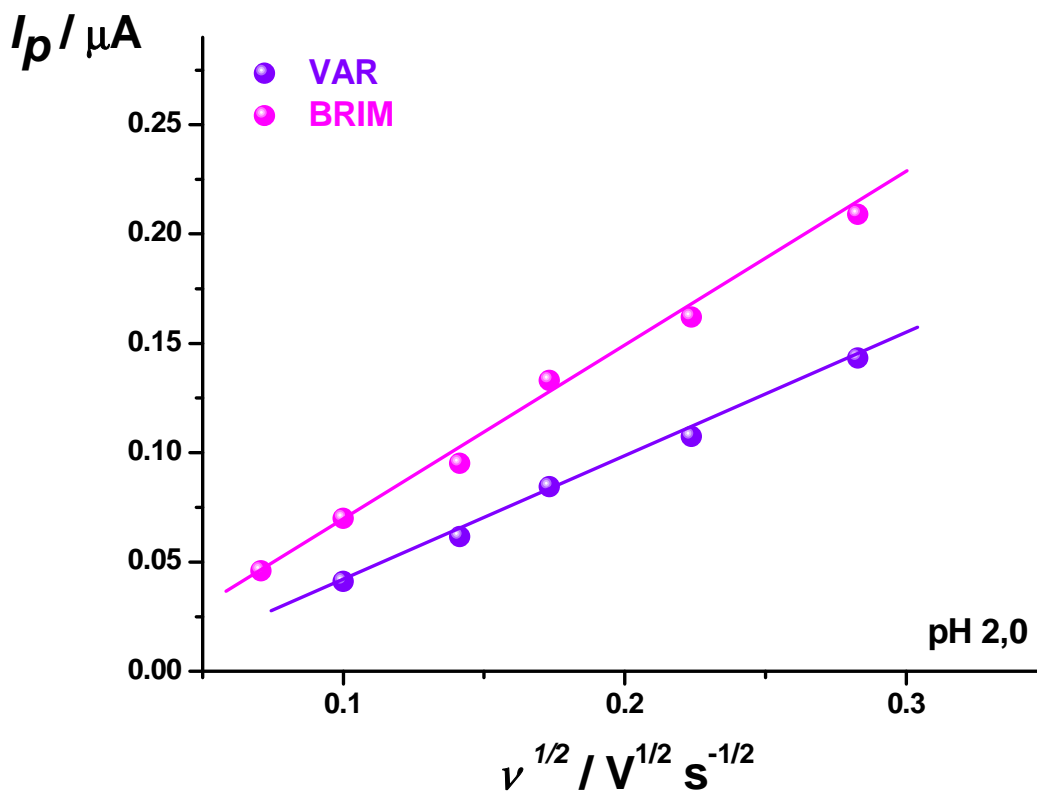
Elektrohemijsko ponašanje brimonidina proučavano je i u fosfatnom puferu pH = 7,0 (**Slika 40.**) pod istim uslovima kao na **Slici 38.**, gde se na prikazanim ciklovoltamogramima javljaju takođe jedan katodni pik (Ic) i tri anodna pika (Ia, IIa, IIIa) tokom sva tri ciklusa. Za razliku od događanja u kiseljoj sredini gde je intenzitet struje katodnog pika (Ic) značajno veći od odgovarajućeg (prvog) anodnog pika (Ia), zapaža se izjednačavanje visina prvog anodnog (Ia) i katodnog pika (Ic). Takođe, primetan je porast visine drugog anodnog pika (IIa) tokom drugog i trećeg ciklusa u odnosu na prvi ciklus, na osnovu čega se može pretpostaviti da je tokom ova dva ciklusa prisutnija veća količina redukovane forme brimonidina podložne oksidaciji u odnosu na raspoloživu količinu tokom prvog ciklusa.



Slika 40. Ciklovoltamogrami $1,0 \cdot 10^{-4}$ M brimonidina u fosfatnom puferu pH = 7,0 pri brzini promene potencijala $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$; početni potencijal 0,0 V; pozitivni granični potencijal +1,6 V i negativni granični potencijal -1,2 V.

4.1.2.4. Uticaj brzine promene potencijala na intenzitet struje ciklovoltametrijskih pikova

Na svakoj od ispitivanih pH vrednosti snimani su ciklovoltamogrami vareniklina i brimonidina pri različitim brzinama promene potencijala, $v = 5 - 100 \text{ mV s}^{-1}$. Na **Slici 41.** prikazane su reprezentativne pravolinijske zavisnosti $I_p = f(v^{1/2})$ za katodni pik (I_c) vareniklina i brimonidina pri $\text{pH} = 2,0$. Linearna zavisnost intenziteta struje ciklovoltametrijskog katodnog pika (I_c) od kvadratnog korena brzine promene potencijala, dobijena je u kiseljoj sredini na HMDE i BDDE, što je predstavljeno u **Tabeli 4.**



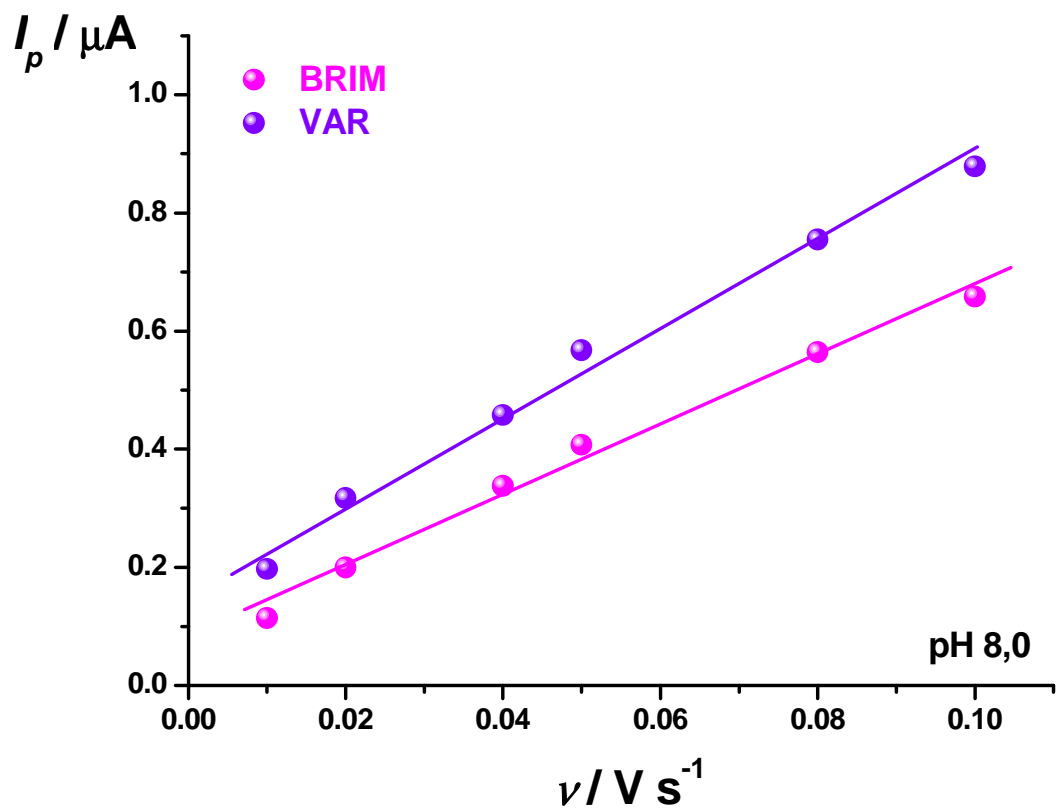
Slika 41. Linearna zavisnost struje ciklovoltametrijskog katodnog pika (I_c) vareniklina i brimonidina od kvadratnog korena promene brzine polarizacije pri $\text{pH} = 2,0$ na HMDE.

Tabela 4. Zavisnost $I_p = f(v^{1/2})$ na odabranim pH vrednostima dobijena ciklovoltometrijskom analizom VAR i BRIM primenom HMDE/BDDE/GCE.

| <i>Lek</i> | <i>pH</i> | <i>Elektroda</i> | <i>Jednačina prave</i> | <i>R</i> | |
|------------|-----------|------------------|---|--|-------|
| VAR | 2,0 | HMDE | $I_p(\mu\text{A}) = 0,593 v^{1/2} (\text{V}^{1/2} \text{s}^{-1/2}) - 0,007$ | 0,996 | |
| | | BDDE | $I_p(\mu\text{A}) = 5,902 v^{1/2} (\text{V}^{1/2} \text{s}^{-1/2}) + 0,766$ | 0,991 | |
| | | GCE | <i>nelinearno</i> | / | |
| | 4,0 | HMDE | $I_p(\mu\text{A}) = 1,271 v^{1/2} (\text{V}^{1/2} \text{s}^{-1/2}) - 0,024$ | 0,992 | |
| | | BDDE | $I_p(\mu\text{A}) = 9,066 v^{1/2} (\text{V}^{1/2} \text{s}^{-1/2}) - 1,103$ | 0,999 | |
| | | GCE | <i>nelinearno</i> | / | |
| | 8,0 | HMDE | <i>nelinearno</i> | / | |
| | | BDDE | | | |
| | | GCE | | | |
| BRIM | 2,0 | HMDE | $I_p (\mu\text{A}) = 0,8473 v^{1/2} (\text{V}^{1/2} \text{s}^{-1/2}) - 0,023$ | 0,995 | |
| | | 3,0 | BDDE | $I_p (\mu\text{A}) = 4,470 v^{1/2} (\text{V}^{1/2} \text{s}^{-1/2}) + 0,090$ | 0,999 |
| | | | GCE | <i>nelinearno</i> | / |
| | 4,0 | HMDE | $I_p (\mu\text{A}) = 3,871 v^{1/2} (\text{V}^{1/2} \text{s}^{-1/2}) + 0,765$ | 0,989 | |
| | | BDDE | $I_p (\mu\text{A}) = 1,359 v^{1/2} (\text{V}^{1/2} \text{s}^{-1/2}) - 0,069$ | 0,995 | |
| | | GCE | <i>nelinearno</i> | / | |
| | 8,0 | HMDE | <i>nelinearno</i> | / | |
| | | BDDE | | | |
| | | GCE | | | |

R - koeficijent korelacije

Na **Slici 42.** date su reprezentativne pravolinijske zavisnosti intenziteta struje ciklovoltometrijskog katodnog pika (I_c) vareniklina i brimonidina od brzine promene potencijala, $I_p = f(v)$, dobijene na HMDE i GCE pri pH = 8,0. Uočava se da sa porastom brzine promene potencijala raste i intenzitet struje pika, što je opisano odgovarajućim jednačinama pravca datim u **Tabeli 5.**



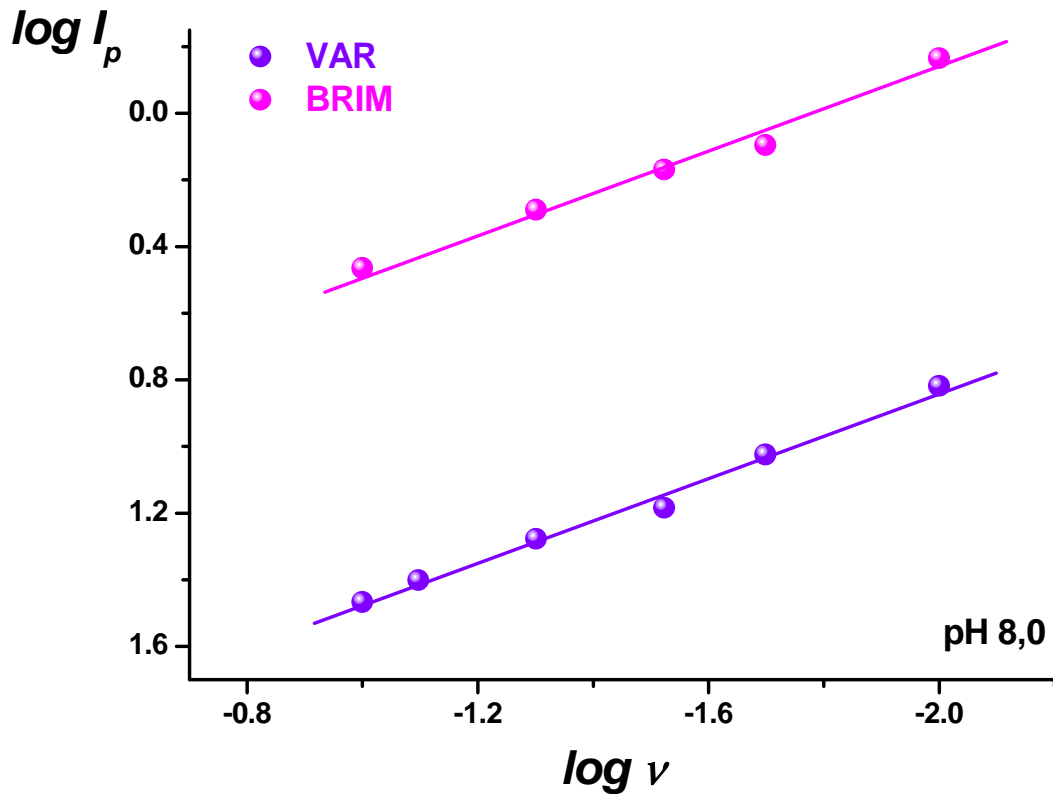
Slika 42. Linearna zavisnost intenziteta struje ciklovoltometrijskog katodnog pika (I_c) vareniklina i brimonidina od promene brzine polarizacije pri $\text{pH} = 8,0$ na HMDE.

Tabela 5. Zavisnosti $I_p = f(v)$ na odabranim pH vrednostima dobijene ciklovoltametrijskom analizom VAR i BRIM i primenom HMDE/GCE/BDDE.

| <i>Lek</i> | <i>pH</i> | <i>Elektroda</i> | <i>Jednačina prave</i> | <i>R</i> |
|------------|-----------|------------------|---|----------|
| VAR | 2,0 | HMDE | <i>nelinearno</i> | / |
| | | GCE | $I_p(\mu\text{A}) = 284,4 v (\text{V s}^{-1}) - 4,682$ | 0,999 |
| | | BDDE | <i>nelinearno</i> | / |
| | 4,0 | HMDE | <i>nelinearno</i> | / |
| | | GCE | $I_p(\mu\text{A}) = 233,0 v (\text{V s}^{-1}) + 6,905$ | 0,994 |
| | | BDDE | <i>nelinearno</i> | / |
| | 8,0 | HMDE | $I_p(\mu\text{A}) = 7,218 v (\text{V s}^{-1}) + 0,0143$ | 0,997 |
| | | GCE | $I_p(\mu\text{A}) = 248,1 v (\text{V s}^{-1}) + 5,207$ | 0,993 |
| | | BDDE | <i>nelinearno</i> | |
| BRIM | 2,0 | HMDE | $I_p(\mu\text{A}) = 2,002 v (\text{V s}^{-1}) + 0,049$ | 0,992 |
| | | GCE | $I_p(\mu\text{A}) = 30,200 v (\text{V s}^{-1}) - 0,283$ | 0,999 |
| | | BDDE | <i>nelinearno</i> | / |
| | 4,0 | HMDE | $I_p(\mu\text{A}) = 3,225 v (\text{V s}^{-1}) + 0,047$ | 0,995 |
| | | GCE | $I_p(\mu\text{A}) = 9,205 v (\text{V s}^{-1}) - 0,399$ | 0,905 |
| | | BDDE | <i>nelinearno</i> | / |
| | 8,0 | HMDE | $I_p(\mu\text{A}) = 5,980 v (\text{V s}^{-1}) + 0,081$ | 0,994 |
| | | GCE | $I_p(\mu\text{A}) = 21,349 v (\text{V s}^{-1}) + 0,831$ | 0,999 |
| | | BDDE | <i>nelinearno</i> | / |

R - koeficijent korelacije

Reprezentativni primeri linearne zavisnosti $\log I_p = f(\log v)$ katodnog ciklovoltometrijskog pika (I_c) vareniklina i brimonidina na GCE pri pH = 8,0 prikazani su na **Slici 43**. Jednačine pravca sa odgovarajućim nagibima na izabranim pH vrednostima date su u **Tabeli 6**.



Slika 43. Linearna logaritamska zavisnost intenziteta struje ciklovoltometrijskog katodnog pika (I_c) vareniklina i brimonidina od promene brzine polarizacije na GCE pri pH = 8,0.

Tabela 6. Reprezentativne zavisnosti $\log I_p = f(\log \nu)$ u kiseloj i baznoj sredini dobijene ciklovoltometrijskom analizom VAR i BRIM primenom HMDE/GCE/BDDE.

| <i>Lek</i> | <i>pH</i> | <i>Elektroda</i> | <i>Jednačina prave</i> | <i>R</i> |
|------------|-----------|------------------|--|----------|
| VAR | 2,0 | HMDE | $\log I_p (\mu\text{A}) = 0,483 \log \nu (\text{Vs}^{-1}) - 0,269$ | 0,997 |
| | | GCE | $\log I_p (\mu\text{A}) = 0,576 \log \nu (\text{Vs}^{-1}) + 2,006$ | 0,998 |
| | | BDDE | $\log I_p (\mu\text{A}) = 0,259 \log \nu (\text{Vs}^{-1}) + 0,665$ | 0,994 |
| | 8,0 | HMDE | $\log I_p (\mu\text{A}) = 1,001 \log \nu (\text{Vs}^{-1}) + 0,882$ | 0,998 |
| | | GCE | $\log I_p (\mu\text{A}) = 0,634 \log \nu (\text{Vs}^{-1}) + 2,112$ | 0,995 |
| | | BDDE | $\log I_p (\mu\text{A}) = 0,434 \log \nu (\text{Vs}^{-1}) + 0,213$ | 0,994 |
| BRIM | 2,0 | HMDE | $\log I_p (\mu\text{A}) = 0,556 \log \nu (\text{Vs}^{-1}) - 0,066$ | 0,997 |
| | 3,0 | GCE | $\log I_p (\mu\text{A}) = 0,781 \log \nu (\text{Vs}^{-1}) + 0,938$ | 0,993 |
| | | BDDE | $\log I_p (\mu\text{A}) = 0,458 \log \nu (\text{Vs}^{-1}) + 0,689$ | 0,991 |
| | 8,0 | HMDE | $\log I_p (\mu\text{A}) = 0,756 \log \nu (\text{Vs}^{-1}) + 0,580$ | 0,999 |
| | | GCE | $\log I_p (\mu\text{A}) = 0,676 \log \nu (\text{Vs}^{-1}) + 1,185$ | 0,999 |
| | | BDDE | $\log I_p (\mu\text{A}) = 0,289 \log \nu (\text{Vs}^{-1}) + 0,936$ | 0,996 |

R – koeficijent korelacije

4.1.3. Karakterizacija elektrodnog procesa za postavljanje redoks mehanizma brimonidina i vareniklina

Proučavanjem uticaja kvadrata brzine promene potencijala na intenzitet struje ciklovoltametrijskog katodnog pika (I_c) vareniklina i brimonidina, dobijene su linearne zavisnosti $I_p = f(v^{1/2})$ u kiseloj sredini na HMDE i BDDE (**Tabela 4.**), što znači da je elektrodni proces redukcije vareniklina odnosno brimonidina kontrolisan difuzijom (Poglavlje 1.4.4., **Slika 10.**). U slučaju GCE nije zabeležena linearna zavisnost.

Uticao brzine polarizacije na intenzitet struje ciklovoltametrijskog katodnog pika (I_c) vareniklina i brimonidina prikazan je u **Tabeli 5.**, odakle se uočava linearna zavisnost $I_p = f(v)$ u sledećim slučajevima: na GCE za oba leka i na HMDE za brimonidin (kiselina i bazna sredina), dok je na HMDE za vareniklin prisutna samo u baznoj sredini. Odatle se može zaključiti da dobijene linearne zavisnosti ukazuju na dominaciju adsorpcije tokom redukcionog elektrodnog procesa (Poglavlje 1.4.4., **Slika 10.**). Primenom BDDE nisu dobijene linearne zavisnosti.

Proučavanjem uticaja logaritma brzine polarizacije na logaritam intenziteta struje katodnog ciklovoltametrijskog pika (I_c) vareniklina i brimonidina, dobijene su linearne zavisnosti $\log I_p = f(\log v)$ sa odgovarajućim vrednostima nagiba prave (**Tabela 6.**). Za vareniklin dobijene su vrednosti nagiba manje od 0,5 na HMDE (u kiseloj sredini) i na BDDE (u kiseloj i baznoj sredini). U slučaju brimonidina, samo na BDDE u kiseloj i baznoj sredini dobijene su vrednosti nagiba manje od 0,5. S obzirom da teorijska vrednost nagiba iznosi do 0,5 za difuzijom kontrolisani elektrodni proces (Poglavlje 1.4.4., **Slika 10.**), može se izvesti zaključak da je elektrodni proces redukcije vareniklina primenom HMDE (u kiseloj sredini) i BDDE difuziono kontrolisan, kao i da je proces redukcije brimonidina uz upotrebu BDDE takođe kontrolisan difuzijom (u kiseloj i baznoj sredini). Vrednosti nagiba veće od 0,5 ukazuju na prisustvo adsorpcije, odnosno vrednosti bliske teorijskoj vrednosti od 1,0 podrazumevaju potpunu dominaciju adsorpcije tokom elektrodnog procesa (Poglavlje 1.4.4.) što je utvrđeno i za redukciju vareniklina primenom HMDE (u baznoj sredini). U slučaju vareniklina, zabeleženo je prisustvo adsorpcije u kiseloj i baznoj sredini uz upotrebu GCE, kao i u slučaju brimonidina uz upotrebu GCE i HMDE u kiseloj i baznoj sredini.

Prethodno izneti pojedinačni zaključci o prirodi elektrodnog procesa (na osnovu zavisnosti $I_p = f(v^{1/2})$, $I_p = f(v)$, $\log I_p = f(\log v)$) međusobno su usaglašeni, što vodi generalnom zaključku o prirodi procesa redukcije vareniklina i brimonidina na odgovarajućoj elektrodi koji je predstavljen u **Tabeli 7**.

Tabela 7. Priroda elektrodnog procesa redukcije VAR i BRIM na odgovarajućoj radnoj elektrodi.

| <i>Lek</i> | <i>pH sredine</i> | <i>Elektroda</i> | <i>Priroda procesa</i> |
|------------|-------------------|------------------|------------------------|
| VAR | Kisela | HMDE | Difuzija |
| | Bazna | | Adsorpcija |
| | Kisela/bazna | GCE | Prisutna adsorpcija |
| | Kisela/bazna | BDDE | Difuzija |
| BRIM | Kisela | HMDE | Prisutna adsorpcija |
| | Bazna | | Adsorpcija |
| | Kisela/bazna | GCE | Prisutna adsorpcija |
| | Kisela/bazna | BDDE | Difuzija |

Analizom dobijenih polarografskih i ciklovoltometrijskih rezultata utvrđeno je da postoje određene sličnosti i razlike tokom elektrodnog procesa redukcije brimonidina i vareniklina, što je uslovljeno sličnostima/razlikama u strukturi i uticajem pH vrednosti sredine.

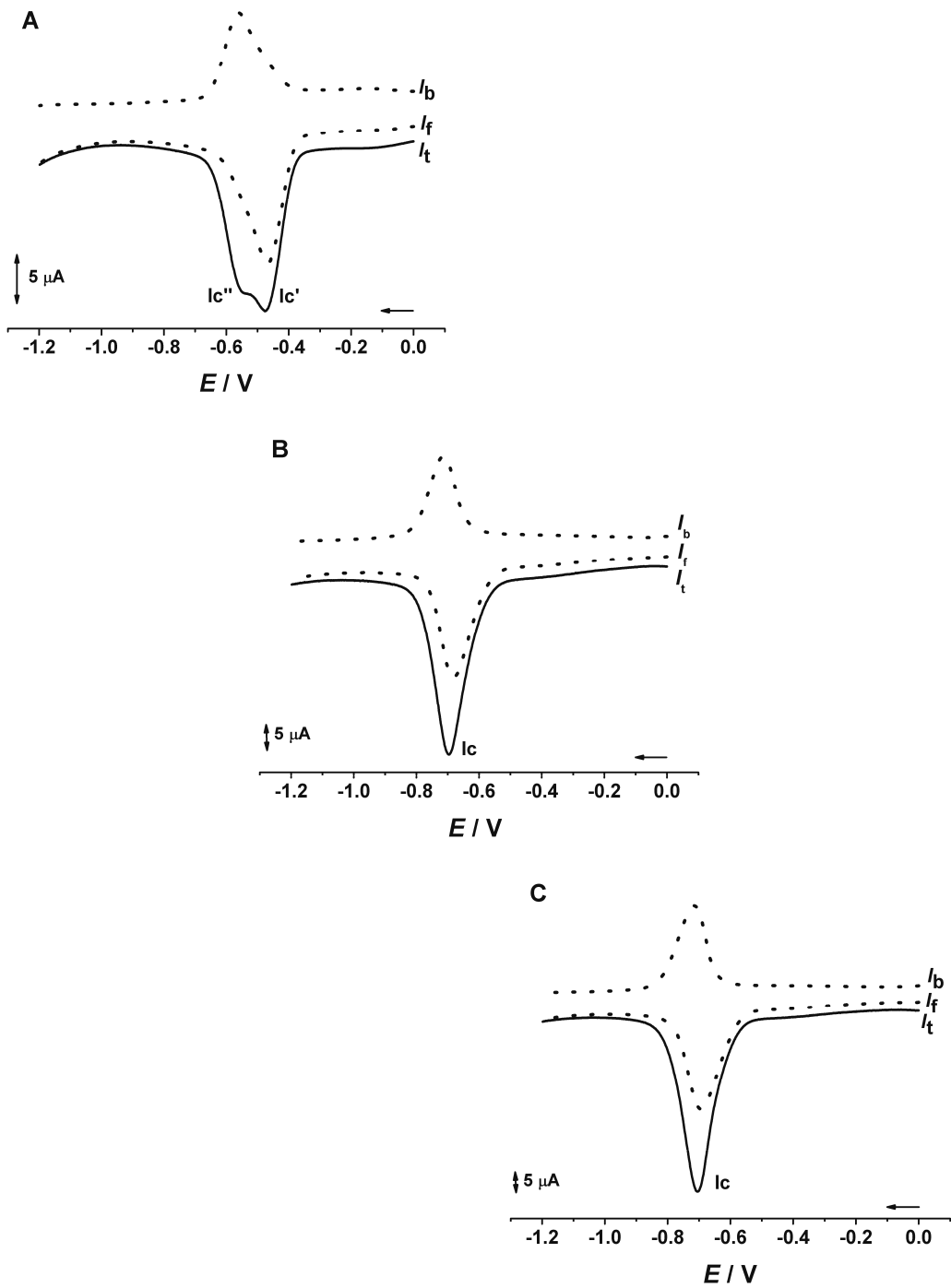
- **Brimonidin**

Zavisnost polutalasnog potencijala ($E_{1/2,l}$) odnosno potencijala pika ($E_{p,l,c}$) od pH vrednosti sredine dala je vrednosti nagiba od ~ 60 mV/pH, što znači da u procesu redukcije učestvuje jednak broj protona i elektrona. Primenjena logaritamska analiza polarografskih talasa brimonidina u kiseloj sredini dala je vrednosti parametra αn_α gde α predstavlja koeficijent prenosa katodne reakcije, dok n_α označava broj razmenjenih elektrona. Odavde su izračunate vrednosti m (broj protona) koje se nalaze u rasponu od 1,76 do 1,84; što znači da u reakciji redukcije učestvuju istovremeno dva protona ($m = 2$), odakle sledi da tokom elektrodnog procesa dolazi do razmene 2 elektrona. Broj razmenjenih elektrona potvrđen je i na osnovu ciklovoltometrijskih rezultata, s obzirom da je dobijena razlika potencijala pika i potencijala na poluvisini pika $|E_{p,l,c} - E_{p1/2,l,c}| =$

$47,7/(n\alpha) \sim 45$ mV; iz čega je dobijeno $n\alpha = 1,06/0,5 = 2,12 \sim 2$ za $\alpha = 0,5$.^{63,77} Učešće 2 elektrona potvrđeno je i iz poluširine redukcionog DPV pika koja iznosi $W_{1/2} \sim 60$ mV (Poglavlje 1.4.5., jednačina (22)). Polarografska aktivnost brimonidina u širokoj pH oblasti (2,0 – 11,0) predstavljena je katodnim talasom (I), kome odgovara katodni ciklovoltometrijski pik, I_c . Prema tome, brimonidin podleže jednostepenoj dvoelektronskoj redukciji uz učešće dva protona u širokoj pH oblasti (2,0 – 11,0). Drugi polarografski talas brimonidina (II), kome odgovara katodni ciklovoltometrijski pik I_{IIc} , prisutan je samo u jako kiselj sredini i na osnovu približno istih visina talasa (I i II), pretpostavlja se da je ovo dodatni dvoelektronski stepen redukcije brimonidina.

Ciklovoltometrijski rezultati ukazuju na postojanje odgovarajućeg anodnog pika brimonidina (I_a), čiji se potencijal približava potencijalu katodnog pika (I_c) sa porastom pH, što ukazuje na stepen porasta reverzibilnosti redoks procesa. Pri $pH < 8,0$; razlika potencijala ovih pikova, tačnije $\Delta E = E_{p,Ic} - E_{p,Ia} \sim 120$ mV je značajno veća od 60 mV, što ukazuje na kvazi-reverzibilnost procesa. Sa daljim porastom pH rastvora ($pH \geq 8,0$), vrednosti intenziteta struje ova dva pika postaju približno jednake, $I_{p,Ic} / I_{p,Ia} \sim 1$, a razlike potencijala pikova su bliske vrednosti 60 mV, $\Delta E = E_{p,Ic} - E_{p,Ia} \sim 70$ mV. Odavde sledi da u baznoj sredini redoks proces dostiže najveći stepen reverzibilnosti.

Kako bi se dodatno ispitala reverzibilnost procesa, primenjena je voltometrija pravougaonih talasa (SWV) pri različitim pH vrednostima.



Slika 44. SW voltamogramski prikazi pri koncentraciji $5,0 \cdot 10^{-5}$ M BRIM uz upotrebu GCE u (A) acetatnom puferu pH = 5,4; (B) fosfatnom puferu pH = 8,0; (C) amonijačnom puferu pH = 10,2. I_t – ukupna (*total*) struja; I_f – struja direktnog (*forward*) smera; I_b – struja povratnog (*backward*) smera. ($f = 25$ Hz, $\Delta E_{step} = 2$ mV, $\Delta E_{sw} = 100$ mV, $v_{eff} = 50$ mV s⁻¹).

Analizirajući SW voltamogramе prikazane na **Slici 44.**, jasno se uočava razlika između rezultata dobijenih na pH = 5,4 (**Slika 44A.**) u odnosu na rezultate dobijene pri pH = 8,0 i 10,2 (**Slika 44B, 44C.**). Naime, u acetatnom puferu (pH = 5,4) dobijena su dva pika, I_c' i I_c'' ; a raščlanjivanjem na dve komponente, u direktnom (*forward*) smeru dobijen je jedan pik ($E_p = -0,468$ V) koji odgovara katodnom piku (I_c) dobijenom cikličnom voltametrijom, dok je u povratnom (*backward*) smeru dobijen pik ($E_p = -0,568$ V) koji odgovara glavnom anodnom piku (I_a) dobijenom primenom CV. Na osnovu razlike potencijala ova dva pika $\Delta E_p = 100$ mV, kao i značajne razlike u visini ovih pikova, može se zaključiti da je reč o kvazi-reverzibilnom procesu. Na SW voltamogramima pri pH = 8,0 i 10,2 (**Slika 44B, 44C.**) jasno je diferenciran samo jedan pik (I_c). Intenzitet struje odgovarajućeg pika dobijenog u direktnom (*forward*) smeru gotovo je jednak intenzitetu struje odgovarajućeg pika dobijenog u povratnom (*backward*) smeru, dok je razlika potencijala pikova manja od 15 mV. Ovim je potvrđeno da je u baznoj sredini redoks proces BRIM reverzibilan.

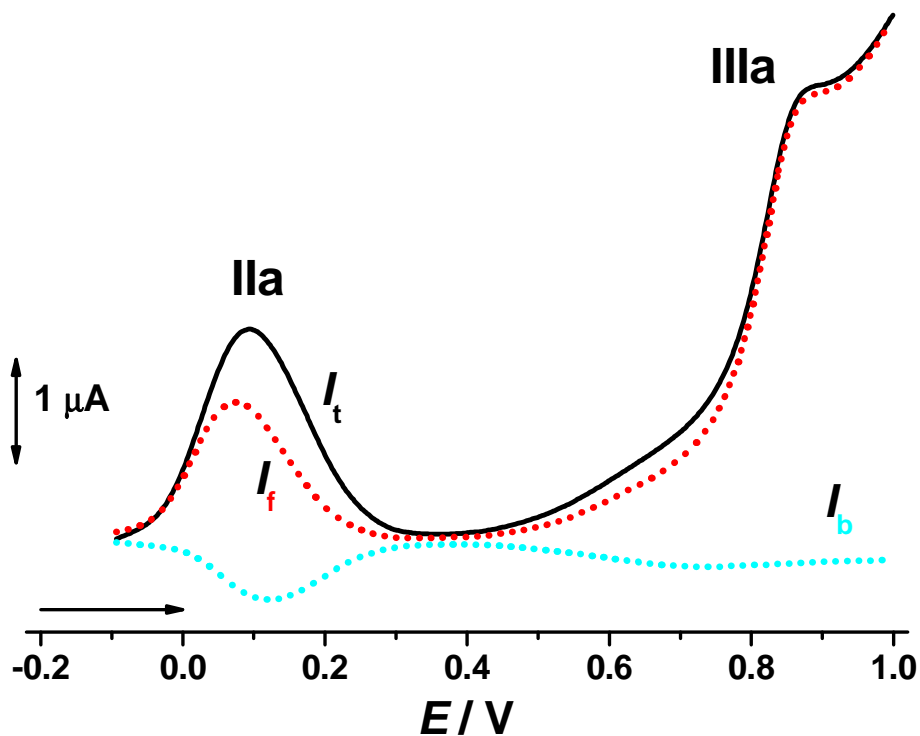
Ciklovoltametrijski rezultati ukazuju na postojanje i drugih anodnih pikova (IIa i IIIa), od čega je prvi (IIa) uslovljen prethodnom redukcijom brimonidina, dok drugi anodni pik (IIIa) predstavlja potpuno odvojen/zaseban proces.

Prisustvo drugog anodnog pika (IIa) u kiselj sredini odgovara oksidaciji produkta redukcije BRIM nastalog na površini elektrode tokom prvog ciklusa, što je utvrđeno primenom ciklične voltametrije, i njegova pojava predstavlja posledicu kvazi-reverzibilnosti redoks procesa. Na osnovu ciklovoltametrijskih rezultata da je pri pH > 8,0 došlo do naglog smanjenja intenziteta struje drugog anodnog pika (IIa) brimonidina i konačno do njegovog potpunog nestanka, može se zaključiti da je ova pojava posledica postignute potpune reverzibilnosti redoks procesa (I_c/I_a) u baznoj sredini.

Rezultati ciklične voltametrije i dobijeni nagib od ~59 mV zavisnosti $E_p = f(pH)$ pri pH $\leq 8,0$ (Poglavlje 4.1.2.) ukazuje na učešće 1 elektrona i 1 protona u nastanku drugog anodnog pika brimonidina (IIa). Da bi se potvrdio broj razmenjenih elektrona primenjena je DPV metoda. Poluširina pika ($W_{1/2}$) varira sa porastom pH vrednosti u intervalu 78 - 107 mV; što ukazuje na transfer 1 elektrona tokom elektrodne reakcije (Poglavlje 1.4.5., jednačina (22)).

Za ispitivanje reverzibilnosti oksidacionog procesa, predstavljenog anodnim pikom (IIa), primenjena je voltametrija pravougaonih talasa (SWV). Dobijen je anodni

pik $E_{p,IIa} = +0,095$ V koji odgovara piku dobijenom primenom CV. Raščlanjivanjem na dve sastavne komponente (*forward* i *backward*), za drugi anodni pik (IIa) dobijeni su pikovi u oba smera pri čemu je u povratnom (*backward*) smeru pik pomeren po potencijalu (+0,130 V) i značajno niži u odnosu na pik u direktnom (*forward*) smeru. Odavde sledi da je oksidacioni proces predstavljen drugim anodnim pikom (IIa) kvazireverzibilan (Slika 45.). Dokazana kvazireverzibilnost oksidacionog procesa predstavljena IIa pikom nije mogla biti konstatovana iz CV rezultata (Poglavlje 1.4.6.).



Slika 45. SW voltamogrami drugog i trećeg anodnog (IIa i IIIa) pika $5,0 \cdot 10^{-5}$ M BRIM uz upotrebu GCE u fosfatnom puferu pH = 8,0. I_t – ukupna (*total*) struja; I_f – struja direktnog (*forward*) smera; I_b – struja povratnog (*backward*) smera. ($f = 25$ Hz, $\Delta E_s = 2$ mV, $\Delta E_{sw} = 100$ mV, $v_{eff} = 50$ mV s⁻¹).

Treći anodni pik (IIIa) brimonidina prisutan je na ciklovoltamogramima u opsegu potencijala od -1,2 V do +1,4 V, bilo da je početni smer ka negativnoj ili pozitivnoj graničnoj vrednosti potencijala. Sužavanjem opsega radnog potencijala (+0,5 V do +1,2 V), takođe je dobijen pomenuti anodni pik, što vodi zaključku da je ovaj proces oksidacije nezavisan od ostalih redoks procesa. Kako se na ciklovoltamogramu

dobijenom u fosfatnom puferu pH = 7,0 uočava samo odgovarajući anodni pik ($E_p = +0,967$ V) bez ikakvog katodnog pika, čak i uz promenu smera primenjenog potencijala, jasno je da je reč o ireverzibilnom procesu oksidacije. Proučavanjem uticaja pH na potencijal pika BRIM primenom CV, dobijena su dva segmenta linearne zavisnosti različitih nagiba (**Slika 37.**). Prvi linearni segment (pH < 8,0) predstavljen je odgovarajućom jednačinom sa nagibom 59mV/pH, te odgovara procesima sa učešćem jednakog broja protona i elektrona. Drugi linearni segment dobijen je pri pH \geq 8,0 i paralelan je apscisi, što vodi zaključku da pH vrednost nema uticaja na elektrodni proces u baznoj sredini. Tačka preseka ova dva linearna segmenta dobijena je pri pH \sim pKa = 7,4;^{42,116} koja odgovara deprotonaciji sekundarne amino grupe brimonidina. Tvrdnja da IIIa pik odgovara jednoelektronskoj oksidaciji u saglasnosti je sa poluširinom DPV pika koja iznosi $W_{1/2} = 103$ mV, što predstavlja karakteristiku elektrodnih reakcija uz transfer jednog elektrona (Poglavlje 1.4.5., jednačina (22)).

Za utvrđivanje reverzibilnosti oksidacionog procesa kome odgovara treći anodni pik brimonidina (IIIa), primenjena je voltometrija pravougaonih talasa (SWV). Anodni pik na potencijalu $E_{p,IIIa} = +0,845$ V odgovara piku dobijenom primenom CV. Raščlanjivanjem trećeg anodnog pika (IIIa) na dve sastavne komponente (*forward* i *backward*), nije dobijen pik u povratnom (*backward*) smeru, odakle sledi da je oksidacioni proces potpuno ireverzibilan (**Slika 45.**), što je u saglasnosti sa CV rezultatima.

- **Vareniklin**

Logaritamska analiza polarografskih talasa vareniklina u kiseloj sredini ukazuje na postojanje dve različite elektroaktivne vrste na površini elektrode, i to na osnovu postojanja dva linearna segmenta različitih nagiba na svakoj od analiziranih pH vrednosti u kiseloj sredini. Primenom logaritamske analize prvog polarografskog talasa vareniklina u kiseloj sredini određene su vrednosti parametara m_α pri čemu α predstavlja koeficijent prenosa katodne reakcije, dok je n_α broj razmenjenih elektrona. Koristeći nagib linearne zavisnosti polutalasnih potencijala od pH i dobijene vrednosti α n_α , izračunate su eksperimentalne vrednosti broja protona (m) koji učestvuje u elektrodnom procesu (**Tabela 3.**). Dobijene vrednosti m nalaze se u rasponu 0,67 – 1,43 za pH = 2,0 i 3,0; što potvrđuje učešće jednog protona ($m \approx 1$) u elektrodnom procesu redukcije obe prisutne elektroaktivne vrste. Na pH = 4,0; dobijen je samo jedan linearni

segment sa vrednošću $\alpha n_{\alpha} = 1,49$ i $m = 1,61$; što znači da u procesu redukcije učestvuju 2 protona ($m \approx 2$). S obzirom da nagib linearne zavisnosti polutalasnog potencijala ($E_{1/2}$) prvog polarografskog talasa vareniklina (I), odnosno potencijala (E_p) prvog katodnog ciklovoltometrijskog pika (I_c) od pH vrednosti sredine iznosi ~ 60 mV/pH u širokoj pH oblasti, to znači da u procesu redukcije učestvuje jednak broj protona i elektrona. Odavde sledi da se tokom elektrodne reakcije razmenjuju 2 elektrona. Prema tome, u jako kiselj sredini odvija se dvostepena dvoelektronska redukcija vareniklina okarakterisana sa dva polarografska talasa (I i II) odnosno dva ciklovoltometrijska pika (I_c i II_c), pri čemu se prvi stepen redukcije odvija u dva stupnja uz učešće po jednog protona i jednog elektrona, što se na prvom polarografskom talasu (I) manifestuje razdvajanjem (*splitting*-om, sa razlikom polutalasnih potencijala od $\Delta E_{1/2} \sim 0,1$ V). U neutralnoj i baznoj sredini vareniklin podleže jednostepenoj dvoelektronskoj redukciji uz učešće dva protona okarakterisanoj samo jednim polarografskim talasom (I) odnosno jednim ciklovoltometrijskim pikom (I_c).

Ciklovoltometrijski rezultati ukazuju na postojanje odgovarajućeg anodnog pika vareniklina (I_a), čiji se potencijal pika sa porastom pH približava potencijalu katodnog pika (I_c), što ukazuje na stepen porasta reverzibilnosti redoks procesa. Nagib linearne zavisnosti potencijala anodnog pika (I_a) od pH vrednosti sredine koji iznosi ~ 60 mV/pH ukazuje da u procesu oksidacije učestvuje jednak broj protona i elektrona. Broj razmenjenih elektrona potvrđen je i na osnovu dobijene razlike potencijala pika i potencijala na poluvisini pika $|E_{p,Ia} - E_{p1/2,Ia}| = 47,7/(\alpha n_{\alpha}) \sim 49$ mV; odakle se dobija $n_{\alpha} = 0,973/0,5 = 1,95 \sim 2e^{-}$ za $\alpha = 0,5$.^{63,77} Odavde sledi da u procesu oksidacije predstavljenom ciklovoltometrijskim pikom (I_a) učestvuju dva protona i dva elektrona.

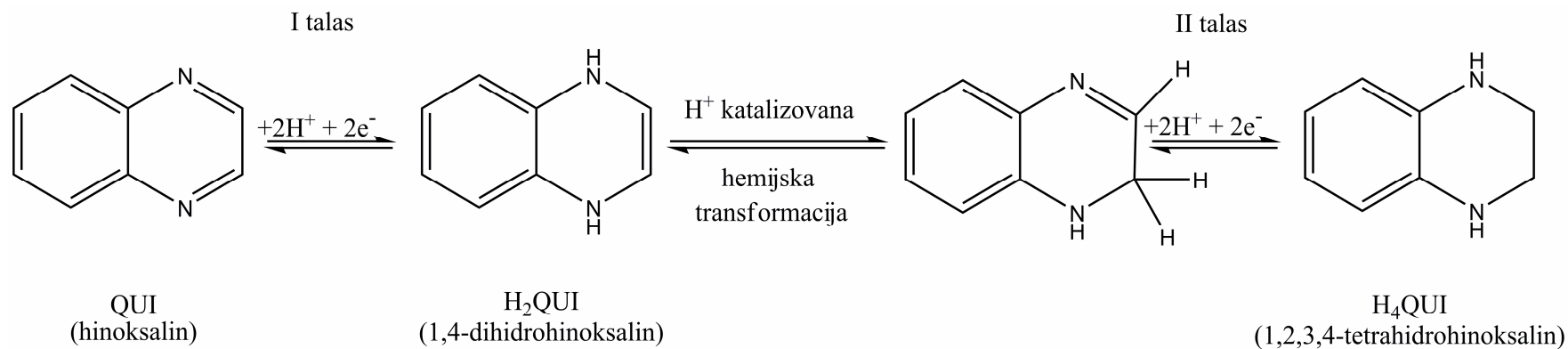
Prisustvo drugog anodnog pika (II_a) odgovara oksidaciji produkta redukcije VAR nastalog na površini elektrode tokom prvog ciklusa, što je utvrđeno primenom ciklične voltametrije. Iz vrednosti nagiba linearne zavisnosti E_p od pH , koji iznosi ~ 60 mV/pH, što znači da u procesu oksidacije učestvuje jednak broj protona i elektrona. Iz razlike potencijala pika i potencijala na poluvisini pika $|E_{p,IIa} - E_{p1/2,IIa}| = 47,7/(\alpha n_{\alpha}) \sim 72$ mV za $\alpha = 0,5$ dobijen je broj elektrona koji se razmenjuje tokom elektrodne reakcije i iznosi $n_{\alpha} = 0,66/0,5 = 1,32 \sim 1e^{-}$.^{63,77} Kako u širokom rasponu pH vrednosti nije zabeleženo prisustvo odgovarajućeg katodnog pika (u reverznom smeru i bliskom po

vrednosti potencijala pika), može se zaključiti da se radi o ireverzibilnoj oksidaciji produkta redukcije vareniklina (dihidro-vareniklina) uz učešće 1 elektrona i 1 protona.

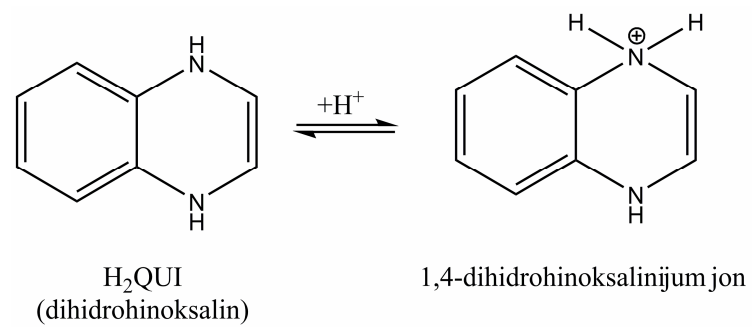
Prisustvo trećeg anodnog pika (IIIa) nije zabeleženo prilikom oksidacije vareniklina ni na jednoj korišćenoj elektrodi.

4.1.4. Redoks mehanizam brimonidina i vareniklina

Dosadašnja proučavanja elektrohemijskog ponašanja hinoksalina (QUI) (benzopirazina) koji predstavlja osnovu (jezgro) strukture brimonidina i vareniklina, uglavnom su zasnovana na izučavanju procesa njegove redukcije uz upotrebu DME/HMDE kao radne elektrode.¹¹⁷⁻¹¹⁹ Mehanizam redukcije hinoksalina predstavljen je dvostepenim procesom (I i II talas) sa učešćem 2 protona i 2 elektrona po jednom stepenu, tako da u prvom stepenu redukcije nastaje 1,4-dihidrohinksalin (H₂QUI), a u drugom stepenu 1,2,3,4-tetrahidrohinksalin (H₄QUI). Drugi stepen redukcije (II talas) izuzetno zavisi od pH vrednosti sredine,¹¹⁷ što je prikazano na **Shemi 3**. Oba talasa odgovaraju redukciji C=N veze u okviru pirazinskog prstena hinoksalinske strukture. Odavde sledi da se potpuna redukcija hinoksalina do tetrahidrohinksalina (H₄QUI) odvija samo u kiseljoj sredini. U takvim uslovima, katalitičko dejstvo pripisano je 1,4-dihidrohinksalinijum-jonu usled disocijacije i otpuštanja protona (**Shema 4**).¹¹⁸

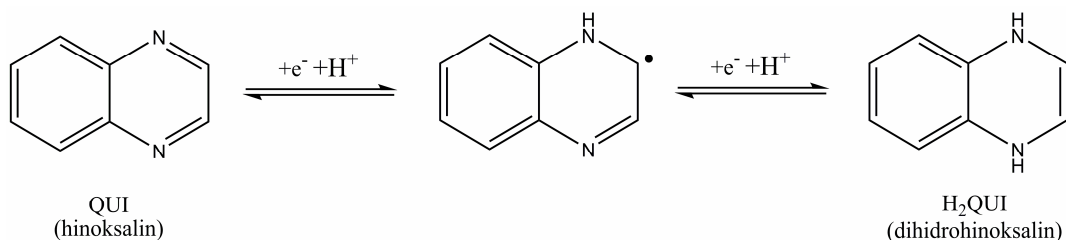


Shema 3. Mehanizam potpune redukcije hinoksalina u kiselj sredini.¹¹⁷



Shema 4. Katalizator-jon drugog stepena redukcije od dihidrohinksalina do tetrahidrohinksalina.¹¹⁸

Detaljnim ispitivanjem Murrey i saradnici utvrdili su i predložili da se prvi stepen redukcije hinoksalina (I talas) odvija stupnjevito uz učešće jednog elektrona i jednog protona po stupnju, kako je prikazano na **Shemi 5**. Na polarogramima u jako kiseljoj sredini (pH = 2, 0 i 3,0) ovakva stupnjevita redukcija manifestuje se cepanjem (*splitting-om*) talasa.¹¹⁸



Shema 5. Postupni mehanizam redukcije hinoksalina predstavljen prvim polarografskim talasom kroz jednoelektronske stupnjeve.¹¹⁸

Literaturni podaci o proučavanju redoks mehanizma hinoksalina primenom čvrstih elektroda veoma su oskudni. U skorije vreme postavljen je redoks mehanizam hinoksalina uz upotrebu GCE.¹²⁰ Njime je potvrđen reverzibilan dvoelektronski redoks proces (predstavljen prvim katodnim i prvim anodnim ciklovoltametrijskim pikom) u širokoj pH oblasti koji se odvija na C=N vezi pirazina, što je u skladu sa ranijim zaključkom dobijenim primenom DME/HMDE. S obzirom na mogućnosti čvrstih elektroda da se primenjuju i u oblastima pozitivnih potencijala, ovde je utvrđeno postojanje odvojenog jednoelektronskog procesa oksidacije i to prethodno redukovano oblika hinoksalina.¹²⁰

Na osnovu polarografskih, ciklovoltametrijskih, kao i dodatnih DPV/SWV rezultata, predloženi su redoks mehanizmi BRIM i VAR koji stoje u saglasnosti sa do sada postavljenim redoks mehanizmom hinoksalina – jezgra sadržanog u oba leka.

Sličnost koja je uočena u polarografskom ponašanju brimonidina i hinoksalina ogleda se u prisutvu prvog katodnog talasa u širokoj pH oblasti (2,0 – 10,0), pri čemu su vrednosti polutalasnih potencijala ($E_{1/2}$) slične i kreću se u rasponu od približno -0,3 V (pH = 2,0) do približno -0,8 V (pH = 10,0).¹¹⁹ Približno iste visine prvog polarografskog

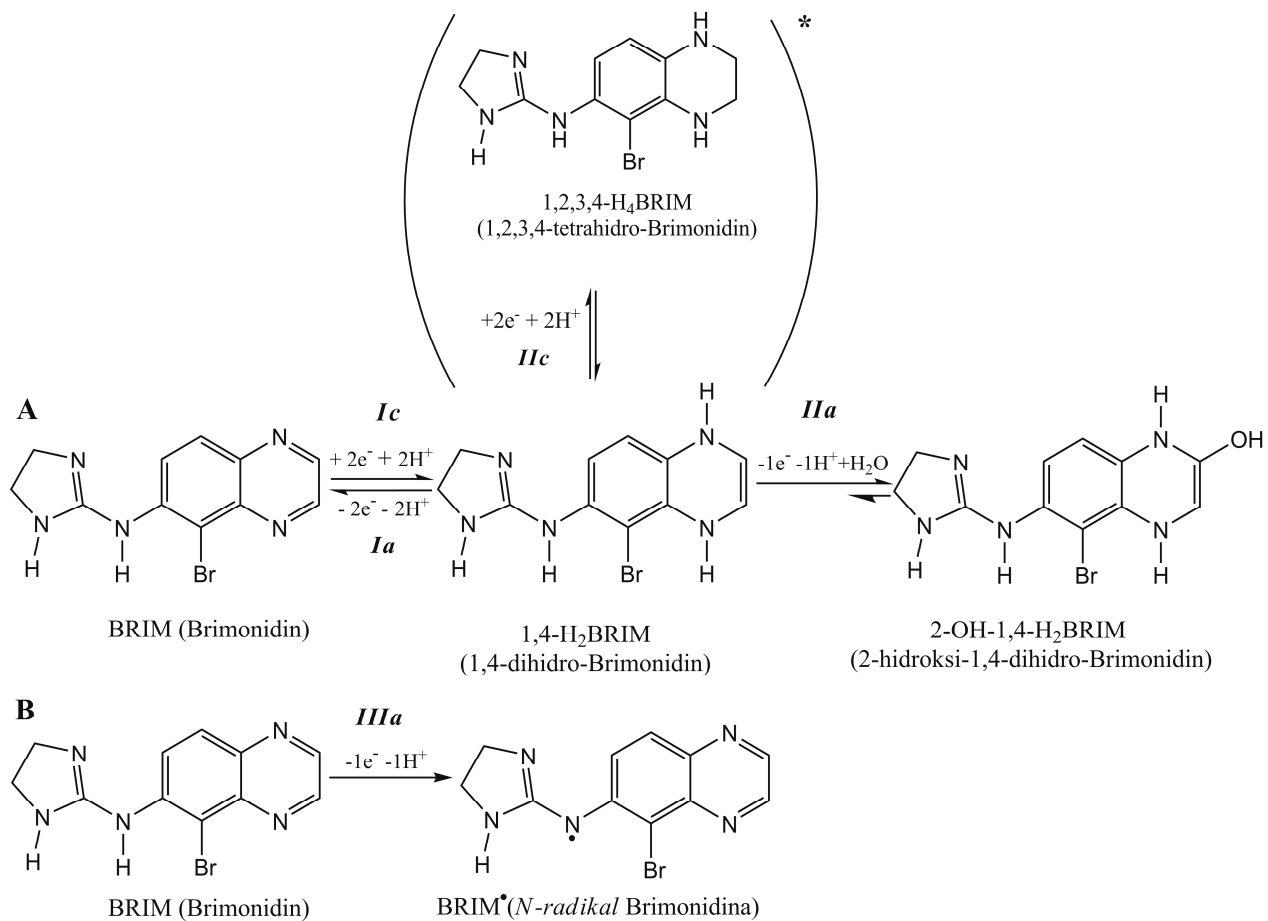
talasa kod BRIM (Poglavlje 4.1.1., **Slika 19.**) i QUI¹¹⁸ svedoči o razmeni istog broja elektrona u celokupnoj ispitivanoj pH oblasti. Kako je za hinoksalin utvrđeno da prvi polarografski talas odgovara dvoelektronskoj redukciji C=N veze do 1,4-dihidrohinksalina, odavde se zaključuje da prvi polarografski talas brimonidina (BRIM) takođe odgovara dvoelektronskoj redukciji (hinoksalinskog jezgra) do 1,4-dihidrobromonidina (1,4-H₂BRIM) (**Shema 6.**). Razlika koja je uočena jeste da kod hinoksalina postoji linearna zavisnost $E_{1/2}$ od pH sa jedinstvenim nagibom, dok su kod brimonidina dobijena dva linearna segmenta sa malom razlikom u vrednostima nagiba (60 mV/pH odnosno 66mV/pH, Poglavlje 4.1.1., **Slika 21.**). Ova razlika može se pripisati uticaju supstituenata: Br na položaju C5 koji ispoljava negativni induktivni efekat ($-I$ tj. sposobnost jačeg privlačenja elektronskog para od vodonika) koji se prenosi na cikličnu strukturu hinoksalina, odnosno imidazolinu na amino grupi u položaju C6. Ipak, vrednosti nagiba ~ 60 mV/pH potvrda su da tokom redukcije učestvuje jednak broj protona i elektrona kako kod hinoksalina tako i kod brimonidina. Sličnost u ponašanju hinoksalina i brimonidina ispoljava se i u pojavi II talasa u kiseloj sredini (pH = 2,0 i 3,0). Drugi polarografski talas brimonidina (II) javlja se na $E_{1/2}$ približno -0,9 V odnosno -1,0 V, slično kao kod hinoksalina ($E_{1/2}$ približno -0,9 V odnosno -0,95 V).¹¹⁸ Ovaj talas predstavlja drugi stepen dvoelektronske redukcije od 1,4-dihidrobromonidina (1,4-H₂BRIM) do 1,2,3,4-tetrahidrobromonidina (1,2,3,4-H₄BRIM) (**Shema 6.**).

Poređenjem položaja prvog katodnog (Ic) i prvog anodnog (Ia) ciklovoltometrijskog pika brimonidina (Poglavlje 4.1.2.3., **Slika 36.**) sa položajem pikova hinoksalina¹²⁰ dobijenih pri istoj brzini polarizacije ($v = 100$ mV s⁻¹) i pH vrednosti (acetatni pufer pH = 5,4), utvrđeno je da se nalaze na približno istim vrednostima potencijala ($E_{p,Ic} \sim -0,6$ V; $E_{p,Ia} \sim -0,5$ V). Ovim je dodatno potvrđeno da se dvoelektronski reverzibilni redoks proces odvija na C=N vezi hinoksalinskog jezgra (**Shema 6.**).

Prethodno je utvrđeno da drugi anodni pik brimonidina (IIa) odgovara jedneelektronskoj oksidaciji prethodno redukovanog brimonidina (Poglavlje 4.1.2.3., **Slika 36.**) do nastajanja 2-hidroksi-1,4-dihidrobromonidina (2-OH-1,4-H₂BRIM) (**Shema 6.**), što je u saglasnosti sa literaturnim podacim.¹²⁰⁻¹²⁵ Poredeći položaj drugog ciklovoltometrijskog anodnog (IIa) pika brimonidina ($E_p \sim 0,20$ V) (Poglavlje 4.1.2.3.,

Slika 36.) sa drugim anodnim ciklovoltametrijskim pikom (IIa) hinoksalina ($E_p \sim 0,15$ V)¹²⁰ dobijenih pri istoj pH vrednosti (acetatni pufer pH = 5,4) i brzini polarizacije ($v = 100$ mV s⁻¹), utvrđeno je da se nalaze na vrlo bliskim vrednostima potencijala, što ukazuje na isto poreklo pika (**Shema 6.**).

Potpuno odvojen elektrodni proces od prethodno pomenutog jeste proces oksidacije predstavljen pikom IIIa (**Shema 6B.**). Reč je o jednostepenoj ireverzibilnoj oksidaciji sekundarnog aromatičnog amina uz učešće 1 elektrona i 1 protona, pri čemu nastaje *N-radikal* brimonidina (BRIM[•]), slično radikalima pomenutim u literaturi.¹²⁶⁻¹²⁸ Može se dalje pretpostaviti da je pomenuti radikal vrlo nestabilan i kratkoročnog trajanja, te da verovatno dolazi do reakcije sa samim rastvaračem (vodom). Potvrđeno je da se aromatični amini nakon oksidacije ne vezuju kovalentno za površinu elektrode, ali ostaju kao stabilni radikali u rastvoru ili dolazi do njihove dimerizacije/polimerizacije.¹²⁷

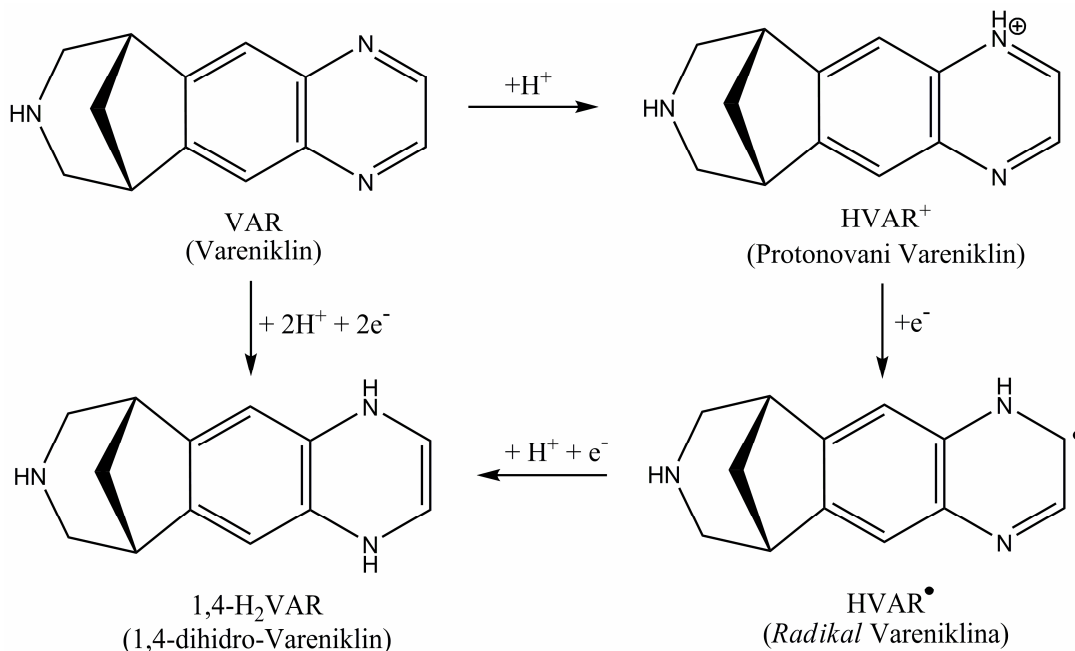


Shema 6. Predloženi redoks mehanizam brimonidina u širokoj pH oblasti od 2,0 do 11,0: **A.** Redukcija (*Ic*) (reverzibilna (*Ia*)) praćena oksidacijom (*IIa*); **B.** Oksidacija (*IIIa*). **A.*** Dodatni stepen redukcije prisutan samo u jako kiseljoj sredini (pH = 2,0 – 3,0).

Sličnost u polarografskom ponašanju vareniklina i hinoksalina je još izraženija, nego u slučaju brimonidina i hinoksalina. Prvi polarografski talas vareniklina (I) prisutan je u širokoj pH oblasti (2,0 – 10,0), kao i kod hinoksalina sa sličnim vrednostima polutalasnih potencijala ($E_{1/2}$) u rasponu od -0,3 V do -0,8 V.¹¹⁸ Visina prvog polarografskog talasa koja je u celokupnoj pH oblasti približno ista (Poglavlje 4.1.1., **Slika 23.**), kao i kod QUI,¹¹⁸ ukazuje na razmenu istog broja elektrona. Kako je za hinoksalin utvrđeno da prvi polarografski talas odgovara dvoelektronskoj redukciji C=N veze do nastajanja 1,4-dihidrohinksalina, to bi prvi polarografski talas vareniklina odgovarao dvoelektronskoj redukciji dvostruke veze hinoksalinskog jezgra do 1,4-dihidrovareniklina (1,4-H₂VAR) (**Shema 8.**). Razlika postoji u zavisnosti $E_{1/2}$ od pH, tako što je kod hinoksalina prisutan jedan pravac, dok su kod vareniklina dobijena dva linearna segmenta sa malom razlikom u vrednostima nagiba (64 mV/pH odnosno 49 mv/pH (Poglavlje 4.1.1., **Slika 24.**). Postojanje dva linearna segmenta može se pripisati razlici u strukturi (prisustvo kondenzovanog heterociklusa kod vareniklina). Vrednosti nagiba ~60mV/pH kod hinoksalina i vareniklina ukazuju na učešće jednakog broja elektrona i protona.

Sličnost u polarografskom ponašanju vareniklina i hinoksalina ispoljava se i prisustvom drugog polarografskog talasa u oblasti pH < 6,0. Vrednosti polutalasnih potencijala drugog talasa hinoksalina u kiselj sredini ($E_{1/2}$ od -0,9 V do -1,1 V),¹¹⁸ koje su približne vrednostima dobijenim za vareniklin, ukazuju da se radi o istom poreklu talasa za hinoksalin i vareniklin. Ovaj talas predstavlja drugi stepen dvoelektronske redukcije polazeći od 1,4-dihidrovareniklina (1,4-H₂VAR) do 1,2,3,4-tetrahidrovareniklina (1,2,3,4-H₄VAR) (**Shema 8.**). Na osnovu logaritamske analize prvog talasa u kiselj sredini, dobijeno je da se linearni segment manjeg nagiba, koji odgovara protonovanom obliku vareniklina (HVAR⁺) lakše podložnom redukciji, smanjuje sa povećanjem pH vrednosti rastvora. Nasuprot tome, dužina linearnog segmenta većeg nagiba, koji odgovara redukciji vareniklin-radikala (HVAR[•]), raste sa porastom pH vrednosti rastvora (**Shema 7.**). Kao što je logaritamskom analizom cefetameta¹²⁹ i 1-fenil-1,2-propandiona¹³⁰ ranije pokazano, promena dužine segmenata dodatno potvrđuje prethodno izneti zaključak da u kiselj sredini transfer elektrona nije jednostepeni proces i da sa porastom pH vrednosti slabi protonacija vrsta. U slučaju VAR ovo se manifestuje time da u baznoj sredini postoji samo jedan talas koji odgovara

redukciji vareniklina (oblika VAR u oblik 1,4-H₂VAR) uz istovremeno učešće dva elektrona i dva protona.



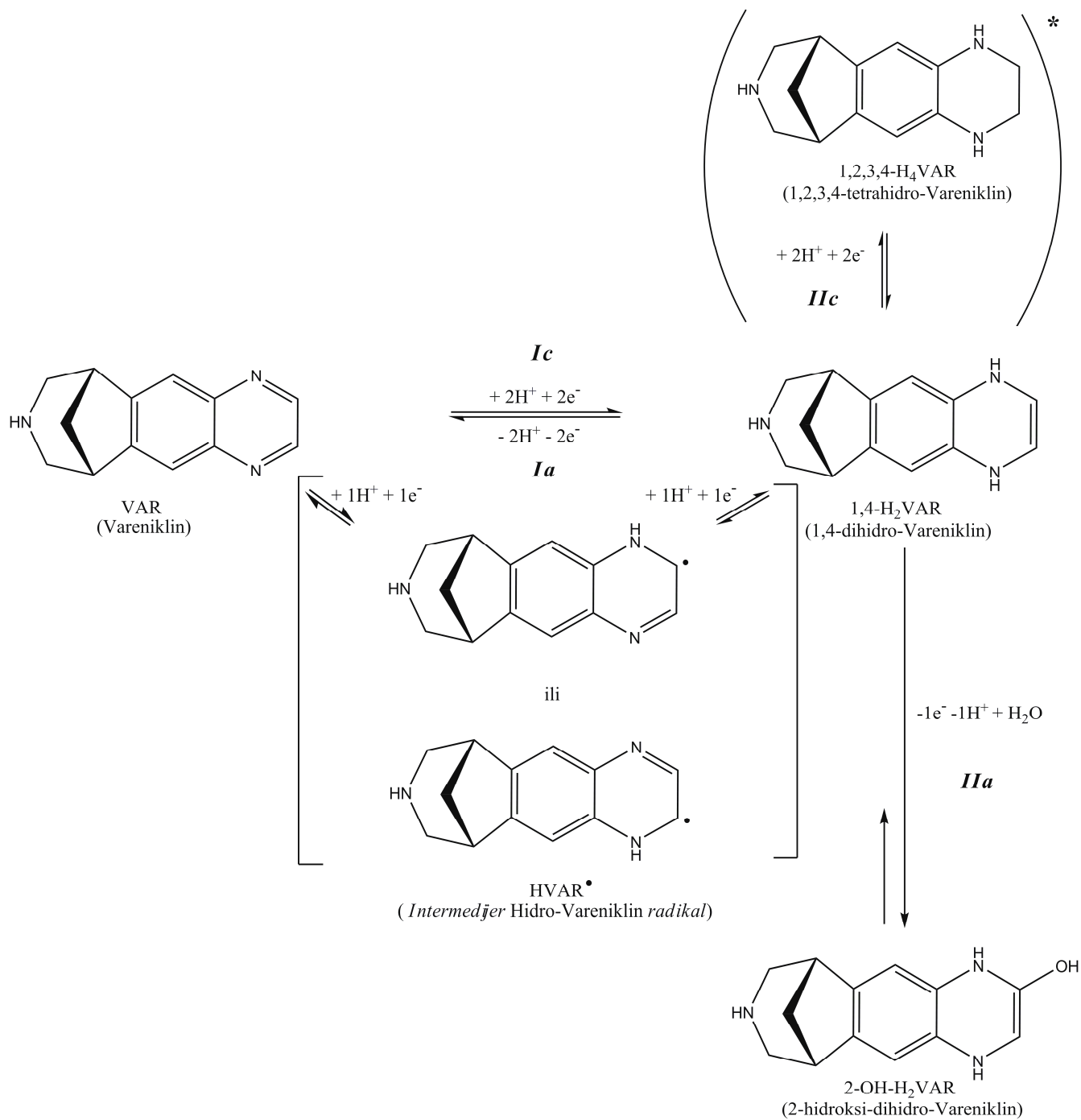
Shema 7. Predloženi mehanizam redukcije vareniklina (VAR) u širokom opsegu pH vrednosti (2,0 – 10,0); koji se u kiseljoj sredini (pH < 6,0) odvija u jednoelektronskim stupnjevima preko intermedijernog radikala.

U kiseljoj sredini pri pH < 6,0; oblik 1,4-dihidrovareniklin (1,4-H₂VAR) redukuje se dalje do krajnjeg oblika 1,2,3,4-tetrahidrovareniklina (1,2,3,4-H₄VAR), sa intermedijernom H⁺-katalizovanom hemijskom transformacijom, kako je ranije potvrđeno za sam hinoksalin (**Shema 3.**).¹¹⁷

Ciklovoltametrijskom katodnom piku vareniklina (I_c, E_p ~-0,65 V) (Poglavlje 4.1.2.3., **Slika 34A.**), kome odgovara prvi polarografski talas, odgovara ciklovoltametrijski katodni pik hinoksalina (I_c, E_p ~-0,65 V).¹²⁰ Poređenja su moguća zbog istih eksperimentalnih uslova (acetatni pufer pH = 5,4; $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$). Otuda, pojava ovog pika jeste posledica dvoelektronske redukcije C=N veze hinoksalinskog jezgra. Odgovarajućem prvom anodnom piku (I_a) vareniklina (E_p ~-0,55 V) (Poglavlje

4.1.2.3., **Slika 34A.**), odgovara prvi anodni pik hinoksalina (Ia, $E_p \sim -0,55$ V),¹²⁰ tako da su ovi rezultati u saglasnosti da je reč o reverznom redoks procesu sa učešćem 2 elektrona i 2 protona (**Shema 8.**).

Drugi anodni pik vareniklina (IIa, $E_p \sim -0,2$ V) (Poglavlje 4.1.2.3., **Slika 34A.**) odgovara drugom anodnom piku hinoksalina (IIa, $E_p \sim -0,15$ V).¹²⁰ Ovaj pik jeste posledica nastanka 2-hidroksi-dihidrovareniklina (2-OH-1,4-H₂VAR), kao rezultat jednoelektronske oksidacije redukovanog oblika vareniklina (1,4-H₂VAR) (**Shema 8.**).



Shema 8. Predloženi redoks mehanizam vareniklina u širokoj pH oblasti od 2,0 do 11,0 – redukcija (*Ic*) reverzibilna (*Ia*) i oksidacija (*IIa*). Dodatna redukcija (*) prisutna samo u kiseloj sredini pri pH < 6,0 (*IIc*).

4.2. Kvantitativna analiza vareniklina i brimonidina

4.2.1. Voltametrijsko određivanje vareniklina

S obzirom na prethodno utvrđenu adsorpciju na HMDE i GCE, za određivanje VAR odabrana je voltametrija pravougaonih talasa sa obogaćivanjem i rastvaranjem (*Adsorptive Stripping Square Wave Voltammetry*, AdSSWV). Za određivanje VAR uz upotrebu BDDE, na kojoj nije zapažena adsorpcija, izabrana je voltametrija pravougaonih talasa (*Square Wave Voltammetry*, SWV). Voltametrijskoj tehnici pravougaonih talasa (SWV) data je prednost u odnosu na diferencijalnu pulsnu voltametrijsku (DPV) tehniku zbog niske rezidualne (kapacitivne) struje svojstvene ovoj tehnici, visoke osetljivosti odnosno niskih limita detekcije, kao i brzine izvođenja.^{59,60}

4.2.1.1. Optimizacija metoda za određivanje vareniklina

Tokom optimizacije parametara sa ciljem postavljanja elektroanalitičke metode ispitivani su: amplituda pulsa ($\Delta E_{sw}/mV$), širina pulsa (trajanje potencijalnog stepena, t_p/s) odnosno period ciklusa (t_s/s) koji se češće izražava putem frekvencije oscilacija (f/Hz) i same efektivne brzine promene potencijala ($v_{eff}/mV s^{-1}$). U slučaju korišćenja HMDE kao radne elektrode, optimizivana je i veličina kapi žive, dok su kod adsorptivne tehnike neizostavno optimizovani: vreme (t_{acc}/s) i potencijal akumulacije (E_{acc}/V). Kriterijumi za izbor optimalne pH vrednosti kao i ostalih optimalnih uslova (parametara) bili su: odgovarajući oblik (širina) i intenzitet struje (visina) pika.

4.2.1.1.1. Optimizacija AdSSWV/HMDE metode za određivanje vareniklina

Radi utvrđivanja optimalne vrednosti amplitude pulsa (ΔE_{sw}), variranje parametra obuhvatalo je sledeće vrednosti: 10, 25, 50, 75 i 100 mV.

Vrednosti širine (trajanja) pulsa (t_p) tokom ispitivanja iznosile su: 2, 5 i 10 ms, vrednosti frekvencije oscilovanja (f): 250; 100 i 50 Hz, odnosno vrednosti efektivne brzine promene potencijala (v_{eff}) (za potencijalski stepen povećanja $\Delta E_{step} = 1$ mV): 250; 100 i 50 $mV s^{-1}$.

Tokom utvrđivanja optimalne vrednosti veličine kapi, vrednosti su varirane i iznosile su: 5, 10, 20, 30 i 50 a. u. (a. u. = *arbitrary units*).

S obzirom da se radi o adsorptivnoj metodi, ispitan je uticaj vremena akumulacije ($t_{acc} = 2, 5, 8, 10, 12, 15, 20$ s); i potencijal akumulacije ($E_{acc} = -100, -200, -300, -400, -500, -600, -700$ i -800 mV).

Na osnovu odgovarajućeg oblika (širine) i intenziteta struje (visine) pika, za određivanje vareniklina metodom AdSSWV/HMDE izabrani su sledeći optimalni uslovi: amplituda pulsa od 50 mV, širina pulsa od 5 ms, frekvencija oscilacije od 100 Hz odnosno efektivna brzina promene potencijala od 100 $mV s^{-1}$, i veličina živine kapi od 20 a.u. Osim pomenutih izabranih parametara, za određivanje na pH = 5,0 (Briton-Robinsonov pufer) optimalno vreme akumulacije je 8 s, a potencijal akumulacije -0,4 V, dok za određivanje na pH = 8,0 vreme i potencijal akumulacije iznose 10 s i -0,6 V (Tabela 8.).

Tabela 8. Odabrani optimalni uslovi za određivanje VAR primenom SWV odnosno AdSSWV metode uz upotrebu različitih radnih elektroda: HMDE, GCE i BDDE.

| <i>Elektroda</i> | <i>pH</i> | E_p (V) | ΔE_{sw} (mV) | t_p (ms) | f (Hz) | v_{eff} ($mV s^{-1}$) | t_{acc} (s) | E_{acc} (V) |
|------------------|-----------|--------------|-------------------------|---------------|-------------|------------------------------|------------------|------------------|
| HMDE | 5,0 | -0,53 | 50 | 5 | 100 | 100 | 8 | -0,4 |
| | 8,0 | -0,73 | | | | | 10 | -0,6 |
| GCE | 4,0 | -0,50 | 50 | 5 | 100 | 100 | 8 | -0,4 |
| | 8,0 | -0,80 | 25 | 10 | 50 | 50 | 10 | -0,6 |
| BDDE | 3,5 | -0,53 | 50 | 5 | 100 | 100 | / | / |

E_p – potencijal pika, ΔE_{sw} – amplituda pulsa, t_p – širina pulsa, v_{eff} – efektivna brzina promene potencijala, f - frekvencija oscilacija, t_{acc} – vreme akumulacije, E_{acc} – potencijal akumulacije.

4.2.1.1.2. Optimizacija AdSSWV/GCE metode za određivanje vareniklina

Prilikom optimizacije metode AdSSWV/GCE za određivanje vareniklina varirani su sledeći parametri: amplituda pulsa (ΔE_{sw}) (10, 25, 50, 75 i 100 mV), širina pulsa (t_p) (2, 5 i 10 ms), frekvencija (f) (250, 100 i 50 Hz), odnosno efektivna brzina promene potencijala (v_{eff}) (250; 100 i 50 mV s⁻¹).

Vreme akumulacije (t_{acc}): 2, 5, 8, 10, 12, 15 s; i potencijal akumulacije (E_{acc}): -200, -300, -400, -500, -600, -700 i -800 mV; dodatno su varirani s obzirom da se radi o adsorptivnoj metodi.

Za određivanje vareniklina metodom AdSSWV/GCE na pH = 4,0 (Briton-Robinsonov pufer) izabrani su sledeći optimalni uslovi: amplituda pulsa od 50 mV, širina pulsa od 5 ms, frekvencija oscilovanja od 100 Hz, efektivna brzina promene potencijala od 100 mV s⁻¹, vreme akumulacije od 8 s i potencijal akumulacije od -0,4 V. Optimalni uslovi za određivanje vareniklina na pH = 8,0 (Briton-Robinsonov pufer) metodom AdSSWV/GCE jesu: amplituda pulsa od 25 mV, širina pulsa od 10 ms, frekvencija oscilovanja od 50 Hz, efektivna brzina promene potencijala od 50 mV s⁻¹, vreme akumulacije od 10 s i potencijal akumulacije od -0,6 mV (**Tabela 8.**).

4.2.1.1.3. Optimizacija SWV/BDDE metode za određivanje vareniklina

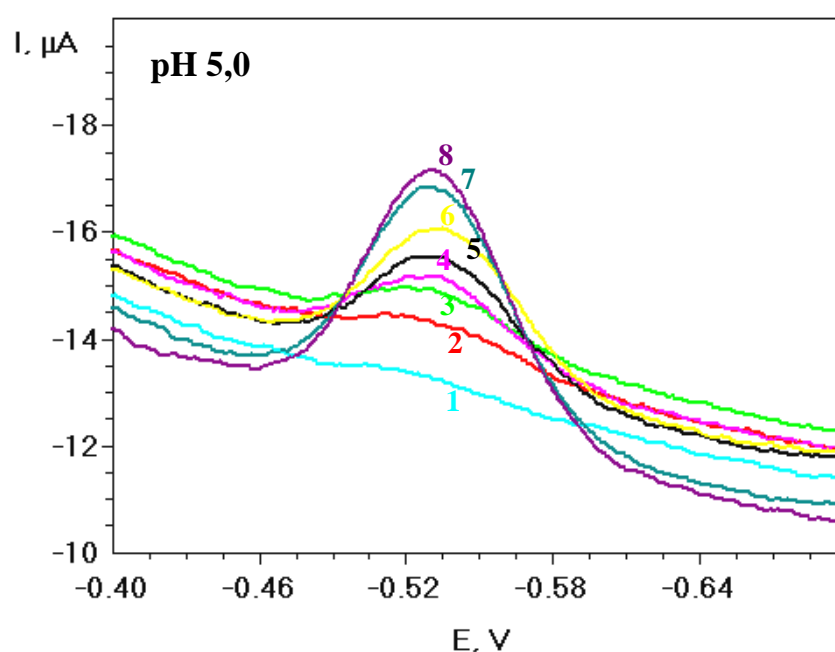
Tokom optimizacije metode SWV/BDDE na izabranoj pH = 3,5 (Briton-Robinsonov pufer) varirani su sledeći parametri: amplituda pulsa (10, 25, 50, 75 i 100 mV), širina pulsa (2, 5 i 10 ms), frekvencija (250, 100 i 50 Hz) odnosno efektivna brzina promene potencijala (250; 100 i 50 mV s⁻¹).

Izabrane su sledeće optimalne vrednosti parametara: amplituda pulsa $\Delta E_{sw} = 50$ mV, širina pulsa $t_p = 5$ ms, frekvencija oscilovanja $f = 100$ Hz, odnosno efektivna brzina promene potencijala $v_{eff} = 100$ mV s⁻¹ (**Tabela 8.**).

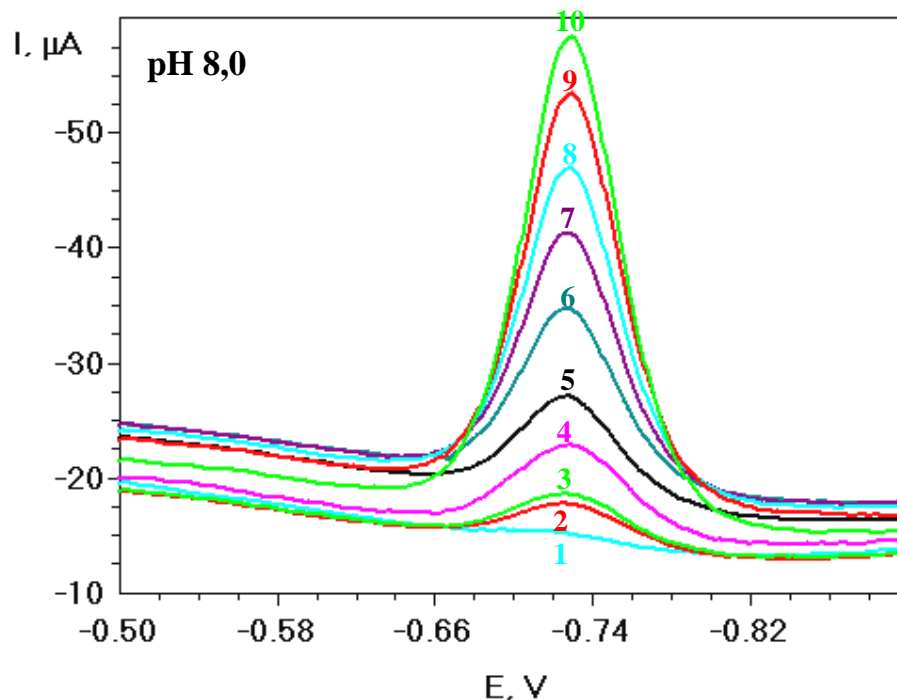
4.2.1.2. Validacija metoda za određivanje vareniklina

4.2.1.2.1. Validacija AdSSWV/HMDE metode za određivanje vareniklina

Koristeći AdSSWV na HMDE i primenjujući odabrane optimalne uslove za redukcionu pik vareniklina ($E_p = -0,53$ V) na pH = 5,0 i ($E_p = -0,73$ V) na pH = 8,0; dobijeni su voltamogrami u odgovarajućem opsegu koncentracija koji su prikazani na Slikama 46, 47.



Slika 46. Reprezentativni AdSSW voltamogrami dobijeni u Briton-Robinsonovom puferu pH = 5,0 za koncentracije vareniklina: (1) $1,0 \cdot 10^{-8}$ M; (2) $2,0 \cdot 10^{-8}$ M; (3) $3,0 \cdot 10^{-8}$ M; (4) $5,0 \cdot 10^{-8}$ M; (5) $7,0 \cdot 10^{-8}$ M; (6) $9,0 \cdot 10^{-8}$ M; (7) $1,4 \cdot 10^{-7}$ M; (8) $1,5 \cdot 10^{-7}$ M. AdSSWV parametri: amplituda pulsa 50 mV; širina pulsa 5 ms; frekvencija 100 Hz, vreme akumulacije 8 s i potencijal akumulacije -0,4 V.



Slika 47. Reprezentativni AdSSW voltamogrami dobijeni u Briton-Robinsonovom puferu pH = 8,0 za koncentracije vareniklina: (1) $1,5 \cdot 10^{-8}$ M; (2) $1,8 \cdot 10^{-8}$ M; (3) $2,0 \cdot 10^{-8}$ M; (4) $2,5 \cdot 10^{-8}$ M; (5) $4,0 \cdot 10^{-8}$ M; (6) $6,0 \cdot 10^{-8}$ M; (7) $8,0 \cdot 10^{-8}$ M; (8) $1,0 \cdot 10^{-7}$ M, (9) $1,2 \cdot 10^{-7}$ M, (10) $1,4 \cdot 10^{-7}$ M. AdSSWV parametri: amplituda pulsa 50 mV; širina pulsa 5 ms; frekvencija 100 Hz, vreme akumulacije 10 s i potencijal akumulacije -0,6 V.

Dobijena je linearna zavisnost $I_p = f(C)$ u opsegu koncentracija $1,0 \cdot 10^{-8} - 1,6 \cdot 10^{-7}$ M VAR pri pH = 5,0 (Briton-Robinsonov pufer); koja je predstavljena jednačinom prave $I_p(\mu\text{A}) = 0,0693 + 2,956 \cdot 10^7 C(\text{M})$ ($R = 0,9993$). Odgovarajući limit detekcije i limit kvantifikacije iznose $LOD = 2,71 \cdot 10^{-9}$ M i $LOQ = 9,10 \cdot 10^{-9}$ M (**Tabela 9**).

Metodom AdSSWV/HMDE pri pH = 8,0 (Briton-Robinsonov pufer) dobijena je linearna zavisnost intenziteta struje pika od koncentracije u opsegu od $1,5 \cdot 10^{-8} - 1,5 \cdot 10^{-7}$ M VAR. Odavde je dobijena odgovarajuća regresiona jednačina $I_p(\mu\text{A}) = -4,8171 + 3,316 \cdot 10^8 C(\text{M})$ ($R = 0,9987$), kao i limit detekcije i limit kvantifikacije, $LOD = 4,00 \cdot 10^{-9}$ M i $LOQ = 1,30 \cdot 10^{-8}$ M (**Tabela 9**).

Poređenjem dobijenih rezultata primenom AdSSWV/HMDE pri pH 5,0 i 8,0 može se zaključiti da je veća osetljivost postignuta u blago kiselj sredini (dobijena nešto niža vrednost LOD), te se i niže koncentracije VAR mogu određivati sa dovoljnom pouzdanošću (u skladu sa dobijenom nižom vrednošću LOQ).

Preliminarna ispitivanja sa uzorcima krvne plazme ukazala su na visoki nivo kapacitivne struje, što upućuje na interferencije komponenti samog uzorka preostalih nakon uklanjanja proteina, a pre opterećivanja vareniklinom, i to na potencijalu bliskom potencijalu pika VAR. Iz tog razloga, HMDE nije korišćena za određivanje vareniklina u uzorku plazme.

4.2.1.2.2. Validacija metode SWV/GCE za određivanje vareniklina u opterećenom uzorku krvne plazme

Upotrebom GCE i primenom voltometrije pravougaonih talasa sa obogaćivanjem i rastvaranjem (AdSSWV), za redukcionu pik ($E_p = -0,50$ V) pri pH = 4,0 (Briton-Robinsonov pufer) i pik ($E_p = -0,80$ V) na pH = 8,0; dobijena je linearna zavisnost intenziteta struje pika od koncentracije u istom opsegu od $2,0 \cdot 10^{-6} - 8,0 \cdot 10^{-6}$ M VAR. Pomenute zavisnosti opisuju odgovarajuće regresione jednačine: $I_p(\mu A) = 1,5140 + 2,304 \cdot 10^6 C(M)$ ($R = 0,9956$) u blago kiselj sredini i $I_p(\mu A) = -14,858 + 2,284 \cdot 10^7 C(M)$ ($R = 0,9970$) u blago baznoj sredini. Odavde su dobijene odgovarajuće vrednosti limita detekcije i limita kvantifikacije, $LOD = 7,20 \cdot 10^{-7}$ M i $LOQ = 2,40 \cdot 10^{-6}$ M pri pH = 4,0; a pri pH = 8,0 dobijeno je $LOD = 7,32 \cdot 10^{-7}$ M i $LOQ = 2,40 \cdot 10^{-6}$ M (**Tabela 9.**). S obzirom da su ove vrednosti približno iste, može se konstatovati da će se za određivanje primenom AdSSWV/GCE birati ona pH vrednost koja je u skladu sa vrstom uzorka.

Nakon postavljenih optimizovanih metoda za određivanje VAR u puferskim rastvorima, primenljivost metoda proverena je u uzorcima humane plazme zdravih dobrovoljaca opterećenih standardom VAR. S obzirom na vrstu uzorka (matriksa), izvedena su preliminarna ispitivanja koja su podrazumevala primenu adsorptivne SWV i koja su pokazala visok nivo kapacitivne struje, što znači da dolazi do izvesne adsorpcije komponenata plazme preostalih nakon uklanjanja proteina, a pre opterećivanja

vareniklinom, i to na potencijalu bliskom potencijalu pika redukcije VAR. Iz tog razloga, za određivanje u uzorku plazme primenjena je SWV bez adsorpcije na čvrstoj elektrodi.

Statistički parametri dobijeni primenom SWV uz upotrebu GCE za određivanje VAR u uzorku plazme opterećenom rastućim nivoima koncentracija vareniklina pod istim uslovima kao i sami puferski rastvori, prikazani su u **Tabeli 10**.

Za određivanje VAR primenom SWV/GCE pri pH = 4,0; dobijena je jednačina kalibracione krive $I_p(\mu\text{A}) = -1,395 + 6,104 \cdot 10^6 C(\text{M})$ ($R = 0,9911$) u opsegu koncentracija $3,30 \cdot 10^{-6} - 1,10 \cdot 10^{-5}$ M. Odgovarajući limit detekcije i limit kvantifikacije iznose $9,70 \cdot 10^{-7}$ M i $3,20 \cdot 10^{-6}$ M.

Preciznost metode iskazana je putem *RSD* (%) vrednosti i za GCE iznosi 4,8 %, a za ponovljivost metode dobijeno je 3,8 %.

Ispitujući robusnost metode, analiziran je uticaj malih promena parametara kao što su: pH vrednost rastvora, amplituda i širina pulsa, uticaj brzine promene potencijala na intenzitet struje pika. Rezultati su ukazali na najveće promene intenziteta struje pika sa promenom pH vrednosti.

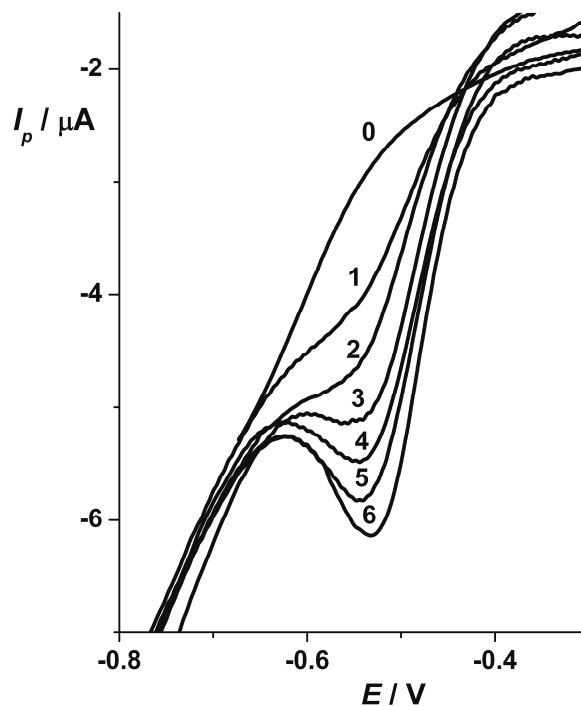
Tačnost i primenljivost predložene SWV/GCE metode za određivanje vareniklina, proverena je određivanjem VAR u pripremljenom uzorku doziranog oblika, Champix[®] tableta (Pfizer Inc.) kojim je opterećen uzorak krvne plazme.

U **Tabeli 11**, prikazani su rezultati tačnosti (*recovery* (%)) i preciznosti (*RSD* (%)) predložene SWV metode uz upotrebu GCE za određivanje VAR u uzorcima krvne plazme opterećenim (A) rastvorom standarda VAR i (B) pripremljenim rastvorom Champix[®] tableta. Za odabrane koncentracije rastvora standarda/tableta, $5,5 \cdot 10^{-6}$ M i $8,3 \cdot 10^{-6}$ M VAR, kojima su opterećivani uzorci, dobijene su odgovarajuće *recovery* (%) vrednosti: za GCE 103,0 % i 101,0 %, u slučaju VAR standarda, dok je u slučaju tableta dobijeno 101,0 % i 104,0 %. Osim tačnosti, utvrđena je i preciznost *RSD* (%) određivanja i to: za standard VAR uz primenu GCE 1,01 % i 1,98 %; a za tablete 1,58 % i 1,45 %.

4.2.1.2.3. Validacija metode SWV/BDDE za određivanje vareniklina u opterećenom uzorku krvne plazme

Primenom voltametrije pravougaonih talasa (SWV) na BDDE, praćenjem redukcionog pika ($E_p = -0,53$ V) na pH = 3,5 (Briton-Robinsonov pufer), proistekla je regresiona jednačina $I_p(\mu\text{A}) = 0,0407 + 1,889 \cdot 10^5 C(\text{M})$ ($R = 0,9982$) u opsegu koncentracija $5,00 \cdot 10^{-7} - 5,00 \cdot 10^{-6}$ M VAR. Za ovo određivanje dobijeni su $LOD = 1,50 \cdot 10^{-7}$ M i $LOQ = 5,00 \cdot 10^{-7}$ M (Tabela 9.).

Primenom SWV na BDDE pri pH = 3,5 (Briton-Robinsonov pufer) snimljeni su voltamogrami uzorka plazme opterećenog standardom vareniklina rastućim nivoima koncentracija, a reprezentativni voltamogrami predstavljeni su na Slika 48.



Slika 48. Reprezentativni SW voltamogrami dobijeni upotrebom BDDE u uzorku plazme opterećenog rastućim nivoima koncentracija VAR: (0) *blank* - neopterećen uzorak; (1) $2,8 \cdot 10^{-6}$ M; (2) $4,0 \cdot 10^{-6}$ M; (3) $5,5 \cdot 10^{-6}$ M; (4) $8,0 \cdot 10^{-6}$ M; (5) $1,1 \cdot 10^{-5}$ M; (6) $1,4 \cdot 10^{-5}$ M; pri pH = 3,5 (Briton-Robinsonov pufer). SWV parametri: amplituda pulsa 50 mV; širina pulsa 5 ms; frekvencija 100 Hz.

Linearna zavisnost intenziteta struje pika od koncentracije dobijena je u opsegu $2,80 \cdot 10^{-6} - 1,40 \cdot 10^{-5}$ M VAR, što je predstavljeno regresionom jednačinom $I_p(\mu\text{A}) = -0,182 + 0,651 \cdot 10^6 C(\text{M})$ ($R = 0,9976$). Odgovarajući limit detekcije iznosi $LOD = 7,20 \cdot 10^{-7}$ M, a limit kvantifikacije $LOQ = 2,40 \cdot 10^{-6}$ M (**Tabela 10.**).

Utvrđena je preciznost metode i izražena putem RSD (%) koja iznosi 2,4 %, dok je za ponovljivost dobijeno 2,2 %. Proveravajući robusnost metode, ispitivan je uticaj malih promena parametara kao što su: pH vrednost, amplituda i širina pulsa, uticaj brzine promene potencijala na intenzitet struje pika. Dobijeni rezultati ukazali su na najveće promene intenziteta struje sa promenom pH vrednosti.

Primenljivost i tačnost predložene SWV/BDDE metode za određivanje vareniklina, proverena je putem pripremljenog uzorka doziranog oblika vareniklina, Champix[®] tableta (Pfizer Inc.) kojim je opterećivan uzorak krvne plazme.

Rezultati tačnosti (*recovery* (%)) i preciznosti (RSD (%)) predložene SW voltametrijske metode uz upotrebu BDDE za određivanje VAR u uzorcima krvne plazme opterećenim (A) rastvorom standarda VAR i (B) pripremljenim rastvorom Champix[®] tableta dati su u **Tabeli 11.** Odabranim koncentracijama rastvora standarda/tableta, $5,5 \cdot 10^{-6}$ M i $8,3 \cdot 10^{-6}$ M VAR opterećeni su uzorci plazme. Dobijene su odgovarajuće *recovery* (%) vrednosti 102,0 % i 100,2 % u slučaju VAR standarda, dok je u slučaju tableta dobijeno 99,8 % i 101,7 %. Pored tačnosti, utvrđena je i preciznost RSD (%) metode određivanja i to: za standard VAR dobijeno je 0,49 % i 0,83 %; a za tablete 0,76 % i 0,87 %.

Tabela 9. Statistički parametri određivanja VAR odgovarajućom voltometrijskom metodom SWV/AdSSWV uz primenu različitih radnih elektroda: HMDE, GCE i BDDE.

| <i>Metoda/ elektroda</i> | <i>pH</i> | <i>E_p</i> (V) | <i>Opseg koncentracija linearne zavisnosti (M)</i> | <i>Regresiona jednačina I_p (μA), C (M)</i> | <i>S_a</i> (μA) | <i>R</i> | <i>SD</i> (μA) | <i>LOD</i> (M) | <i>LOQ</i> (M) |
|------------------------------|-----------|-----------------------------|--|---|------------------------------|----------|-------------------|----------------------|----------------------|
| AdSSWV/ HMDE | 5,0 | -0,53 | $1,00 \cdot 10^{-8} - 1,60 \cdot 10^{-7}$ | $I_p = 0,0693 + 2,956 \cdot 10^7 C$ | 0,0268 | 0,9993 | 0,0557 | $2,71 \cdot 10^{-9}$ | $9,10 \cdot 10^{-9}$ |
| | 8,0 | -0,73 | $1,50 \cdot 10^{-8} - 1,50 \cdot 10^{-7}$ | $I_p = -4,8171 + 3,316 \cdot 10^8 C$ | 0,4422 | 0,9987 | 0,5850 | $4,00 \cdot 10^{-9}$ | $1,30 \cdot 10^{-8}$ |
| AdSSWV/ GCE | 4,0 | -0,50 | $2,00 \cdot 10^{-6} - 8,00 \cdot 10^{-6}$ | $I_p = 1,5140 + 2,304 \cdot 10^6 C$ | 0,5533 | 0,9956 | 0,6747 | $7,20 \cdot 10^{-7}$ | $2,40 \cdot 10^{-6}$ |
| | 8,0 | -0,80 | $2,00 \cdot 10^{-6} - 8,00 \cdot 10^{-6}$ | $I_p = -14,858 + 2,284 \cdot 10^7 C$ | 0,5576 | 0,9970 | 4,7250 | $7,32 \cdot 10^{-7}$ | $2,40 \cdot 10^{-6}$ |
| SWV/ BDDE | 3,5 | -0,53 | $5,00 \cdot 10^{-7} - 5,00 \cdot 10^{-6}$ | $I_p = 0,0407 + 1,889 \cdot 10^5 C$ | 0,0095 | 0,9982 | 0,0195 | $1,50 \cdot 10^{-7}$ | $5,00 \cdot 10^{-7}$ |

S_a – standardna devijacija odsečka, *R* – koeficijent korelacije, *SD* – standardna devijacija, *LOD* – limit detekcije, *LOQ* – limit kvantifikacije.

Tabela 10. Statistički parametri validacije određivanja VAR primenom SWVna GCE ili BDDE u opterećenom uzorku krvne plazme.

| <i>Metoda/ elektroda</i> | <i>pH</i> | <i>E_p</i> (V) | <i>Opseg koncentracija linearne zavisnosti (M)</i> | <i>Regresiona jednačina I_p (μA), C (M)</i> | <i>S_a</i> (μA) | <i>R</i> | <i>SD</i> (μA) | <i>LOD</i> (M) | <i>LOQ</i> (M) |
|------------------------------|-----------|-----------------------------|--|---|------------------------------|----------|-------------------|----------------------|----------------------|
| SWV/ GCE | 4,0 | -0,50 | $3,30 \cdot 10^{-6} - 1,10 \cdot 10^{-5}$ | $I_p = -1,395 + 6,104 \cdot 10^6 C$ | 1,9736 | 0,9911 | 0,7533 | $9,70 \cdot 10^{-7}$ | $3,20 \cdot 10^{-6}$ |
| SWV/ BDDE | 3,5 | -0,53 | $2,80 \cdot 10^{-6} - 1,40 \cdot 10^{-5}$ | $I_p = -0,182 + 0,651 \cdot 10^6 C$ | 0,1562 | 0,9976 | 0,0571 | $7,20 \cdot 10^{-7}$ | $2,40 \cdot 10^{-6}$ |

S_a – standardna devijacija odsečka, *R* – koeficijent korelacije, *SD* – standardna devijacija, *LOD* – limit detekcije, *LOQ* – limit kvantifikacije.

Tabela 11. Tačnost (*recovery*(%)) i preciznost (*RSD* (%)) predloženih voltametrijskih metoda (SWV/GCE i SWV/BDDE) za određivanje VAR u uzorcima krvne plazme opterećenim (A) rastvorom standarda VAR, (B) pripremljenim rastvorom Champix® tableta.

| A | | | | | | B | | | | |
|----------------------|---------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|--------------------|---------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|--------------------|
| <i>Metoda</i> | <i>Uzorak</i> | <i>Dodato (10⁻⁶ M)</i> | <i>Nadeno (10⁻⁶ M)</i> | <i>Recovery (%)</i> | <i>RSD (%)</i> | <i>Uzorak</i> | <i>Dodato (10⁻⁶ M)</i> | <i>Nadeno (10⁻⁶ M)</i> | <i>Recovery (%)</i> | <i>RSD (%)</i> |
| SWV/ GCE | VAR | 5,50 | 5,73; 5,70; 5,62 | 103,0 | 1,01 | Champix® tablete | 5,50 | 5,48; 5,62; 5,52 | 101,0 | 1,58 |
| | standard | 8,30 | 8,45; 8,25; 8,58 | 101,0 | 1,98 | | 8,30 | 8,70; 8,57; 8,78 | 104,0 | 1,45 |
| SWV/ BDDE | VAR | 5,50 | 5,65; 5,62; 5,67 | 102,0 | 0,49 | Champix® tablete | 5,50 | 5,48; 5,50; 5,51 | 99,8 | 0,76 |
| | standard | 8,30 | 1,39; 1,40; 1,42 | 100,2 | 0,83 | | 8,30 | 8,52; 8,39; 8,42 | 101,7 | 0,87 |

4.2.2. Voltametrijsko određivanje brimonidina

Za određivanje BRIM odabrana je diferencijalno pulsna voltametrija (*Differential Pulse Voltammetry*, DPV) i voltametrija pravougaonih talasa (*Square Wave Voltammetry*, SWV) uz upotrebu BDDE. Uz primenu GCE, za određivanje brimonidina izabrana je diferencijalno pulsna voltametrijska (DPV) tehnika.

4.2.2.1. Optimizacija metoda za određivanje brimonidina

Postupak optimizacije parametara sa ciljem postavljanja elektroanalitičke metode obuhvatao je ispitivanje: amplitude pulsa ($\Delta E_{sw}/mV$), širine pulsa (trajanje potencijalnog stepena, t_p/s), efektivne brzine promene potencijala ($v_{eff}/mV s^{-1}$) odnosno frekvencije oscilacija (f/Hz), kao i izbor optimalne pH vrednosti u odnosu na odgovarajući oblik i intenzitet struje pika.

4.2.2.1.1. Optimizacija DPV/BDDE i SWV/BDDE metode za određivanje brimonidina

Optimizacija DPV/BDDE metode obuhvatala je variranje sledećih parametara: amplitude pulsa ($\Delta E_{pulsas} = 25; 50$ ili 100 mV), širine pulsa ($t_{pulsas} = 50, 75$ ili 100 ms), trajanja celog perioda (trajanje saopštenog pulsa do narednog) ($t_{step} = 0,5; 1$ ili 5 s) i stepena potencijala ($\Delta E_{step} = 5, 10$ ili 15 mV) odnosno efektivne brzine promene potencijala ($v_{eff} = 1 - 30$ mV s⁻¹).

Izabrani su optimalni DPV parametri: amplituda pulsa, 100 mV; širina pulsa, 75 ms; i efektivna brzina promene potencijala, 30 mV s⁻¹.

Za SWV/BDDE metodu varirani su sledeći parametri: amplituda pulsa ($\Delta E_{sw} = 25, 50$ ili 100 mV), vreme trajanja pulsa ($t_p = 25, 50$ ili 100 ms) odnosno frekvencija ($f = 1/2t_p = 20, 10$ ili 5 Hz), stepen povećanja potencijala ($\Delta E_{step} = 5$ ili 10 mV) odnosno efektivna brzina promene potencijala ($v_{eff} = 50 - 400$ mV s⁻¹).

Izabrane su sledeće optimalne vrednosti SWV parametara: amplituda pulsa 100 mV, širina pulsa 100 ms, frekvencija 10 Hz, stepen povećanja potencijala 5 mV odnosno efektivna brzina promene potencijala $v_{eff} = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Na osnovu odgovarajućeg oblika i intenziteta struje katodnog pika dobijenog primenom ciklične voltametrije, odabrana je optimalna pH vrednost (0,1 M H₂SO₄) za određivanje brimonidina DPV/BDDE odnosno SWV/BDDE metodom.

S obzirom na specifičnost uzorka – očna vodica, kao i da je u njemu bilo adekvatnije zasnovati određivanje na oksidacionom piku (svojstvenom samo brimonidinu), metoda DPV/BDDE dodatno je optimizovana. Izabrani su optimalni DPV parametri: amplituda pulsa, 50 mV; širina pulsa, 50 ms; i efektivna brzina promene potencijala, 50 mV s⁻¹.

4.2.2.1.2. Optimizacija DPV/GCE metode za određivanje brimonidina

Tokom optimizacije DPV/GCE metode varirani su sledeći parametri: amplituda pulsa ($\Delta E_{pulsa} = 25; 40 \text{ ili } 50 \text{ mV}$), širina pulsa ($t_{pulsa} = 10; 50 \text{ i } 100 \text{ ms}$), trajanje celog perioda (trajanja saopštenog pulsa do narednog) ($t_{step} = 0,5; 1 \text{ ili } 5 \text{ s}$) i stepen potencijala ($\Delta E_{step} = 2; 5 \text{ ili } 10 \text{ mV}$) odnosno efektivna brzina promene potencijala ($v_{eff} = 1 - 20 \text{ mV s}^{-1}$).

Izabrani optimalni DPV parametri jesu: amplituda pulsa, 50 mV; širina pulsa, 50 ms; i efektivna brzina promene potencijala, 5 mV s⁻¹.

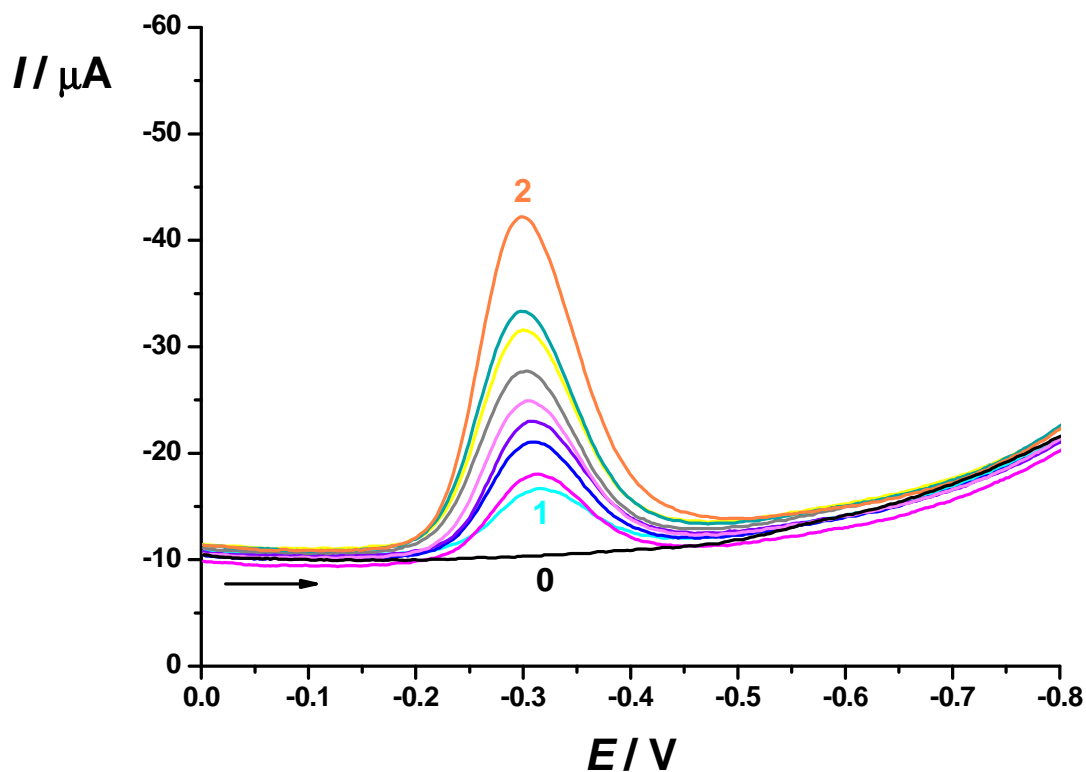
Optimalna pH vrednost (fosfatni pufer pH = 6,0) izabrana je na osnovu odgovarajućeg oblika i intenziteta struje katodnog pika dobijenog primenom ciklične voltametrije.

4.2.2.2. Validacija metoda za određivanje brimonidina

4.2.2.2.1. Validacija DPV/BDDE i SWV/BDDE metode za određivanje brimonidina u doziranom obliku

Za određivanje brimonidina u puferu i doziranom obliku – kapima za oči, uspešno su primenjene dve voltametrijske tehnike uz korišćenje BDD elektrode kao radne: diferencijalno pulsna voltometrija (DPV) i voltometrija pravougaonih talasa (SWV). Obe pulsne tehnike odlikuju se izuzetnom brzinom izvođenja i niskim limitom detekcije.

Detaljno ispitivanje uticaja pH vrednosti rastvora ukazalo je na najbolju diferenciranost katodnog pika ($E_p \sim -0,3$ V), kao i na najveći intenzitet struje pika u kiseloj oblasti (0,1 M H₂SO₄). Elektroanalitičko određivanje brimonidina zasnovano je



Slika 49. Reprezentativni DP voltamogrami na BDDE: (0) 0,1 M H₂SO₄; i odgovarajućih koncentracija u opsegu od (1) $2,0 \cdot 10^{-6}$ M do (2) $3,0 \cdot 10^{-5}$ M BRIM (0,1 M H₂SO₄).

upravo na ovom katodnom piku, a reprezentativni DP voltamogrami u opsegu koncentracija od $2,0 \cdot 10^{-6} - 3,0 \cdot 10^{-5}$ M BRIM prikazani su na **Slici 49**.

U **Tabeli 12**, prikazani su odgovarajući statistički parametri za elektroanalitičko određivanje BRIM primenom DPV i SWV metode (0,1 M H₂SO₄).

Primenom DPV metode dobijena je linearna zavisnost signala – intenziteta struje katodnog pika od koncentracije u opsegu od $2,00 \cdot 10^{-6} - 3,00 \cdot 10^{-5}$ M BRIM, koja je predstavljena regresionom jednačinom $I_p(\mu\text{A}) = 0,553 + 1,018 \cdot 10^6 C(\text{M})$ ($R = 0,9989$). Odgovarajući statistički parametri iznose: limit detekcije $LOD = 6,31 \cdot 10^{-7}$ M i limit kvantifikacije $LOQ = 2,10 \cdot 10^{-6}$ M (**Tabela 12.**)

Primenom SWV metode na BDDE za određivanje BRIM, dobijena je linearna zavisnost intenziteta struje pika od koncentracije u opsegu od $5,00 \cdot 10^{-7} - 1,50 \cdot 10^{-5}$ M, koja je predstavljena regresionom jednačinom $I_p(\mu\text{A}) = -0,015 + 0,713 \cdot 10^6 C(\text{M})$, sa koeficijentom korelacije, $R = 0,9998$. Dobijeni limit detekcije iznosi $LOD = 1,28 \cdot 10^{-7}$ M, a limit kvantifikacije, $LOQ = 4,28 \cdot 10^{-7}$ M (**Tabela 12.**).

Tabela 12. Statistički parametri DPV/BDDE i SWV/BDDE metoda za određivanje BRIM (0,1 M H₂SO₄).

| <i>Metoda/ elektroda</i> | <i>pH</i> | <i>Opseg koncentracija linearne zavisnosti (M)</i> | <i>Regresiona jednačina I_p (μA), C (M)</i> | <i>S_a (μA)</i> | <i>R</i> | <i>SD (μA)</i> | <i>LOD (M)</i> | <i>LOQ (M)</i> |
|------------------------------|-----------|--|---|--|----------|------------------------------------|----------------------|----------------------|
| DPV/ BDDE | 1,0 | $2,00 \cdot 10^{-6} - 3,00 \cdot 10^{-5}$ | $I_p = 0,553 + 1,018 \cdot 10^6 C$ | 0,2141 | 0,9989 | 0,4404 | $6,31 \cdot 10^{-7}$ | $2,10 \cdot 10^{-6}$ |
| SWV/ BDDE | 1,0 | $5,00 \cdot 10^{-7} - 1,50 \cdot 10^{-5}$ | $I_p = -0,015 + 0,713 \cdot 10^6 C$ | 0,0304 | 0,9998 | 0,0549 | $1,28 \cdot 10^{-7}$ | $4,28 \cdot 10^{-7}$ |

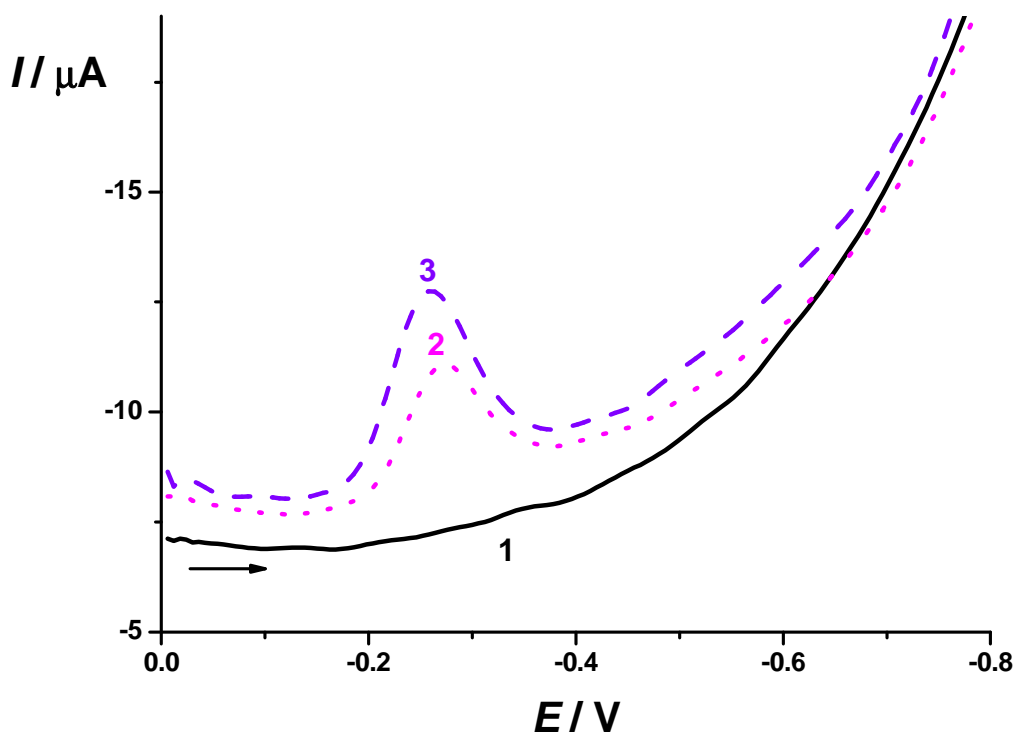
S_a – standardna devijacija odsečka, R – koeficijent korelacije, SD – standardna devijacija,

LOD – limit detekcije, LOQ – limit kvantifikacije.

Tačnost i preciznost određivanja DPV/BDDE metodom procenjene su na osnovu uzastopnog petostrukog merenja ($n = 5$) za dve odabrane koncentracije sa kalibracione krive, $2,00 \cdot 10^{-6}$ M i $1,00 \cdot 10^{-5}$ M BRIM. *Intra-day* preciznost (preciznost tokom jednog dana) metode izražena je putem relativne standardne devijacije (*RSD*) i iznosi 0,10 % za veću odabranu koncentraciju, a manja preciznost dobijena je za nižu odabranu koncentraciju i iznosi 3,65 %. *Inter-day* preciznost (preciznost tokom tri uzastopna dana) proverena je takođe za dve odabrane koncentracije sa kalibracione krive, $2,00 \cdot 10^{-6}$ i $1,00 \cdot 10^{-5}$ M, i dobijene su vrednosti *RSD* = 2,57 % za nižu i *RSD* = 0,98 % za višu koncentraciju. *Intra-day* tačnost izražena je procentnim prinosom odnosno vrednošću *recovery* (%) i za nižu koncentraciju iznosi 94,00 %, a za višu 101,00 %. Proverom *Inter-day* tačnosti dobijeni su sledeći rezultati: *recovery* (%) = 95,50 % za nisku koncentraciju i *recovery* (%) = 99,90 % za visoku koncentraciju.

Za SWV/BDDE metodu proverena je preciznost u toku jednog dana (*Intra-day* preciznost) za dve izdvojene koncentracije sa kalibracione krive ($2,00 \cdot 10^{-6}$ M i $1,00 \cdot 10^{-5}$ M BRIM) putem pet uzastopnih merenja ($n = 5$) i izražena kroz relativnu standardnu devijaciju, *RSD* = 0,78 % za višu koncentraciju, odnosno *RSD* = 4,55 % za nižu koncentraciju. Takođe, ispitana je preciznost i u toku tri uzastopna dana (*Inter-day* preciznost), te su dobijene relativne standardne devijacije, *RSD* = 0,97 % za nižu koncentraciju, odnosno *RSD* = 2,57 % za višu koncentraciju. *Intra-day* tačnost iznosi *recovery* (%) = 99,00 % za nižu koncentraciju, dok je za višu koncentraciju manja tačnost i iznosi *recovery* (%) = 91,00 %. *Inter-day* tačnost iznosi za nižu koncentraciju *recovery* (%) = 99,50 %, odnosno *recovery* (%) = 89,70 % za višu koncentraciju.

Provera primenljivosti metoda DPV/BDDE i SWV/BDDE (0,1 M H₂SO₄) za određivanje BRIM u doziranom obliku – kapima za oči, Alphagan® urađena je metodom standardnog dodatka. Na **Slika 50.** prikazani su odgovarajući SW voltamogrami.



Slika 50. SW voltamogrami na BDDE za (1) 0,1 M H₂SO₄, (2) Alphagan[®] dozirani oblik (kapi za oči) (0,1 M H₂SO₄), (3) nakon dodatka rastvora 2,5 · 10⁻⁶ M BRIM standarda u prethodni rastvor (2).

Preciznost određivanja BRIM u kapima za oči, Alphagan[®], slična je kod obe primenjene metode: za DPV iznosi *RSD* = 3,82 %, a za SWV iznosi *RSD* = 2,14 %, kao i tačnost koja za prvu metodu iznosi *recovery* (%) = 98,00 %, a za drugu *recovery* (%) = 102,00 % (**Tabela 13.**).

Tabela 13. Tačnost (*recovery* (%)) i preciznost (*RSD* (%)) predloženih voltametrijskih metoda (DPV/BDDE i SWV/BDDE) za određivanje BRIM u doziranom obliku Alphagan[®] (kapima za oči) (*n* = 5).

| <i>Uzorak</i> | <i>Metoda</i> | <i>Dodato (M)</i> | <i>Izmereno (M)</i> | <i>Preciznost, RSD (%)</i> | <i>Recovery (%)</i> |
|-----------------------|---------------|------------------------|-------------------------|----------------------------|---------------------|
| Alphagan [®] | DPV | 5,5 · 10 ⁻⁶ | 5,34 · 10 ⁻⁶ | 3,82 | 98,00 |
| | SWV | 5,5 · 10 ⁻⁶ | 5,60 · 10 ⁻⁶ | 2,14 | 102,00 |

4.2.2.2.2. Validacija DPV/GCE metode za određivanje brimonidina u doziranom obliku

Elektroanalitičko određivanje brimonidina, primenom GCE i diferencijalne pulsne voltametrije (DPV) pri pH = 6,2 u fosfatnom puferu, zasnovano je na dobro diferenciranom katodnom piku ($E_p = -0,54$ V).

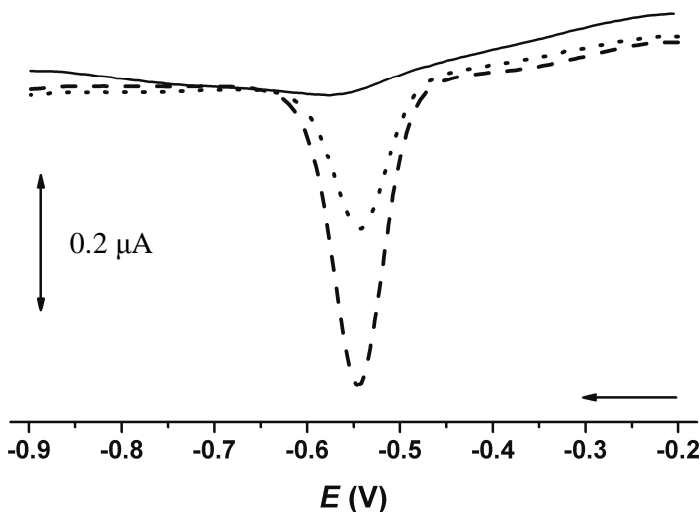
Linearna zavisnost $I_p = f(C)$ dobijena je u opsegu koncentracija $5,00 \cdot 10^{-7}$ M do $5,00 \cdot 10^{-6}$ M BRIM, a odgovarajuća regresiona jednačina jeste: I_p (μ A) = - 0,296 - $0,145 \cdot 10^6 C$ (M) ($R = 0,9983$). Odavde su izračunati limit detekcije (LOD) i limit kvantifikacije (LOQ) koji iznose: $LOD = 1,60 \cdot 10^{-7}$ M i $LOQ = 5,30 \cdot 10^{-7}$ M (**Tabela 14.**).

Tabela 14. Statistički parametri određivanja BRIM primenom DPV/GCE pri pH = 6,2 (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄).

| <i>Metoda/ elektroda</i> | <i>pH</i> | <i>Opseg koncentracija linearne zavisnosti (M)</i> | <i>Regresiona jednačina I_p (μA), C (M)</i> | <i>S_a (μA)</i> | <i>R</i> | <i>LOD (M)</i> | <i>LOQ (M)</i> |
|------------------------------|-----------|--|---|--|-----------------------|----------------------|----------------------|
| DPV/ GCE | 6,2 | $5,00 \cdot 10^{-7} - 5,00 \cdot 10^{-6}$ | $I_p = -0,296 - 0,145 \cdot 10^6 C$ | 0,0077 | 0,9983 | $1,60 \cdot 10^{-7}$ | $5,30 \cdot 10^{-7}$ |

S_a – standardna devijacija odsečka, R – koeficijent korelacije, LOD – limit detekcije, LOQ – limit kvantifikacije.

Primenljivost postavljene voltametrijske metode proverena je u doziranom obliku – kapima za oči Alphagan® (0,2 % brimonidin-tartarat, Allergan, Irska), metodom standardnog dodatka (**Slika 51.**) (kao i prethodno u slučaju BDDE). Za dodatu količinu Alphagan® kapi za oči koja odgovara ukupnoj koncentraciji $1,00 \cdot 10^{-6}$ M BRIM u elektrohemijskoj ćeliji, nađeno je $0,97 \cdot 10^{-6}$ M BRIM (**Tabela 15.**).



Slika 51. DP voltamogrami (—) fosfatnog pufera pH = 6,2; (····) nakon dodatka Alphagan® kapi za oči; (---) nakon dodatka standardnog rastvora BRIM koja odgovara koncentraciji $1,00 \cdot 10^{-6}$ M BRIM u prethodni rastvor (-·-·). DPV parametri: amplituda pulsa 50 mV; širina pulsa 50 ms; brzina promene potencijala 5 mV s^{-1} .

Preciznost ovog određivanja proverena je putem 5 ponovljenih merenja ($n = 5$) i izražena relativnom standardnom devijacijom, $RSD = 5,23 \%$. Dobijena vrednost potvrđuje dobru ponovljivost rezultata odnosno određivanja, uzevši u obzir činjenicu da poliranje površine GCE pre svakog merenja jeste (u izvesnoj maloj meri) potencijalni uzrok, promene radne površine elektrode i posledično varijacije u dobijenom analitičkom signalu (intenzitetu struje pika). Tačnost određivanja izražena je putem *recovery* (%) vrednosti i iznosi 97,0 % (**Tabela 15.**). Predložena DPV metoda pokazala je dobru specifičnost i selektivnost zadržavanjem dobro definisanog oblika i konstantnošću položaja pika.

Tabela 15. Preciznost i tačnost određivanja BRIM primenom predložene DPV/GCE metode pri pH = 6,2 (fosfatni pufer) u doziranom obliku - Alphagan® kapima za oči (broj merenja, $n = 5$).

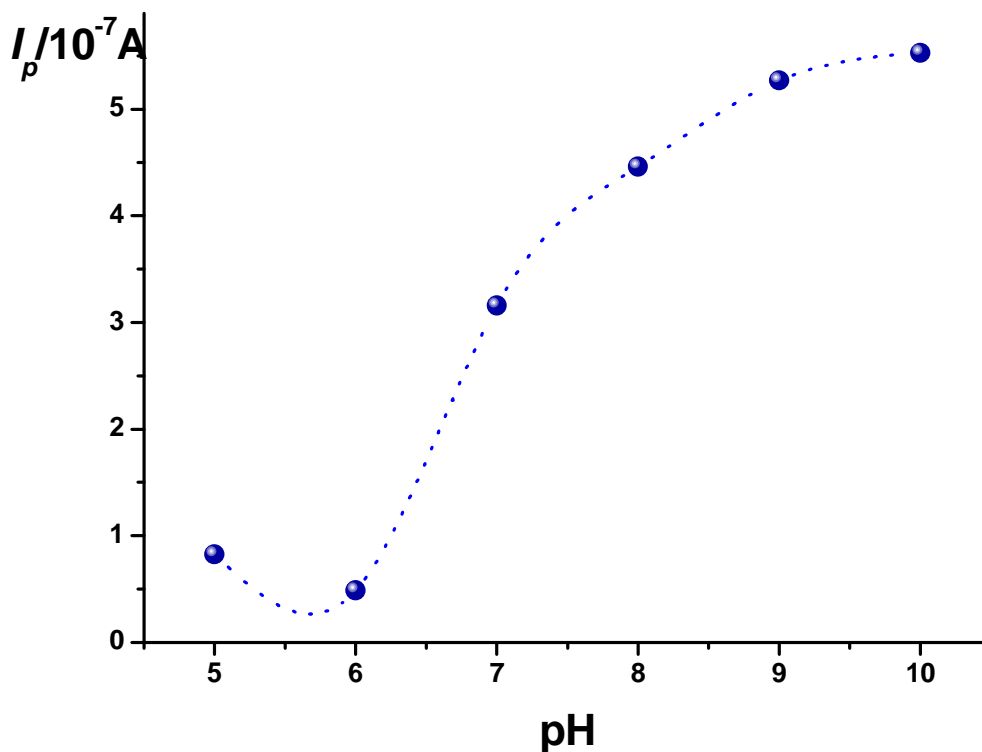
| <i>Uzorak/ analit</i> | <i>Metoda/Elektroda</i> | <i>Dodato (M)</i> | <i>Nađeno (M)</i> | <i>Preciznost, RSD (%)</i> | <i>Recovery (%)</i> |
|---------------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------------|-------------------------|
| Alphagan®/ BRIM | DPV/GCE | $1,00 \cdot 10^{-6}$ | $0,97 \cdot 10^{-6}$ | 5,23 | 97,00 |

RSD – relativna standardna devijacija

4.2.2.2.3. Validacija metode DPV/BDDE za određivanje brimonidina u opterećenom uzorku očne vodice

Za razliku od dosadašnjeg određivanja brimonidina u kiseljoj sredini zasnovanog na redukcionom piku, u skladu sa prirodom (vrstom) biološkog uzorka, određivanje brimonidina u očnoj vodici zasnovano je na oksidacionom piku ($E_p \sim +0,95$ V) u baznom području primenom metode DPV/BDDE.

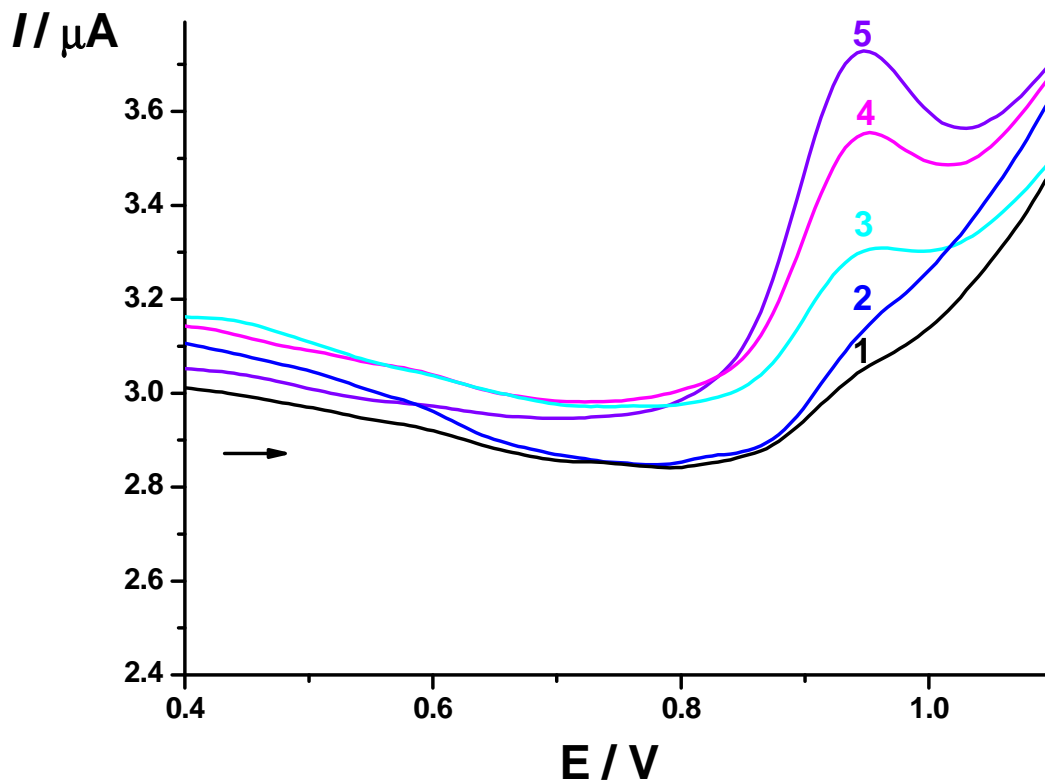
Prethodno je ispitana pH zavisnost intenziteta struje oksidacionog pika DPV metodom u univerzalnom Briton-Robinsonovom puferu (pH = 5,0 - 10,0), odakle je utvrđeno da je oksidacioni pik dobro diferenciran i da su visoke vrednosti struje pika postignute u baznom području (**Slika 52.**).



Slika 52. Zavisnost intenziteta struje anodnog DPV pika $5,00 \cdot 10^{-5}$ M brimonidina od pH (Briton-Robinsonov pufer pH = 5,0 – 10,0).

S obzirom na prirodu uzorka i nastojanje da uzorak ostane u što većoj meri nepromenjen, uključujući i jednu od osnovnih prednosti voltametrijske metode - minimalnu pripremu uzorka, celokupno određivanje BRIM u biološkoj tečnosti (očnoj vodici) vršeno je u fosfatnom puferu ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH = 8,0), inače prirodnoj komponenti pojedinih bioloških tečnosti odgovornoj za regulaciju i održavanje konstantne pH vrednosti.

Na **Slici 53.** prikazani su reprezentativni DP voltamogrami u opsegu koncentracija od $5,00 \cdot 10^{-6}$ - $5,00 \cdot 10^{-5}$ M BRIM pri pH = 8,0 (fosfatni pufer).



Slika 53. Reprezentativni DP voltamogrami anodnog pika BRIM u opsegu koncentracija od (1) $5,0 \cdot 10^{-6}$ do (5) $5,0 \cdot 10^{-5}$ M BRIM u fosfatnom puferu pH = 8,0.

Primenjujući DPV metodu, dobijena je linearna zavisnost intenziteta struje anodnog pika brimonidina od koncentracije u opsegu od $5,00 \cdot 10^{-6}$ - $5,00 \cdot 10^{-5}$ M, što je predstavljeno regresionom jednačinom I_p (10^{-8} A) = $-0,388 + 0,854 \cdot 10^6 C$ (M) ($R = 0,9924$). Odgovarajući statistički parametri iznose: limit detekcije, $LOD = 1,94 \cdot 10^{-6}$ M i limit kvantifikacije, $LOQ = 6,46 \cdot 10^{-6}$ M (**Tabela 16.**).

Tabela 16. Statistički parametri validacije DPV/BDDE metode za određivanje BRIM u opterećenom uzorku očne vodice pri pH = 8,0 (fosfatni pufer).

| <i>Metoda/ elektroda</i> | <i>pH</i> | <i>Opseg koncentracija linearne zavisnosti (M)</i> | <i>Regresiona jednačina I_p (10^{-8} A), C (M)</i> | <i>S_a (10^{-8} A)</i> | <i>R</i> | <i>LOD (M)</i> | <i>LOQ (M)</i> |
|------------------------------|-----------|--|--|--|----------|----------------------|----------------------|
| DPV/ BDDE | 8,0 | $5,00 \cdot 10^{-6} - 5,00 \cdot 10^{-5}$ | $I_p = -0,388 + 0,854 \cdot 10^6 C$ | 0,5517 | 0,9924 | $1,94 \cdot 10^{-6}$ | $6,46 \cdot 10^{-6}$ |

S_a – standardna devijacija odsečka, R – koeficijent korelacije, LOD – limit detekcije, LOQ – limit kvantifikacije.

Rezultati tačnosti (*recovery (%)*) i preciznosti (*RSD (%)*) predložene DPV metode na BDDE za određivanje brimonidina u uzorcima očne vodice opterećenim rastvorom standarda BRIM date su u **Tabeli 17**. *Intra-day* preciznost (preciznost tokom jednog dana) metode određivanja procenjena je na osnovu uzastopnog petostrukog merenja ($n = 5$) za tri odabrane koncentracije ($1,50 \cdot 10^{-5}$; $3,00 \cdot 10^{-5}$ i $5,00 \cdot 10^{-5}$ M BRIM) sa kalibracione krive i izražena putem relativne standardne devijacije (*RSD*) i iznosi 5,38 % za najveću odabranu koncentraciju, a najmanja preciznost dobijena je za najnižu odabranu koncentraciju i inosi 6,68 %. Proverom *Inter-day* preciznosti (preciznost tokom tri uzastopna dana) na osnovu 9 merenja ($n = 9$), dobijene su vrednosti *RSD* = 8,65 % za nižu i *RSD* = 10,09 % za višu koncentraciju. *Intra-day* tačnost izražena je procentnim prinosom odnosno vrednošću *recovery (%)* i za najnižu koncentraciju iznosi 94,73 %, a za najvišu 87,40 %. Proverom *Inter-day* tačnosti dobijeni su sledeći rezultati: *recovery (%)* = 107,33 % za nisku koncentraciju i *recovery (%)* = 94,12 % za visoku koncentraciju.

Tabela 17. Preciznost (*RSD (%)*) i tačnost (*recovery (%)*) primenjene DPV/BDDE metode za određivanje BRIM u opterećenom uzorku očne vodice pri pH = 8,0 (fosfatni pufer).

| <i>Analit</i> | <i>Metoda/ Elektroda</i> | <i>Dodato (M)</i> | <i>Izmereno (M)</i> | <i>Preciznost RSD (%)</i> | <i>Recovery (%)</i> |
|------------------|------------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| BRIM standard | DPV/BDDE | <i>Intra-day (n = 5)</i> | | | |
| | | $1,50 \cdot 10^{-5}$ | $1,42 \cdot 10^{-5}$ | 6,68 | 94,73 |
| | | $3,00 \cdot 10^{-5}$ | $3,18 \cdot 10^{-5}$ | 4,07 | 106,20 |
| | | $5,00 \cdot 10^{-5}$ | $4,36 \cdot 10^{-5}$ | 5,38 | 87,40 |
| | | <i>Inter-day (n = 9)</i> | | | |
| | | $1,50 \cdot 10^{-5}$ | $1,61 \cdot 10^{-5}$ | 8,65 | 107,33 |
| | | $3,00 \cdot 10^{-5}$ | $3,30 \cdot 10^{-5}$ | 11,83 | 110,00 |
| | | $5,00 \cdot 10^{-5}$ | $4,71 \cdot 10^{-5}$ | 10,09 | 94,12 |

Kratkoročna stabilnost (*Short term stability*) proverena je putem tri odabrane koncentracije sa kalibracione krive: $1,50 \cdot 10^{-5}$ M; $3,00 \cdot 10^{-5}$ M i $5,00 \cdot 10^{-5}$ BRIM na sobnoj temperaturi ($t = 25$ °C) nakon stajanja od 4 sata. Na osnovu 3 merenja ($n = 3$) dobijene su odgovarajuće vrednosti odstupanja (%): za koncentraciju $1,50 \cdot 10^{-5}$ M BRIM iznosi 15,76%, za koncentraciju $3,00 \cdot 10^{-5}$ M BRIM iznosi 1,86% i za koncentraciju $5,00 \cdot 10^{-5}$ M BRIM iznosi 6,18% (**Tabela 18.**).

Tabela 18: Kratkoročna stabilnost (*Short term stability*) (nakon 4h stajanja) primenjene DPV/BDDE metode za određivanje BRIM u opterećenom uzorku očne vode pri pH = 8,0 (fosfatni pufer) ($n = 3$).

| <i>Analit</i> | <i>Metoda/elektroda</i> | <i>Koncentracija (M)</i> | <i>Odstupanje (%)</i> |
|---------------|-------------------------|--------------------------|-----------------------|
| BRIM standard | DPV/BDDE | $1,50 \cdot 10^{-5}$ | 15,76 |
| | | $3,00 \cdot 10^{-5}$ | 1,86 |
| | | $5,00 \cdot 10^{-5}$ | 6,18 |

Dugoročna stabilnost (*Long term stability*) ispitana je u toku čuvanja (zamrznuto) u trajanju od dva meseca na osnovu dve odabrane koncentracije sa kalibracione krive: $3,00 \cdot 10^{-5}$ M i $5,00 \cdot 10^{-5}$ BRIM. Na osnovu merenja (3 merenja svake koncentracije u triplikatu) ($n = 3$) svake koncentracije, dobijene su odgovarajuće vrednosti *odstupanja (%)* na osnovu formule (25): za koncentraciju $3,00 \cdot 10^{-5}$ M BRIM iznosi 1,63% i za koncentraciju $5,00 \cdot 10^{-5}$ M BRIM iznosi 3,56% (**Tabela 19.**).

Tabela 19: Dugoročna stabilnost (*Long term stability*) (nakon dva meseca) primenjene DPV/BDDE metode za određivanje BRIM u opterećenom uzorku očne vodice pri pH = 8,0 (fosfatni pufer) ($n = 3$).

| <i>Analit</i> | <i>Metoda/elektroda</i> | <i>Koncentracija (M)</i> | <i>Odstupanje (%)</i> |
|---------------|-------------------------|--------------------------|-----------------------|
| BRIM Standard | DPV/BDDE | $3,00 \cdot 10^{-5}$ | 1,63 |
| | | $5,00 \cdot 10^{-5}$ | 3,56 |

Rezultati provere stabilnosti analita (3 merenja svake koncentracije u triplikatu) nakon 3 ciklusa **zamrzavanja i odmrzavanja** (*Freeze and thaw stability*) prikazani su u **Tabeli 20.**, odakle se uočava porast *recovery (%)* vrednosti od 106,00% do 127,66% (tj. odstupanja od 6,00% do 27,66%) za koncentraciju $3,00 \cdot 10^{-5}$ M BRIM, odnosno od 95,34% do 129,32% (tj. odstupanja od -4,66% do 29,32%) za koncentraciju $5,00 \cdot 10^{-5}$ M BRIM, polazeći od prvog ka trećem ciklusu.

Tabela 20. Stabilnost analita-brimonidina tokom tri ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja (izražena putem *recovery (%)* vrednosti) primenom DPV/BDDE metode u opterećenom uzorku očne vodice pri pH = 8,0 (fosfatni pufer) (broj merenja $n = 3$).

| <i>Analit</i> | <i>Metoda/Elektroda</i> | <i>Ciklus</i> | <i>Dodato (M)</i> | <i>Izmereno (M)</i> | <i>Recovery (%)</i> |
|---------------|-------------------------|---------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| BRIM standard | DPV/BDDE | I | $3,00 \cdot 10^{-5}$ | $3,18 \cdot 10^{-5}$ | 106,00 |
| | | II | | $3,58 \cdot 10^{-5}$ | 119,53 |
| | | III | | $3,83 \cdot 10^{-5}$ | 127,66 |
| | | I | $5,00 \cdot 10^{-5}$ | $4,77 \cdot 10^{-5}$ | 95,34 |
| | | II | | $6,37 \cdot 10^{-5}$ | 127,52 |
| | | III | | $6,46 \cdot 10^{-5}$ | 129,32 |

4.2.2. Diskusija rezultata kvantitativne analize

Tokom razvoja elektroanalitičkih metoda za određivanje vareniklina, u puferu je primenjena voltometrija pravougaonih talasa sa adsorpcionim obogaćivanjem i rastvaranjem (*Adsorptive Stripping Square Wave Voltammetry*, AdSSWV) uz upotrebu HMDE i GCE, odnosno voltometrija pravougaonih talasa (*Square Wave Voltammetry*, SWV) na BDDE. Izbor adsorptivne tehnike u skladu je sa potvrđenim prisustvom adsorpcije na elektrodama HMDE/GCE, koja nije zabeležena na BDDE (Poglavlje 4.1.3.). Prilikom odabira odgovarajuće voltametrijske tehnike (LSV, DPV ili SWV), osnovni kriterijum bio je najveći intenzitet struje pika na osnovu kojeg je izabrana SWV. Izbor metode može se objasniti visokom osetljivošću SW voltetrije, s obzirom da predstavlja pulsnu tehniku u kojoj se beleži ukupna struja (ΔI) (POGLAVLJE UVOD za SWV). Ovo važi u slučaju kada se radi o reverznom redoks procesu, koji tokom primene CV daje odgovarajući katodni i anodni pik. S obzirom da je određivanje vareniklina zasnovano na reverzibilnom redukcionom piku nastalog uz transfer 2 elektrona, ispunjeni su svi uslovi za postizanje visoke osetljivosti SWV metode. Kako je i visina pika (ΔI odnosno I_{total}) proporcionalna koncentraciji analita, sasvim je opravdan izbor SWV metode za kvantitativnu analizu vareniklina.

Preliminarna ispitivanja na nivou pufera obuhvatala su upotrebu sve tri elektrode (HMDE, GCE, BDDE).

Primeni predloženih metoda u biološkom uzorku (plazmi zdravih dobrovoljaca) prethodila su ispitivanja koja su ukazala na izvesnu adsorpciju komponenata plazme preostalih nakon uklanjanja proteina, a pre opterećivanja vareniklinom, i to na potencijalu bliskom potencijalu katodnog pika vareniklina, naročito na HMDE. Prema tome, s obzirom na vrstu uzorka, za određivanje VAR primenjena je SWV bez adsorpcije i to samo na čvrstim elektrodama, dok je HMDE izostavljena kao radna elektroda.

Analizom statističkih parametara (**Tabela 10.**) za dve primenjene metode SWV/GCE i SWV/BDDE u opterećenom uzorku plazme (na približno istim pH vrednostima), dobijene su nešto niže (bolje) vrednosti u slučaju BDDE: LOD ($7,20 \cdot 10^{-7}$ M) i LOQ ($2,40 \cdot 10^{-6}$ M), sa znatno boljim koeficijentom korelacije ($R = 0,9976$ za BBDE, u odnosu na $R = 0,9911$ za GCE) i standardne devijacije ($SD = 0,0571$ μ A za

BDDE, u odnosu na $SD = 0,7533 \mu\text{A}$ za GCE). Primenljivost ovih metoda proverena je i u doziranom obliku - Champix[®] tabletama, te su dobijene nešto bolje vrednosti za tačnost određivanja ($recovery (\%) = 99,8 \%$ i $101,7 \%$), kao i preciznost ($RSD (\%) = 0,76 \%$ i $0,87 \%$) za BDDE u odnosu na vrednosti dobijene za GCE ($recovery (\%) = 101,0 \%$ i $104,0 \%$ odnosno $RSD (\%) = 1,58 \%$ i $1,45 \%$) (**Tabela 11.**).

Na osnovu izloženog, sledi da se za određivanje VAR u plazmi kao i tabletama, prednost može dati SWV/BDDE metodi, uzimajući u obzir dobijene nešto bolje vrednosti statističkih parametara, kao i jednostavniju i bržu pripremu, manju sklonost ka adsorpciji i lakše čišćenje radne površine, a samim tim i bolju reproduktivnost dobijenih rezultata na BBDE u odnosu na GCE.

Razvoj metoda za određivanje brimonidina, obuhvatao je najpre postavljanje odgovarajućih voltametrijskih metoda u puferu: diferencijalno pulsne voltametrije (*Differential Pulse Voltammetry*, DPV) i voltametrije pravougaonih talasa (*Square Wave Voltammetry*, SWV) uz upotrebu BDDE; odnosno diferencijalno pulsne voltametrije (*Differential Pulse Voltammetry*, DPV) uz primenu GCE. Poredeći dobijene rezultate kroz statističke parametre (**Tabela 12., 14.**), sledi da su najbolje vrednosti dobijene u slučaju SWV/BDDE metode.

Provera primenljivosti predloženih elektroanalitičkih metoda obuhvatila je određivanje brimonidina u doziranom obliku - Alphagan[®] kapima za oči. Tačnost određivanja i preciznost predložene SWV/BDDE metode iskazana kroz vrednosti $recovery (\%) = 102,00 \%$ i $RSD (\%) = 2,14 \%$, takođe izdvaja ovu metodu i na nivou doziranog oblika u odnosu na preostale dve: DPV/BDDE i DPV/GCE (**Tabela 13., 15.**).

Prema izloženom, metoda izbora za određivanje brimonidina u doziranom obliku – kapima za oči bila bi SWV/BDDE. Prednosti SWV/BDDE metode već su izložene u slučaju vareniklina, s obzirom da je određivanje brimonidina zasnovano na istom redukcijom reverzibilnom piku.

Za određivanje brimonidina u biološkom uzorku – očnoj vodici primenjena je DPV/BDDE metoda. Sama priroda i specifičnost uzorka uslovlila je drugačiji pristup u postavljanju odgovarajuće voltametrijske metode za određivanje BRIM u njemu,

prvenstveno izbor radne pH vrednosti najpribližnije fiziološkoj (pH ~ 7,4). Izabrana optimalna pH (za postignut dobar analitički signal) veoma je slična fiziološkoj pH vrednosti očne vodice. Pored toga, u blago baznoj sredini, olakšano se odvija oksidacija, tako da je određivanje BRIM zasnovano na njemu svojstvenom oksidacionom piknu ($E_p \sim +0,95$ V). S obzirom da ovaj anodni pik nastaje uz transfer samo jednog elektrona i da je reč o ireverzibilnoj oksidaciji (Poglavlje 4.1.3.), primenjena je DPV metoda (umesto SWV metode kod koje je značajno smanjena osetljivost kada se radi o ireverzibilnom procesu). Na ovaj način postignuta je dobra osetljivost i niske vrednosti $LOD = 1,94 \cdot 10^{-6}$ M i $LOQ = 6,46 \cdot 10^{-6}$ M (**Tabela 16.**). Dodatno, unapređena procedura pripreme elektrode – samo elektrohemijska priprema (*pretreatment*) pre svakog snimka, bez poliranja, značajno je doprinela brzini izvođenja analize. Time se značajna prednost može dati BDDE u odnosu na GCE.

Tokom validacije metode prema odgovarajućim smernicama,⁸⁴ analizirana tačnost i preciznost određivanja u okviru jednog dana (*intra-day*) i u okviru tri uzastopna dana (*inter-day*) ukazala je na veću *intra-day* preciznost (RSD (%) = 4,07 – 6,68 %) u odnosu na *inter-day* preciznost (RSD (%) = 8,65 – 11,83 %), dok je *intra-day* tačnost (*recovery* (%) = 87,40 – 106,20 %) i *inter-day* tačnost (*recovery* (%) = 94,12 – 107,33 %) u približno sličnom intervalu (**Tabela 17.**) Ispitivanjem kratkoročne stabilnosti dobijeno je najveće odstupanje za najnižu koncentraciju (15,76 %) mada je i ono vrlo blisko prihvatljivom nivou odstupanja (± 15 %) (Poglavlje 1.5.), dok su za ostale nivoe koncentracija dobijena znatno manja odstupanja (1,86 % i 6,18 %). Odavde sledi da je pouzdanost određivanja veća za više nivoe koncentracija, odnosno da rastvor analita podleže izvesnoj promeni tokom stajanja od 4 sata (**Tabela 18.**) Ispitivanje dugoročne stabilnosti ukazalo je na veoma mala odstupanja (1,63 % i 3,56 %), odakle proizilazi da uzorak zamrznut tokom 2 meseca ne podleže značajnoj promeni. Tokom zamrzavanja i odmrzavanja uzorka sa analitom u tri ciklusa, za dve izabrane koncentracije, dobijene su vrednosti *recovery* (%) = 106,0 % i 95,34 % posle prvog ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja (**Tabela 20.**) Već nakon drugog ciklusa dobijena su značajno veća odstupanja, odakle sledi da se uzorak sa analitom može podvrgnuti samo jednom ciklusu zamrzavanja.

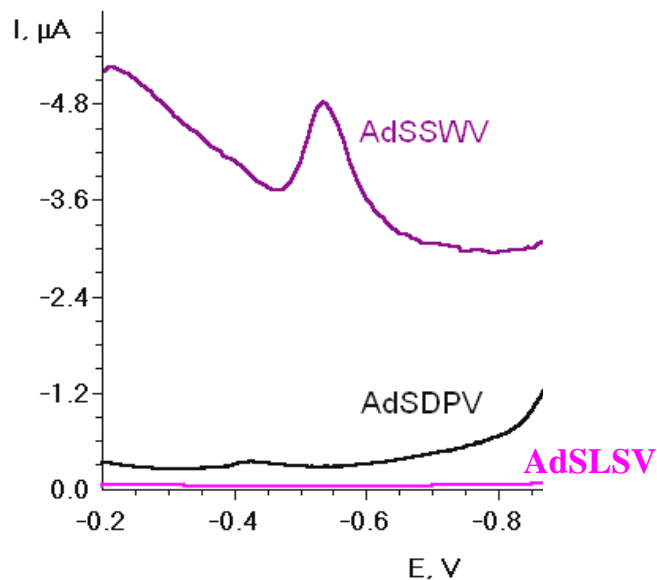
Prema izloženom, za određivanje brimonidina u očnoj vodici uspešno se može primeniti DPV/BDDE metoda, a odlikuje se: minimalnom pripremom uzorka, brzim izvođenjem i zadovoljavajućom tačnošću.

4.3. Interakcija DNK–vareniklin

4.3.1. Adsorptivno svojstvo vareniklina

Kako je u Poglavlju 4.1.3. utvrđena dominacija adsorpcije VAR na HMDE u baznoj sredini, adsorptivno svojstvo VAR iskorišćeno je za ispitivanje interakcije sa DNK.

Uz prethodno potvrđenu adsorpciju, trebalo je izabrati odgovarajuću voltametrijsku metodu. Snimljeni voltamogrami pokazali su da je najveći intenzitet struje pika dobijen primenom voltimetrije pravougaonih talasa sa adsorpcionom obogaćivanjem i rastvaranjem (*Adsorptive Stripping Square Wave Voltammetry, AdSSWV*) i to 30 puta veći nego u slučaju primenjene diferencijalno pulsne voltametrije sa adsorpcionom obogaćivanjem i rastvaranjem (*Adsorptive Stripping Differential Pulse Voltammetry, AdSDPV*), odnosno 600 puta veći u odnosu na voltametriju sa linearnom promenom potencijala i adsorpcionim obogaćivanjem i rastvaranjem (*Adsorptive Stripping Linear Sweep Voltammetry, AdSLSV*) (**Slika 54.**). Prema tome, metoda izbora tokom daljeg rada bila je AdSSWV.



Slika 54. Voltamogrami dobijeni pri koncentraciji $1,0 \cdot 10^{-5}$ M VAR i različitim adsorptivnim tehnikama: AdSSWV (*Adsorptive Stripping Square Wave Voltammetry*), AdSDPV (*Adsorptive Stripping Differential Pulse Voltammetry*) i AdSLSV (*Adsorptive Stripping Linear Sweep Voltammetry*).

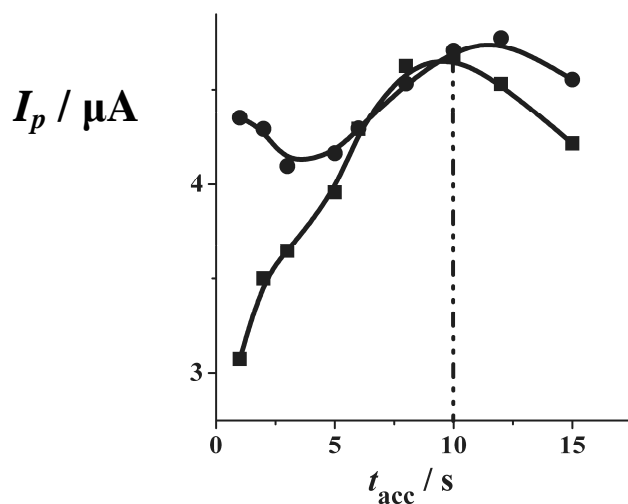
4.3.2. Uticaj vremena akumulacije (t_{acc})

Pri koncentraciji vareniklina $1,0 \cdot 10^{-7}$ M u elektrohemijskoj ćeliji, ispitan je uticaj vremena akumulacije na intenzitet struje pika (**Slika 55.**). Snimljeni su odgovarajući AdSSW voltamogrami za različita vremena akumulacije, $t_{acc} = 1 - 30$ s, pri pH = 5,0 i 8,0. Utvrđeno je da su veći intenziteti struje pika na pH = 8,0; kao i pri dužim vremenima akumulacije. Tačnije, na obe pH vrednosti pikovi struje bili su izjednačeni za $t_{acc} = 10$ s. Odavde sledi da je potrebno primeniti vreme akumulacije duže od 10 s kada je cilj postići što bolju pokrivenost elektrode vareniklinom, odnosno formiranje sloja VAR na površini elektrode.

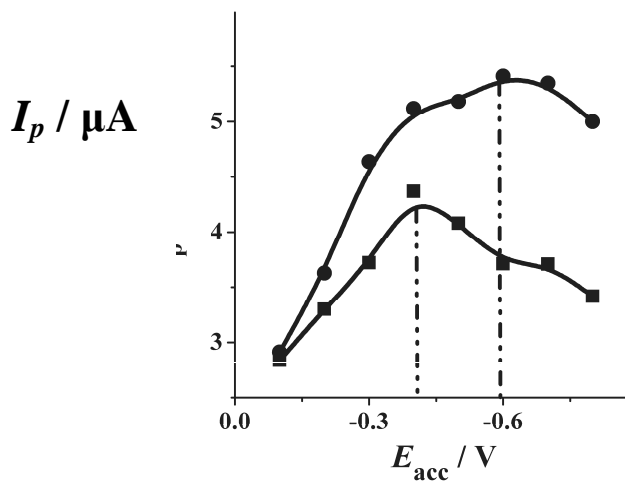
4.3.3. Uticaj potencijala akumulacije (E_{acc})

Pri odabranom vremenu akumulacije, $t_{acc} = 10$ s, ispitan je uticaj potencijala akumulacije na intenzitet struje pika u rastvoru vareniklina koncentracije $1,0 \cdot 10^{-7}$ M.

Snimljeni AdSSW voltamogrami pri variranju vrednosti potencijala akumulacije u rasponu od -0,1 V do -0,8 V, ukazali su da je pri pH = 5,0 najveći intenzitet struje dobijen za $E_{acc} = -0,4$ V; a pri pH = 8,0 za $E_{acc} = -0,6$ V (**Slika 56**). Postepeni pad intenziteta struje pika verovatno je posledica desorpcije vareniklina pri potencijalima većim od potencijala maksimalne adsorpcije.



Slika 55. Uticaj vremena akumulacije (t_{acc}) na intenzitet struje AdSSWV pika (I_p) pri koncentraciji $1,0 \cdot 10^{-7}$ M VAR u BR puferu: (■) pH = 5,0; (●) pH = 8,0.

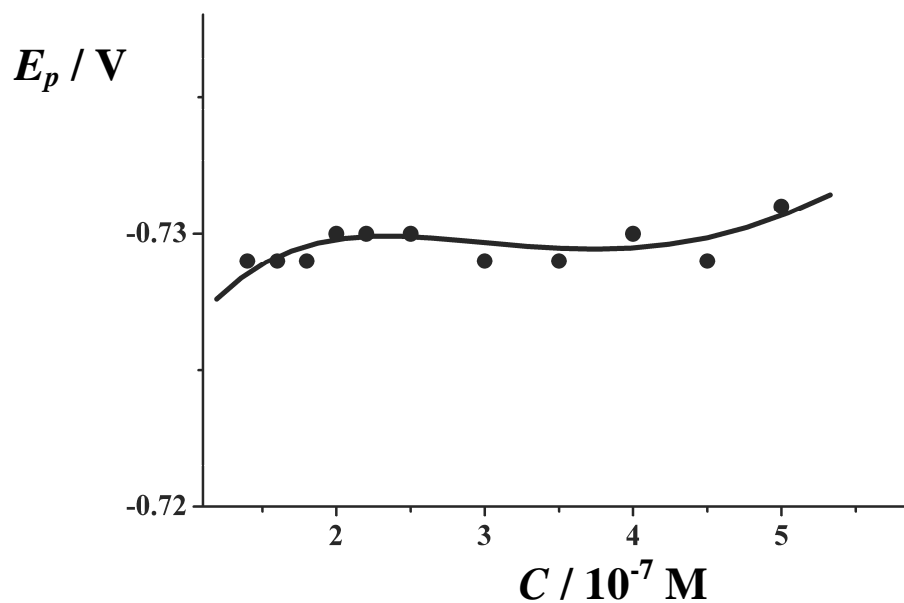


Slika 56. Uticaj potencijala akumulacije (E_{acc}) na intenzitet struje AdSSWV pika (I_p) pri odabranom vremenu akumulacije ($t_{acc} = 10$ s) i koncentraciji $1,0 \cdot 10^{-7}$ M VAR u BR puferu: (■) pH = 5,0; (●) pH = 8,0.

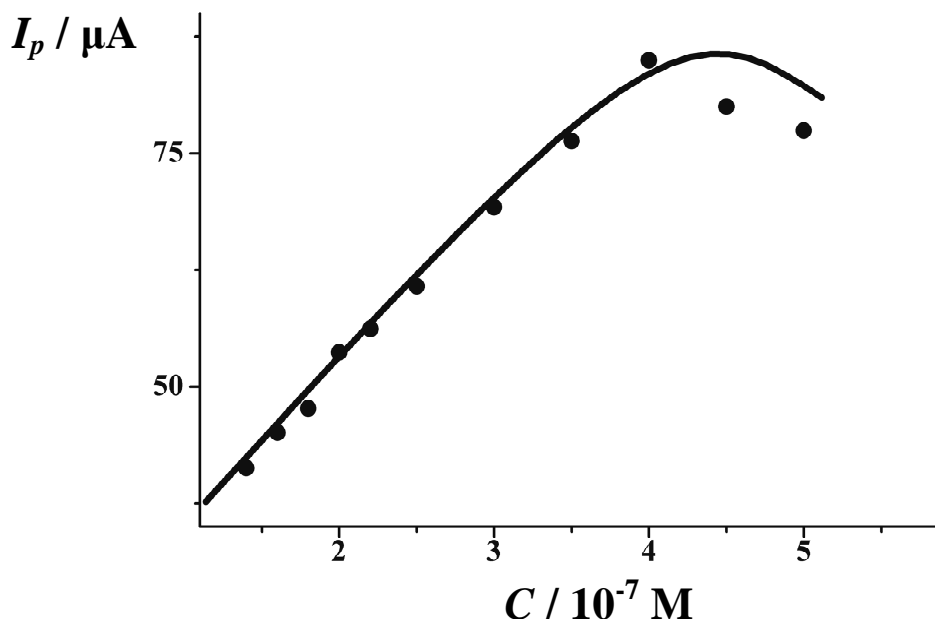
4.3.4. Uticaj koncentracije na stepen adsorpcije vareniklina na površini

HMDE

Primenjujući izabrane optimalne uslove adsorpcije, $t_{acc} = 10$ s i $E_{acc} = -0,6$ V; pri pH = 8,0 (Briton-Robinsonov pufer); snimljeni su odgovarajući AdSSW voltamogrami u opsegu koncentracija od $1,4 \cdot 10^{-7}$ - $5,0 \cdot 10^{-7}$ M vareniklina. Na **Slici 57.** uočava se gotovo konstantna vrednost potencijala pika, dok je maksimalna vrednost intenziteta struje pika postignuta pri koncentraciji $4,0 \cdot 10^{-7}$ M VAR (**Slika 58.**). Odavde proističe da će pri koncentracijama vareniklina u elektrohemijskoj ćeliji većim od $4,0 \cdot 10^{-7}$ M, površina elektrode biti potpuno prekrivena monoslojem adsorbovanog vareniklina.



Slika 57. Zavisnost potencijala AdSSWV pika od koncentracije VAR (Briton-Robinsonov pufer pH = 8,0).



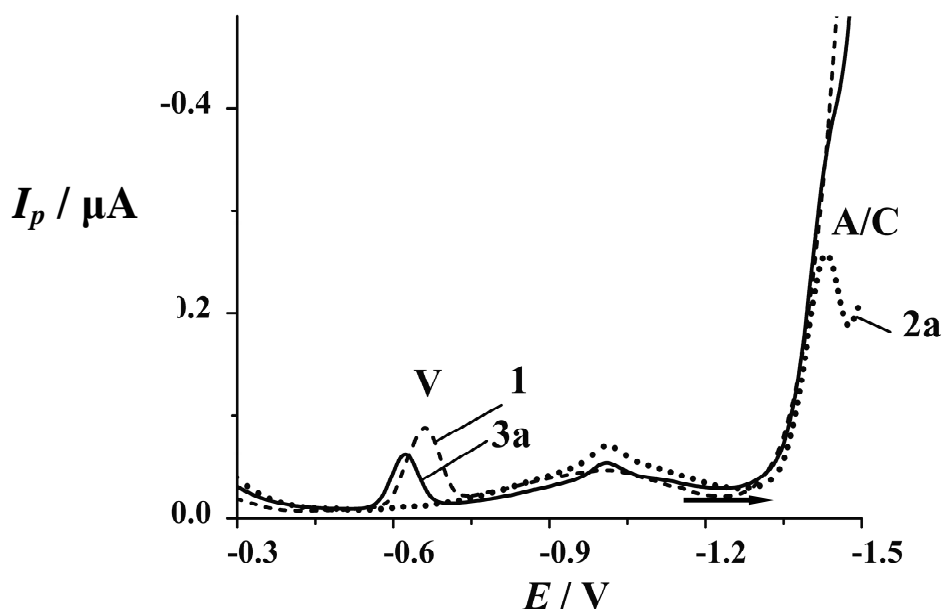
Slika 58. Uticaj koncentracije VAR na intenzitet struje AdSSWV pika (Briton-Robinsonov pufer pH = 8,0).

Iz odgovarajućeg izraza za intenzitet struje pika (I_p) adsorbovane elektroaktivne vrste (tj. njenog oksidovanog/redukovanog oblika) (Poglavlje 1.4.4., jednačina (19)), i uvrščivanjem odgovarajućih vrednosti ($n = 2$, $F = 96\,485,3 \text{ C mol}^{-1}$, $R = 8,31447 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, $T = 298 \text{ K}$, $\nu = 0,05 \text{ V s}^{-1}$ i $A = 0,4 \text{ mm}^2$), može se izračunati površinska zaposednutost elektrode ($\Gamma/\text{mol cm}^{-2}$). S obzirom da je dati izraz primenljiv isključivo na reverzibilne procese, i da je prethodno potvrđena reverzibilnost procesa redukcije vareniklina pod ovim uslovima (Poglavlje 1.4.3.), izračunata je eksperimentalno dobijena površinska zaposednutost elektrode vareniklinom, $\Gamma_{exp} = 1,030 \cdot 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$. Da bi se potvrdila teza da je površina elektrode zaposednuta monoslojem vareniklina, izračunata je teorijska površinska zaposednutost elektrode. Aproksimativno posmatrajući molekul vareniklina kao paralelogram dimenzija $0,75 \text{ nm} \times 2 \text{ nm} = 1,5 \text{ nm}^2$, pri tome uzimajući u obzir dužinu svih zastupljenih veza i radijuse atoma prisutnih u molekulu,^{131,132} dobijena je teorijska vrednost $\Gamma_{teor} = 1,107 \cdot 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$, koja je vrlo bliska eksperimentalno dobijenoj vrednosti površinske zaposednutosti ($\Gamma_{exp} = 1,030$

$\cdot 10^{-10}$ mol cm^{-2}). Time je potvrđena postavljena teza da je površina elektrode zaposednuta monoslojem vareniklina pod navedenim eksperimentalnim uslovima.

4.3.5. Utvrđena interakcija vareniklina i DNK

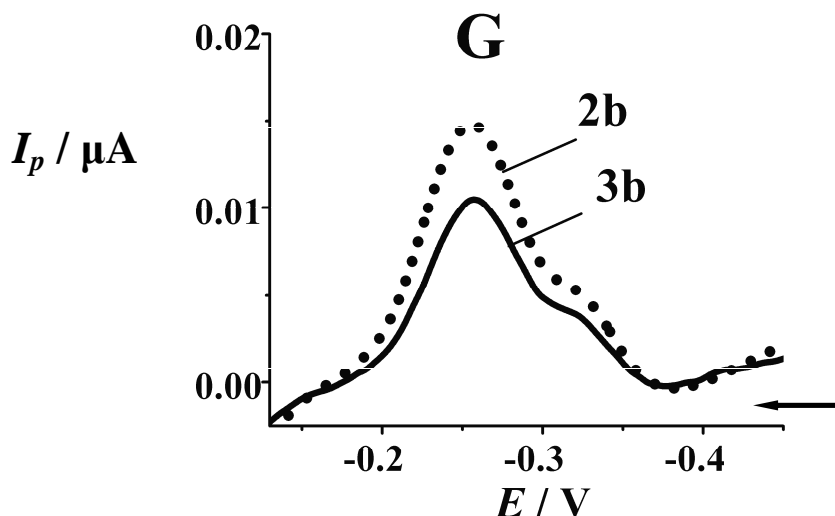
Nakon adsorpcije samog VAR, same DNK, i na kraju smeše VAR-DNK na površini HMDE, transferom i uranjanjem modifikovane elektrode u pufer u elektrohemijskoj ćeliji, snimljeni su odgovarajući SW voltamogrami u opsegu potencijala od 0,00 V do -1,85 V. Na **Slici 59.** uočavaju se katodni pikovi, a na **Slici 60.** anodni pikovi koji su posledica reoksidacije prethodno redukovanih oblika primenjenim negativnim potencijalom. Redukcioni pik vareniklina, $E_p = -0,654$ V (**Slika 59.**, kriva 1, pik V) posledica je dvoelektronske redukcije. Katodni pik koji odgovara redukciji



Slika 59. AdTSSW voltamogrami: (1 - - -) $1,0 \cdot 10^{-5}$ M VAR; (2a •••) $1,0 \cdot 10^{-5}$ M ds-DNK; (3a —) smeša VAR-DNK. Jedinjenja su adsorbovana iz 0,05 M NaCl sa 0,002 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH = 7,0); pri $t_{acc} = 120$ s i $E_{acc} = \text{OCP}$ (potencijal otvorenog kola); vreme inkubacije $t_{inc} = 10$ i 30 min. SW parametri: amplituda pulsa 200 mV, frekvencija 25 Hz, $E_{start} = 0,0$ V i $E_{end} = -1,85$ V. Osnovni elektrolit u ćeliji: 0,3 M amonijum-formiat/natrijum-fosfat pH = 6,86.

purinske/pirimidinske baze odnosno adenina/citozina u molekulu DNK uočava se na $E_p = -1,426$ V (**Slika 59.**, kriva 2a, pik A/C). Nakon prethodne redukcije usled izlaganja izuzetno negativnom potencijalu, dobijen je anodni pik, $E_p = -0,253$ V, koji odgovara DNK molekulu odnosno reoksidaciji guanina (**Slika 60.**, kriva 2b, pik G).

Nakon odgovarajućeg inkubacionog perioda, $t_{acc} = 120$ s, smeša VAR i DNK, adsorbovana na površini elektrode, dala je odgovarajući redukcionni pik (**Slika 59.**, kriva 3a) odnosno oksidacioni pik (**Slika 60.**, kriva 3b). Na **Slici 59.** jasno se uočava da je došlo do izvesnih promena: intenzitet struje pika (**V**) je smanjen, a potencijal pika pomeren ka manje negativnim vrednostima, poredeći smešu VAR-DNK u odnosu na signal koji odgovara samom molekulu VAR. Promene, u vidu smanjenja intenziteta struje pika, uočavaju se i kod oksidacionog pika (**G**) (poredeći signal samog molekula DNK i smeše VAR-DNK). Smanjenje intenziteta struje pika i pomeraj položaja pika smeše VAR-DNK u odnosu na pik samog VAR ka pozitivnijim vrednostima, predstavljaju rezultat/posledicu interakcije VAR i DNK.^{92,100,101}



Slika 60. AdTSSW voltamogrami: (**2b** •••) $1,0 \cdot 10^{-5}$ M ds-DNK; (**3b** —) smeša VAR-DNK. Jedinjenja su adsorbovana iz rastvora 0,05 M NaCl sa 0,002 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH = 7,0); pri $t_{acc} = 120$ s i $E_{acc} = \text{OCP}$ (potencijal otvorenog kola); vreme inkubacije $t_{inc} = 10$ i 30 min. SW parametri: amplituda pulsa 200 mV, frekvencija 25 Hz, $E_{start} = 0,0$ V i $E_{end} = -1,85$ V. Osnovni elektrolit u ćeliji: 0,3 M amonijum-formiat/natrijum-fosfat pH = 6,86.

Interakcija vareniklina i DNK može se izraziti putem izračunavanja odnosa normalizovanih struja pika pre i nakon interakcije VAR i DNK, što je prikazano u **Tabeli 21.**

Tabela 21. Interakcija VAR-DNK izražena putem: odnosa normalizovanih intenziteta struja pika (I_p/I_{p0}), promena potencijala pika (ΔE_p) i odnosa konstanti površinskog vezivanja ($K_{VAR,Red}/K_{VAR,Ox}$), dobijenih sa odgovarajućih AdSSW voltamograma.

| Pik | E_p / V | $(I_p/I_{p0}) \cdot 100$ (%) | | ΔE_p / mV | | $\frac{K_{VAR,Red}}{K_{VAR,Ox}}$ | |
|-----|-----------|------------------------------|------------------|-------------------|------------------|----------------------------------|------------------|
| | | t_{inc} 10 min | t_{inc} 30 min | t_{inc} 10 min | t_{inc} 30 min | t_{inc} 10 min | t_{inc} 30 min |
| V | -0,654 | 74,9 | 31,1 | 34,0 | 15,0 | 14,0 | 3,0 |
| A/C | -1,426 | 31,0 | 6,95 | - | - | - | - |
| G | -0,253 | 72,5 | 68,7 | - | - | - | - |

I_p, I_{p0} – intenzitet struje pika nakon interakcije i pre interakcije,

$K_{VAR,Red}, K_{VAR,Ox}$ – konstanta površinskog vezivanja redukovanog i oksidovanog oblika VAR

t_{inc} – vreme inkubacije

Iz date **Tabele 21.** jasno se uočava da vrednosti normalizovanih struja odgovarajućih pikova za vareniklin, adenin/citozin i guanin odnosno: V (%), A/C (%) i G (%) ukazuju na smanjenje visine pika odnosno intenziteta struje pika nakon inkubacije VAR i DNK. Primećeno je da smanjenje struje pika zavisi od perioda inkubacije tako da je katodni pik vareniklina posle perioda inkubacije $t_{inc} = 10$ min smanjen za 25,1% (= 100 – 74,9), katodni pik DNK kojim je predstavljena redukcija adenina/citozina, smanjen je za 69,0% (= 100 – 31,0), dok je anodni pik DNK nastao reoksidacijom guanina, smanjen za 27,5% (= 100 – 72,5). Nakon dužeg perioda inkubacije $t_{inc} = 30$ min, pomenuti katodni pikovi su bili u još većoj meri smanjeni, u slučaju VAR za 68,9% (= 100 – 31,1), a u slučaju A/C za čak 93,05% (= 100 – 6,95). Kod anodnog pika posle dužeg inkubacionog perioda smanjenje visine pika odnosno intenziteta struje iznosilo je 31,3% (= 100 – 68,7). Odavde se može zaključiti da je pri produženom vremenu inkubacije od 30 min postignuto značajno smanjenje intenziteta struje pika kod katodnih pikova, za razliku od anodnog gde je to smanjenje neznatno.

Takođe, zabeleženo je pomeranje položaja pika VAR ka pozitivnijim vrednostima potencijala i to za 34 mV nakon inkubacionog perioda od 10 min, odnosno za 15 mV nakon inkubacionog perioda od 30 min. Odavde proizilazi potvrda teze da je došlo do interakcije VAR i DNK, a promene koje su kvantifikovane ukazuju da je tip interakcije – interkalacija.^{92,100,101,103}

Koristeći izraz za promenu formalnog potencijala (Poglavlje 1.6., jednačina (26)) redoks vrste adsorbovane na površini elektrode odnosno prisutne u rastvoru, izračunat je odnos konstanti površinskog vezivanja i to $K_{VAR,Red}/K_{VAR,Ox} = 3,0$ nakon inkubacionog perioda od 30 min, odnosno $K_{VAR,Red}/K_{VAR,Ox} = 14,0$ nakon 10 min (**Tabela 21.**). Odavde sledi da redukovani oblik VAR ostvaruje značajno jaču interakciju sa DNK u odnosu na oksidovani oblik, odnosno da se za površinu DNK-modifikovane elektrode jače vezuje redukovani od oksidovanog oblika vareniklina. Ovo je još jedan pokazatelj da je interakcija VAR-DNK tipa interkalacije.¹⁰³

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu proučavano je elektrohemijsko ponašanje vareniklina i brimonidina u širokoj oblasti pH vrednosti. Primenjena je polarografija sa jednosmernom strujom, DCP i voltametrijske tehnike: CV, DPV, SWV, AdSDPV i AdSSWV za ispitivanje njihovog elektrohemijskog ponašanja. Polarografski podaci ukazali su na broj razmenjenih elektrona i protona u procesu redukcije VAR i BRIM, dok je ciklična voltometrija primenjena radi utvrđivanja prirode, reverzibilnosti i pojedinih parametara redoks procesa. Pojedine pulsne voltametrijske tehnike (DPV i SWV) korišćene su kako tokom razmatranja parametara redoks mehanizma, tako i tokom kvantitativne analize VAR i BRIM u različitim uzorcima. Adsorptivna transfer „stripping” tehnika (*AdTS*) primenjena je za ispitivanje interakcije DNK i vareniklina. Tokom rada korišćene su različite radne elektrode: DME, HMDE, GCE i BDDE.

Na osnovu detaljnog elektrohemijskog proučavanja vareniklina i brimonidina došlo se do sledećih zaključaka:

- ⊙ Utvrđena je *priroda elektrodnog procesa* na određenoj radnoj elektrodi u kiseloj/baznoj sredini:

- *Vareniklina*

- ❖ Upotrebom **HMDE** u kiseloj sredini, proces redukcije kontrolisan je **difuzijom**; dok u baznoj sredini dominira **adsorpcija**;
- ❖ Na **GCE** tokom procesa redukcije u kiseloj i baznoj sredini utvrđeno **prisustvo adsorpcije**,
- ❖ Na **BDDE** odvija se **difuzijom** kontrolisani proces redukcije u kiseloj i baznoj sredini;

- *Brimonidina*

- ❖ U kiseloj sredini na **HMDE** utvrđeno **prisustvo adsorpcije** tokom procesa redukcije, dok u baznoj sredini u potpunosti dominira **adsorpcija**;
- ❖ Korišćenjem **GCE** u kiseloj i baznoj sredini elektrodni proces redukcije odvija se uz **prisustvo adsorpcije**,
- ❖ Elektrodni proces redukcije na **BDDE** u kiseloj i baznoj sredini kontrolisan je **difuzijom**

- ⊙ Predložen je *redoks-mehanizam* u širokom opsegu pH vrednosti na osnovu utvrđenog broja razmenjenih elektrona/H⁺-jona:

➤ *Vareniklina*

- ❖ **Redukcija** se odvija na C=N vezi hinoksalinskog jezgra uz učešće dva elektrona i dva protona u širokoj pH oblasti (2,0 – 11,0) do dihidro-vareniklina i predstavlja proces čiji stepen reverzibilnosti raste sa porastom pH i najveći je u baznoj sredini. U kiseloj sredini (pri pH < 6,0), VAR podleže dodatnom stepenu redukcije (do tetrahidro-oblika), a prvi stepen redukcije odvija se stupnjevito, pri čemu najpre dolazi do adicije jednog protona, a zatim transfera jednog elektrona po svakom stupnju uz nastajanje radikal-intermedijera.
- ❖ **Oksidacija** se odvija nakon redukcije, i predstavlja kvazireverzibilni proces uz učešće jednog elektrona i jednog protona, polazeći od dihidro-vareniklina (nastalog produkta redukcije) do hidroksi-dihidro-vareniklina.

➤ *Brimonidina*

- ❖ **Redukcija** je predstavljena dvoelektronskim procesom uz učešće dva protona, na dvostrukoj C=N vezi hinoksalina, u širokom pH intervalu (2,0 – 11,0) do nastanka dihidro-brimonidina. Stepen reverzibilnosti raste, polazeći od kisele sredine, i najveći je u baznoj sredini. Dodatni stepen redukcije do tetrahidro-brimonidina prisutan je samo u jako kiseloj sredini (pH = 2,0 i 3,0) takođe uz učešće dva elektrona i dva protona.
- ❖ **Oksidacija** se odvija na dva elektroaktivna centra u molekulu, kao dva odvojena nezavisna procesa: 1) proces vezan za prethodnu redukciju i 2) proces nezavisan od prethodne redukcije.
 - 1) Nakon što se prethodno odigra redukcija, dihidro-brimonidin (produkt redukcije) podleže kvazireverzibilnom

procesu oksidacije uz učešće jednog elektrona i jednog protona do nastajanja hidroksi-dihidro-brimonidina.

2) Oksidacija se odvija na sekundarnom aminu na poziciji C6 uz učešće jednog elektrona i jednog protona i predstavlja ireverzibilan proces, u kome nastaje *N-radikal* brimonidina.

Ⓢ Uporednom analizom elektrohemijskog ponašanja VAR i BRIM utvrđeno je sledeće:

➤ *Sličnosti:*

- ❖ Kod oba leka utvrđena je **ista priroda procesa** na odgovarajućim elektrodama: na HMDE u baznoj sredini dominira adsorpcija, na GCE u kiselj/baznoj sredini utvrđeno prisustvo adsorpcije, dok je na BDDE proces kontrolisan difuzijom kako u kiselj tako i u baznoj sredini.
- ❖ Oba leka **podležu reverzibilnoj dvoelektronskoj redukciji** hinoksalinskog jezgra do dihidro-oblika u širokoj pH oblasti.
- ❖ Produkti redukcije VAR i BRIM **podležu jednoelektronskom kvazireverzibilnom procesu oksidacije**, pri čemu nastaje odgovarajući hidroksilovani dihidro-oblik vareniklina odnosno brimonidina.
- ❖ Prethodno nabrojane sličnosti mogu se pripisati ***zajedničkom hinoksalinskom jezgru*** u strukturi VAR i BRIM.

➤ *Razlike:*

- ❖ Kod *vareniklina* na HMDE u kiselj sredini utvrđeno da je proces kontrolisan difuzijom, dok je kod *brimonidina* ustanovljeno **prisustvo adsorpcije**, a ove razlike mogu se pripisati supstituentima: bromu na položaju C5 (što povećava liposolubilnost i utiče na elektronsku gustinu celokupnog molekula) i sekundarnom aromatičnom aminu na poziciji C6;

te je brimonidin znatno veći molekul od vareniklina i veće površine kojom može prionuti na površinu elektrode.

- ❖ Vareniklin lakše podložan redukciji od brimonidina, što se može pripisati baznijim svojstvima VAR, samim tim lakšem vezivanju protona. Kod brimonidina prisutan je uticaj elektronima bogatog Br na položaju C5, koji doprinosi celokupnoj elektronskoj gustini molekula, te nešto manjoj sklonosti ka primanju elektrona u odnosu na vareniklin.
- ❖ Kod *brimonidina* se odvija proces oksidacije supstituenta na položaju C6 – sekundarnog aromatičnog amina, pored glavnog procesa redukcije, dok u slučaju vareniklina nije zabeležena oksidacija s obzirom da bočni supstituent nije prisutan.

⊕ Optimizovane su i postavljene odgovarajuće elektroanalitičke metode za određivanje u različitim matriksima:

➤ *Vareniklina*

- ❖ SWV/BDDE (zasnovanu na redukcionom reverzibilnom piku) - predstavlja metodu izbora za određivanje u **tabletama** i opterećenoj **plazmi**, na osnovu: 1. dobijenih statističkih parametara (koji ukazuju na dovoljnu tačnost i preciznost metode, odnosno neznatan uticaj matriksa na kvalitet/intenzitet signala analita), 2. jednostavnije i brže pripreme elektrode (usled lakšeg čišćenja površine radne elektrode s obzirom na manju sklonost da adsorbuje molekule na svojoj površini), 3. bolje reproduktivnosti dobijenih rezultata u odnosu na GCE.

➤ *Brimonidina*

- ❖ SWV/BDDE (zasnovanu na redukcionom reverzibilnom piku) jeste metoda izbora za određivanje u doziranom obliku – **kapima za oči** na osnovu: 1. dobijenih statističkih

parametara, 2. boljih svojstava BDDE u odnosu na GCE (jednostavnija i brža priprema elektrode, bolja reproduktivnost rezultata).

- ❖ **DPV/BDDE** (zasnovanu na oksidacionom ireverzibilnom piku) uspešno primenjena metoda za određivanje u opterećenoj **očnoj vodici** kojom je postignuta visoka osetljivost, uzimajući u obzir kompleksnost matriksa, a odlikuje je: minimalna priprema uzorka, brzo i jednostavno izvođenje. Ispitivana stabilnost brimonidina ukazala je da uzorak zamrznut tokom dva meseca ne podleže značajnoj promeni, ali se uzorak sa analitom može podvrgnuti samo jednom ciklusu zamrzavanja/odmrzavanja.

Ⓢ Uzimajući u obzir proverenu primenljivost predloženih **elektroanalitičkih metoda** za određivanje VAR i BRIM u različitim matriksima uz upotrebu čvrstih elektroda, **prednosti** nad postojećim instrumentalnim metodama jesu: **ekonomičnost, brzina izvođenja, jednostavnost pripreme uzorka, ekotoksikološka prihvatljivost, neagresivnost prema analiziranom uzorku** (naknadna mogućnost analiziranja istog uzorka alternativnom metodom), izvođenje na **sobnoj temperaturi** (primenljivost i na termolabilna jedinjenja).

Ⓢ Utvrđena je interakcija DNK i VAR, tipa **interkalacije** (reverzibilna interakcija). Na osnovu izračunatih odnosa vrednosti konstanti vezivanja $K_{VAR,Red}/K_{VAR,Ox}$, zaključeno je da se **redukovani oblik VAR jače vezuje za DNK** od oksidovanog oblika VAR.

6. LITERATURA

1. A. Carta, G. Paglietti, M.E.R. Nikookar, P. Sanna, L. Sechi, S. Zanetti, Novel substituted quinoxaline 1,4-dioxides with in vitro antimycobacterial and anticandida activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2002**, *37*, 355-366.
2. M. Suresh, P. Lavanya, D. Sudhakar, K. Vasu, C.V. Rao, Synthesis and biological activity of 8-chloro-[1,2,4]triazolo [4,3-a] quinoxalines. *J. Chem. Pharm. Res.* **2010**, *2*, 497-504.
3. L. You, E.J. Cho, J. Leavitt, L.C. Ma, G.T. Montelione, E.V. Anslyn, R.M. Krug, A. Ellington, J.D. Robertus, Synthesis and evaluation of quinoxaline derivatives as potential influenza NS1A protein inhibitors. *Boorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 3007-3011.
4. A. Guirado, J.I.L. Sánchez, A.J. Ruiz-Alcaraz, D. Bautista, J. Gálvez, Sythesis and biological evaluation of 4-alkoxy-6,9-dichloro[1,2,4] triazolo[4,3-a] quionoxalines as inhibitors of TNF- α and IL-6. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *54*, 87-94.
5. N.V. Kulkarni, V.K. Revankar, B.N. Kirasur, M.H. Hugar, Transition metal complexes of thiosemicarbazones with quinoxaline hub: an emphasis on antidiabetic property. *Med. Chem. Res.* **2012**, *21*, 663-671.
6. B. Zarranz, A. Jaso, I. Aldana, A. Monge, Synthesis and anticancer activity evaluation of new 2-alkylcarbonyl and 2-benzoyl-3-trifluoromethyl-quionoxaline 1,4-N-oxide derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 3711-3721.
7. R. Ingle, R. Marathe, D. Magar, H.M. Patel, S.J. Surana, Sulphonamido-quinoxalines: Search for anticancer agent. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *65*, 168-186.
8. R. Mahesh, T. Devadoss, D.K. Pandey, S. Bhatt, Discovery of new anti-depressants from structurally novel 5-HT₃ receptor antagonists: Design, synthesis and pharmacological evaluation of 3-ethoxyquinoxalin-2-carboxamides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 1253-1256.

9. Y. Takano, F. Shiga, J. Asano, N. Ando, H. Uchiki, T. Anraku, Synthesis and AMPA receptor antagonistic activity of a novel class of quinoxalinecarboxylic acid with a substituted phenylgroup at the C-7 position. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3521-3525.
10. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm#totable> (accessed 27.08.2016.)
11. J.W. Coe, P.R. Brooks, M.C. Wirtz, C.G. Bashore, K.E. Bianco, M.G. Vetelino, E.P. Arnold, L.A. Lebel, C.B. Fox, F.D. Tingley III, D.W. Schulz, T.I. Davis, S.B. Sands, R.S. Mansbach, H. Rollema, B.T. O'Neil, 3,5-Bicyclic aryl piperidines: A novel class of $\alpha_4\beta_2$ neuronal nicotinic receptor partial agonists for smoking cessation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4889-4897.
12. J.W. Coe, H. Rollema, B.T. O'Neil, Case history: ChantixTM/ChampixTM (Varenicline Tartrate), a nicotinic acetylcholine receptor partial agonist as a smoking cessation aid, In: J.E. Macor (Ed.), *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, Elsevier Inc., San Diego **2009**, 71-101.
13. R. Doll, R. Peto, J. Boreham, I. Sutherland, Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors. *BMJ* **2004**, *328*, 1519-1528.
14. S. Wilkes, The use of bupropion SR in cigarette smoking cessation. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* **2008**, *3*, 45-53.
15. H.P. Rang, M.M. Dale, J.M. Ritter, P.K. Moore, *Pharmacology*, 5th ed., Churchill Livingstone, Edinburgh **2003**.
16. H. Rollema, J.W. Coe, L.K. Chambers, R.S. Hurst, S.M. Stahl, K.E. Williams, Rationale, pharmacology and clinical efficacy of partial agonists of $\alpha_4\beta_2$ nACh receptors for smoking cessation. *Trends Pharmacol. Sci.* **2007**, *28*, 316-325.

17. H. Rollema, L.K. Chambers, J.W. Coe, J. Glowa, L.A. Lebel, Z. Lu, R.S. Mansbach, R.J. Mather, C.C. Rovetti, S.B. Sands, E. Schaeffer, D.W. Schulz, F.D. III Tingley, K.E. Williams, Pharmacological profile of the $\alpha_4\beta_2$ nicotinic acetylcholine receptor partial agonist varenicline, an effective smoking cessation aid. *Neuropharmacology* **2007**, *52*, 985-994.
18. R.S. Obach, A.E. Reed-Hagen, S.S. Krueger, B.J. Obach, T.N. O'Connell, K.S. Zandi, S.A. Miller, J.W. Coe, Metabolism and disposition of varenicline, a selective $\alpha_4\beta_2$ acetylcholine receptor partial agonist, in vivo and in vitro. *Drug Metab. Disp.* **2006**, *34*, 121-130.
19. H.M. Faessel, B.J. Smith, M.A. Gibbs, J.S. Gobey, D.J. Clark, A.H. Burstein, Single-dose pharmacokinetics of varenicline, a selective nicotinic receptor partial agonist, in healthy smokers and nonsmokers. *J. Clin. Pharmacol.* **2006**, *46*, 991-998.
20. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.Overview&DrugName=ALPHAGAN> (accessed 27.08.2016.)
21. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.Overview&DrugName=ALPHAGAN%20P> (accessed 27.08.2016.)
22. <http://www.alims.gov.rs/ciril/files/lekovi/pil/515-01-4857-12-001.pdf> (accessed 27.08.2016.)
23. <http://www.alims.gov.rs/ciril/files/lekovi/pil/515-01-07317-13-001.pdf> (accessed 27.08.2016.)
24. S. Blomdahl, B.M. Calissendorff, B. Tengroth, Ö. Wallin, Blindness in glaucoma patients. *Acta Ophthalmol. Scand.* **1997**, *75*, 589–591.

25. A. Munier, T. Gunning, D. Kenny, M. O'Keefe, Causes of blindness in the adult population of the Republic of Ireland. *Br. J. Ophthalmol.* **1998**, *82*, 630–633.
26. B.N. Mukesh, C.A. McCarty, J.L. Rait, H.R. Taylor, Five-year incidence of open-angle glaucoma: the visual impairment project. *Ophthalmology* **2002**, *109*, 1047–1051.
27. E.O. Schoff, M.G. Hattenhauer, H.H. Ing, D.O. Hodge, R.H. Kennedy, D.C. Herman, D.H. Johnson, Estimated incidence of open-angle glaucoma in Olmsted Country, Minnesota. *Ophthalmology* **2001**, *108*, 882–886.
28. P.F.J. Hoyng, Y. Kitazawa, Medical treatment of normal tension glaucoma. *Surv. Ophthalmol.* **2002**, *47*, S116-S124.
29. H. Solanki, H. Mehta, S. Toshniwal, C. Jayadev, S. Natarajan, *Investigations and diagnosis of glaucoma*, In: A. Garg, S. Melamed, J.N. Mortensen, J.J. Bovet, G. Morchini, R.G. Carassa, K.R. Mehta, T. Dada, A.K. Khalil, C.K. Mehta (Eds.), *Mastering the techniques of glaucoma diagnosis and management*, Jaypee Brothers Medical Publishers Ltd, New Delhi **2006** 39-47.
30. D.L. Eisenbergh, C.B. Toris, C.B. Camras, Bimatoprost and travoprost: A Review of recent studies of two new glaucoma drugs. *Surv. Ophthalmol.* **2002**, *47*, S105-S115.
31. R. Saxena, R. Prajash, P. Mathur, S.K. Gupta, Pharmacotherapy of glaucoma. *Indian J. Pharmacol.* **2002**, *34*, 71-85.
32. C. To, C. Kong, C. Chan, M. Shahidullah, C. Do, The mechanism of aqueous humour formation. *Clin. Exp. Optom.* **2002**, *85*, 335-349.
33. R.K. Griffith, *Adrenergic receptors and drugs affecting adrenergic neurotransmission*, In: T.L. Lemke, D.A. Williams, V.F. Roche, S.W. Zito (Eds),

Foy's principles of medicinal chemistry, 7th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia **2013**, 340-365.

34. <http://www.glaucoma.org/glaucoma/anatomy-of-the-eye.php> (accessed 27.08.2016.)
35. <http://www.alims.gov.rs/ciril/files/lekovi/pil/515-01-02197-14-001.pdf> (accessed 27.08.2016.)
36. J.T. Wilensky, The role of brimonidine in treatment of open-angle glaucoma. *Surv. Ophthalmol.* **1996**, 41, S3-S7.
37. I. Apătăchioae, D. Chiselită, Alpha-2-adrenergic agonists in the treatment of glaucoma. *Oftalmologia* **1999**, 47, 35-40.
38. L.B. Canfor, The evolving pharmacotherapeutic profile of brimonidine, an adrenergic agonist after 4 years of continuous use. *Expert Opin. Pharmacother.* **2000**, 1, 815-834.
39. The Merck Index, *An Encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*, 15th ed., RSC, New York **2013**.
40. G. Unal, I. Yeloglut, B. Anilnert, I. Narin, pKa Constant of varenicline. *J. Chem. Eng. Data* **2012**, 57, 14-17.
41. M.N. Noolvi, H.M. Patel, V. Bhardwaj, A. Chauhan, Synthesis and in vitro antitumor activity of substituted quinazoline and quinoxaline derivatives: Search for anticancer agent. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, 46, 2327-2346.
42. P. Bhagav, P. Deshpande, S. Pandey, S. Chandran, Development and validation of stability indicating UV spectrophotometric method for the estimation of brimonidine

- tartrate in pure form, formulations and preformulation studies. *Der Pharmacia Lettre* **2010**, *2*, 106-122.
43. A. Phogat, M.S. Kumar, N. Mahadevan, Simultaneous estimation of brimonidine tartrate and timolol maleate in nanoparticles formulation by RP-HPLC. *International Journal of Recent Advances in Pharmaceutical Research* **2011**, *3*, 31-36.
44. A.A. Kadi, M.S. Mohamed, M.G. Kassem, I.A. Darwish, A validated stability-indicating HPLC method for determination of varenicline in its bulk and tablets. *Chem. Cent. J.* **2011**, *5*, 30-36.
45. Q. Zhao, E. Schwam, T. Fullerton, M. O'Gorman, A. Burstein, Pharmacokinetics, safety and tolerability following multiple oral doses of varenicline under various titration schedules in elderly nonsmokers. *J. Clin. Pharm.* **2011**, *51*, 492-501.
46. A. Acheampong, D.D.S. Tang-Liu, Measurement of brimonidine concentrations in human plasma by a highly sensitive gas chromatography/mass spectrometric assay. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1995**, *13*, 995-1002.
47. D.N. Tzovolou, F. Lamari, E.K. Mela, S.P. Gartaganis, N.K. Karamanos, Capillary electrophoretic analysis of brimonidine in aqueous humor of the eye and blood sera and relation of its levels with intraocular pressure. *Biomed. Chromatogr.* **2000**, *14*, 301-305.
48. S. Jiang, A.K. Chappa, J.W. Proksch, A rapid and sensitive LC/MS/MS assay for the quantitation of brimonidine in ocular fluids and tissues. *J. Chromatogr. B* **2009**, *877*, 107-114.
49. Y. Takamura, T. Tomomatsu, T. Matsumura, Y. Takihara, S. Kozai, S. Arimura, S. Yokota, M. Inatani, Vitreous and aqueous concentrations of brimonidine following topical application brimonidine tartrate 0,1% ophthalmic solution in humans. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* **2015**, *31*, 282-285.

50. N.K. Karamanos, F. Lamari, J. Katsimpris, S. Gartaganis, Development of an HPLC method for determining the α_2 -adrenergic receptor agonist brimonidine in blood serum and aqueous humor of the eye. *Biomed. Chromatogr.* **1999**, *13*, 86-88.
51. R.R. Shirke, N.Pai, RP-HPLC determination of brimonidine tartrate in brimonidine tartrate eye drops. *Indian Drugs* **2002**, *39*, 484-486.
52. L.B. Cantor, D. WuDunn, Y. Catoira-Boyle, C.W. Yung, Absorption of brimonidine 0,1% and 0,15% ophthalmic solutions in the aqueous humor of cataract patients. *J. Glaucoma* **2008**, *17*, 529-534.
53. A. Madhavi, A. Naidu, D.V. Subba Rao, P. Srinivasu, Development and validation of a new LC method for analysis of brimonidine tartrate and related compounds. *Chromatographia* **2009**, *69*, 1413-1419.
54. S.A. Ozkan, *Electroanalytical methods in pharmaceutical analysis and their validation*, HNB Publishing, New York **2012**.
55. S.P. Kounaves, *Voltammetric techniques*, In: F.A. Settle (Ed.), *Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry*, Prentice Hall PTR, New Jersey **1997** 711-728.
56. D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 7th ed., Saunders College Publishing, Orlando **1996**.
57. D. Manojlović, J. Mutić, D. Šegan, *Osnove elektroanalitičke hemije*, II izdanje, Hemijski fakultet Univerzitet u Beogradu, Beograd **2011**.
58. S. Mentus, *Elektrohemija*, II izdanje, Fakultet za fizičku hemiju Univerzitet u Beogradu, Beograd **2001**.

59. J. Wang, *Electroanalytical Techniques in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, VCH, New York **1988**.
60. S.A. Ozkan, J.M. Kauffmann, P. Zuman, *Electroanalysis in biomedical and pharmaceutical sciences. Voltammetry, Amperometry, Biosensors, Applications*, Springer – Verlag, Berlin - Heidelberg **2015**.
61. H.O. Pierson, *Handbook of carbon, graphite, diamond and fullerenes. Properties, processing and applications*. Noyes, New Jersey **1993**.
62. H. Maleki, C.D. Cojocaru, C.M.A. Brett, G.M Jenkis, J.R. Selman. Changes in the electrochemical-behaviour of polymeric carbon induced by heat-treatment and doping with lithium ions. *J. Electrochem. Soc.* **1998**, *145*, 721-730.
63. R.G. Compton, C.E. Banks, *Understanding Voltammetry, 2nd ed.*, Imperial College Press, Oxford **2011**.
64. <http://www.chem.ucla.edu/~bacher/CHEM174/equipment/CV1.html>
65. T. Kondo, M. Horitani, M. Yuasa, Sensitive electrochemical detection of glucose at glucose oxidase-cobalt phthalocyanine-modified boron-doped diamond electrode. *International Journal of Electrochemistry* **2012**, *2012* (943957).
66. J.W. Strojek, M.C. Granger, G.M. Swain, T. Dallas, M.W. Holtz, Enhanced signal-to-background ratios in voltammetric measurements made at diamond thin-film electrochemical interfaces. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 2031-2037.
67. M. Hupert, A. Muck, J. Wang, J. Stotter, Z. Cvackova, S. Haymond, Y. Show, G.M. Swain, Conductive diamond thin-films in electrochemistry. *Diamond Relat. Mater.* **2003**, *12* , 1940-1949.

68. T. Yano, D.A. Tryk, K. Hashimoto, A. Fujishima, Electrochemical behavior of highly conductive boron-doped diamond electrodes for oxygen reduction in alkaline solution. *J. Electrochem. Soc.* **1998**, *145*, 1870-1875.
69. B. Uslu, B.D. Topal, S.A. Ozkan, Electroanalytical investigation and determination of pefloxacin in pharmaceuticals and serum at boron-doped diamond and glassy carbon electrodes. *Talanta* **2008**, *74*, 1191-1200.
70. S.C.B. Oliveira, A.M. Oliveira-Brett, Boron doped diamond electrode pre-treatments effect on the electrochemical oxidation of dsDNA, DNA bases, nucleotides, homopolynucleotides and biomarker 8-oxoguanine. *J. Electroanal. Chem.* **2010**, *648*, 60-66.
71. S.B. Santos, C.F. Valezi, J. Scremin, C.A.R. Salamanca-Neto, L.H. Dall'Antonia, E.R. Sartori, A Simple square-wave voltammetric method for the determination of scopolamine in pharmaceuticals using a boron-doped diamond electrode. *Quim. Nova* **2014**, *37*, 1579-1583.
72. D.A.C. Brownson, C.E. Banks, *The Handbook of graphene electrochemistry*, Springer-Verlag, London **2014**.
73. P. Zuman, The Use of polarography in the initial stages of investigations of mechanisms of organic electrode processes in aqueous solutions. *Sci. Pap. Univ. Pardubice, Ser. A*, **1999**, *5*, 5-71.
74. <http://www.expertsmind.com/topic/cyclic-voltammetry/fundamentals-of-cyclic-voltammetry-911454.aspx> (accessed 27.08.2016.)
75. <http://urrjaa.blogspot.rs/2013/08/cyclic-voltammetry-urrjaa-p0110-2013.html> (accessed 27.08.2016.)

76. R.G. Compton, C. Batchelor-McAuley, E.J.F. Dickinson, *Understanding Voltammetry: Problems and Solutions*, Imperial College Press, Oxford **2012**.
77. C.M.A. Brett, A.M. Oliveira-Brett, *Electrochemistry – Principles, Methods, and Applications*, Oxford University Press, Oxford **1993**.
78. A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods*, 2nd ed., Wiley, New York **2001**.
79. J.G. Osteryoung, R.A. Osteryoung, Square Wave voltammetry. *Anal. Chem.* **1985**, 57, 101A-110A.
80. V. Mirčeski, Š. Komorsky-Lovrić, M. Lovrić, *Square-Wave Voltammetry: Theory and Application*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg **2007**.
81. Š. Komorsky-Lovrić, M. Lovrić, Theory of square-wave voltammetry for a dissolved redox couple. *Advances in Analytical Chemistry* **2013**, 3, 9-13.
82. ICH guideline Q2 (R1), *Validation of analytical procedures: Text and Methodology*. November, 2005.
83. J. Ermer, J.H.M. Miller (Eds.), *Method validation in pharmaceutical analysis*, Wiley-VCH, Weinheim **2005**.
84. C.M. Riley, T.W. Rosanske (Eds.), *Development and validation of analytical methods*, Pergamon, Oxford, **1996**.
85. S. Ahuja, S. Scypinski (Eds.), *Handbook of modern pharmaceutical analysis*, Academic Press, San Diego, California **2001**.
86. J. Ermer, Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An Integrated approach. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2001**, 24, 755-767.

87. *Guidance for Industry: Bioanalytical method validation*, U.S. Department of health and human services, Food and drug administration, Center for veterinary medicine. May **2001**.
88. J.D. Watson, F.H.C. Crick, A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **1953**, *171*, 737-738.
89. H.K. Liu, P.J. Sadler, Metal complexes as DNA intercalators. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 349-359.
90. J.B. Chaires, Drug-DNA interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, *8*, 314-320.
91. M.M. Aleksić, V. Kapetanović, An Overview of the optical and electrochemical methods for detection of DNA – Drug interactions. *Acta. Chim. Slov.* **2014**, *61*, 555-573.
92. M.T. Carter, M. Rodriguez, A.J. Bard, Voltammetric studies of the interaction of metal chelates with DNA. Tris-chelated complexes of cobalt(III) and iron(II) with 1,10-phenanthroline and 2,2'-bipyridine. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8901-8911.
93. Y. Ni, D. Lin, S. Kokot, Synchronous fluorescence, UV-visible spectrophotometric, and voltammetric studies of the competitive interactions of bis(1,10-phenanthroline)copper(II) complex and neutral red with DNA. *Anal. Biochem.* **2006**, *352*, 231-242.
94. <http://ecrins-therapeutics-services.com/home/dna-interaction-assay/> (accessed 29.08.2016)
95. C. Teijeiro, E. de la Red, D. Marín, Electrochemical analysis of anthramycin: hydrolysis, DNA-interactions and quantitative determination. *Electroanalysis* **2000**, *12*, 963-968.

96. E. Paleček, M. Fojta, M. Tomschik, J. Wang, Electrochemical biosensors for DNA hybridization and DNA damage. *Biosensors & Bioelectronics* **1998**, *13*, 621-628.
97. G. Dryhurst, P.J. Elving, Electrochemical oxidation-reduction paths for pyrimidine, cytosine, purine and adenine. *Talanta* **1969**, *16*, 855-874.
98. S. Krizkova, I. Fabrik, V. Adam, J. Kukacka, R. Prusa, G.J. Chavis, L. Trnkova, J. Strnadel, V. Horak, R. Kizek, Utilizing of adsorptive transfer stripping technique Brdicka reaction for determination of metallothioneins level in melanoma cells, blood serum and tissues. *Sensors* **2008**, *8*, 3106-3122.
99. M.V.B. Zanoni, E.I. Rogers, C. Hardacre, R.G. Compton, The electrochemical reduction of the purines guanine and adenine at platinum electrodes in several room temperature ionic liquids. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *659*, 115-121.
100. M.T. Carter, A.J. Bard, Voltammetric studies of the interaction of tris(1,10-phenanthroline)cobalt(III) with DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 7528-7530.
101. M. Rodriguez, A.J. Bard, Electrochemical studies of the interaction of metal chelates with DNA. Voltammetric and electrogenerated chemiluminescent studies of the interaction of tris(2,2'-bipyridine)osmium(II) with DNA. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 2658-2662.
102. M. Ravera, G. Bagni, M. Mascini, D. Osella, DNA-metallodrugs interactions signaled by electrochemical biosensors: An Overview. *Bioinorg. Chem. Appl.* **2007**, *2007*:91078.
103. D.W. Pang, H.D. Abruna, Micromethod for the investigation of the interactions between DNA and redox-active molecules. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 3162-3169.

104. C. Teijeiro, K. Nejedlý, E. Paleček, Cyclic voltammetry of submicrogram quantities of supercoiled, linear and denatured DNAs with DNA-modified mercury electrode. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1993**, *11*, 313-331.
105. L. Trnkova, F. Jelen, J. Petrlova, V. Adam, D. Potesil, R. Kizek, Elimination voltammetry with linear scan as a new detection method for DNA sensors. *Sensors* **2005**, *5*, 448-464.
106. E. Palecek, M. Fojta, F. Jelen, V. Vetterl, *Electrochemical analysis of nucleic acids*, In: A.J. Bard & M. Stratsmann (Eds.). *The Encyclopedia of electrochemistry*, Wiley-VCH, Weinheim **2002** 365-429.
107. M. Fojta, Mercury electrodes in nucleic acid electrochemistry: sensitive analytical tools and probes of DNA structure. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2004**, *69*, 715-747.
108. M. Fojta, *Detecting DNA damage with electrodes*, In: E. Palecek, F. Scheller, J. Wang (Eds.). *Electrochemistry of nucleic acids and proteins Towards electrochemical sensors for genomics and proteomics*, Elsevier, Amsterdam **2005** 386-431.
109. J. Wang, *Electrochemical nucleic acid biosensors*, In: E. Palecek, F. Scheller, J. Wang (Eds.). *Electrochemistry of nucleic acids and proteins Towards electrochemical sensors for genomics and proteomics*. Elsevier, Amsterdam **2005** 175-190.
110. M. Fojta, Electrochemical sensors for DNA interactions and damage. *Electroanalysis* **2002**, *14*, 1449-1463.
111. J. Labuda, A.M.O. Brett, G. Evtugyn, M. Fojta, M. Mascini, M. Ozsoz, I. Palchetti, E. Paleček, J. Wang, Electrochemical nucleic acid-based biosensors: Concepts,

- terms and methodology (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **2010**, *82*, 1167-1187.
112. D.D. Perrin, B. Dempsey, *Buffers for pH and Metal Ion Control*, Chapman and Hall, London, **1974**.
113. M. Goel, R.G. Picciani, R.K. Lee, S.K. Bhattacharya, Aqueous humor dynamics: A Review. *The Open Ophthalmology Journal* **2010**, *4*, 52-59.
114. B.C. Lourenção, R.A. Medeiros, R.C. Rocha-Filho, O. Fatibello-Filho, Simultaneous differential pulse voltammetric determination of ascorbic acid and caffeine in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode. *Electroanalysis* **2010**, *22*, 1717-1723.
115. L.S. Andrade, R.C. Rocha-Filho, Q.B. Cass, O. Fatibello-Filho, Simultaneous differential pulse voltammetric determination of sulfamethoxazole and trimethoprim on a boron-doped diamond electrode. *Electroanalysis* **2009**, *211*, 1475-1480.
116. A. Phogat, M.S. Kumar, N. Mahadevan, Simultaneous estimation of brimonidine tartrate and timolol maleate in nanoparticles formulation by RP-HPLC. *IJRAPR* **2011**, *3*, 31-36.
117. M. Takagi, S. Ono, Polarographic studies on quinoxalines for the determination of carbonyl groups in starches. *Bull. Univ. Osaka* **1969**, *21*, 77-122.
118. P. Murrey, J. Strier, C. Cavagnol, The polarography of quinoxaline. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 4331-4335.
119. J. Armand, L. Boulares, C. Bellec, J. Pinson, electrochemical reduction of quinoxalino[2,3-b]quinoxaline. *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 2797-2803.

120. M.M. Aleksić, J. Pantić, V.P. Kapetanović, Evaluation of kinetic parameters and redox mechanism of quinoxaline at glassy carbon electrode. *Facta Universitatis* **2014**, *12*, 55-63.
121. A.D.R. Pontinha, S.M.A. Jorge, V.C. Diculescu, M. Vivan, A.M. Oliveira-Brett, Antineoplastic drug methotrexate redox mechanism using a glassy carbon electrode. *Electroanalysis* **2012**, *24*, 917-923.
122. V.C. Diculescu, A. Militaru, A. Shah, R. Qureshi, L. Tugulea, A.M. Oliveira-Brett, Redox mechanism of lumazine at a glassy carbon electrode. *J. Electroanal. Chem.* **2010**, *647*, 1-7.
123. M.S. Ibrahim, Phase-selective a.c. adsorptive stripping voltammetry of lumazine on a hanging mercury drop electrode. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **2000**, *367*, 189-194.
124. G. Dryhurst, *Electrochemistry of Biological Molecules*, Academic Press, New York, **1977**.
125. J. Lehn, B.M. White, M.J. Kendrick, Electrochemical studies of biologically-significant pterin compounds. *Inorg. Chim. Acta* **1990**, *167*, 257-259.
126. D.A. Golea, V.C. Diculescu, L. Tugulea, A.M. Oliveira-Brett, Proteasome inhibitor anticancer drug bortezomib redox behaviour at a glassy carbon electrode. *Electroanalysis* **2012**, *24*, 1915-1921.
127. A. Adenier, M.M. Chehimi, I. Gallardo, J. Pinson, N. Vila, Electrochemical oxidation of aliphatic amines and their attachment to carbon and metal surfaces. *Langmuir* **2004**, *20*, 8243-8253.

128. J.M.P.J. Garrido, C. Delerue-Matos, F. Borges, T.R.A. Macedo, A.M. Oliveira-Brett, Voltammetric oxidation of drugs of abuse III. Heroin and metabolites. *Electroanalysis* **2004**, *16*, 1497-1502.
129. V. Kapetanović, M. Aleksić, P. Zuman, Two-step reduction of the O-methyloxime group in the antibiotic cefetamet. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *507*, 263-269.
130. J.P. Segretario, P. Zuman, Polarographic reduction of aldehydes and ketones: part XVII. 1-phenyl-1,2-propanedione. *J. Electroanal. Chem.* **1986**, *214*, 237-257.
131. V.Y. Gankin, Y.V. Gankin, *Twenty first century. General chemistry introductory level, Teaching Assistance*, ITC, Boston, **2007**.
132. D.R. Lide (Ed.) *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 87th ed., Taylor and Francis, Boca Raton, Philadelphia **2007**.

7. PRILOZI

I Spisak radova publikovanih u međunarodnim časopisima koji čine deo teze

1. M.M. Aleksić, **V. Radulović**, N. Lijeskić, V. Kapetanović, Electrochemical response and determination of varenicline at boron doped diamond, glassy carbon and hanging mercury electrodes. *Current Analytical Chemistry* 8 (2012) 133-142. **(M23)**; IF 1,809 (37/73)
2. **V. Radulović**, M.M. Aleksić, V. Kapetanović, An electrochemical study of the adsorptive behaviour of varenicline and its interaction with DNA. *Journal of the Serbian Chemical Society* 77 (2012) 1409-1422. **(M23)**; IF 0,934 (95/152)
3. **V. Radulovic**, M. Aleksic, D. Agbaba, V. Kapetanovic, An Electroanalytical approach to brimonidine at boron doped diamond electrode based on its extensive voltammetric study. *Electroanalysis* 25 (2013) 230-236. **(M21)**; IF 2,817 (22/75)
4. Mara M. Aleksic, **Valentina Radulovic**, Danica Agbaba, Vera Kapetanovic, An extensive study of electrochemical behavior of brimonidine and its determination at glassy carbon electrode. *Electrochimica Acta* 106 (2013) 75-81. **(M21)**; IF 4,433 (4/27)

**II Spisak saopštenja na međunarodnim simpozijumima publikovanih u izvodu
(M34) koji predstavljaju rezultate teze**

1. **V. Radulović**, V. Kapetanović, M.M. Aleksić, Electrochemical response and determination of novel nicotinic receptor agonist – varenicline at hanging mercury electrode. 16th European Conference on Analytical Chemistry, 11-15 September 2011, Belgrade, Serbia, Book of Abstracts, p. 225.
2. **V. Radulović**, M.M. Aleksić, N. Lijeskić, V. Kapetanović, Electrochemical determination of varenicline at boron doped diamond and glassy carbon electrodes. 16th European Conference on Analytical Chemistry, 11-15 September 2011, Belgrade, Serbia, Book of Abstracts, p. 226.
3. **V. Radulović**, M.M. Aleksić, V. Kapetanović, Voltammetric determination of varenicline and its interaction with DNA. 14th International Conference on Electroanalysis, 3-7 June 2012, Portorož, Slovenia, Book of Abstracts, p. 178.
4. M.M. Aleksić, **V. Radulović**, V. Kapetanović, The comparative study of electrochemical behaviour of varenicline and brimonidine at BDD and GC electrodes. 14th International Conference on Electroanalysis, 3-7 June 2012, Portorož, Slovenia, Book of Abstracts, p. 223.
5. **V. Radulović**, M.M. Aleksić, V. Kapetanović, An electroanalytical approach of two quinoxaline derivatives based on voltammetric study. 14th International Conference on Electroanalysis, 3-7 June 2012, Portorož, Slovenia, Book of Abstracts, p. 272.

8. BIOGRAFIJA

Valentina Radulović rođena je 27.01.1978. u Paraćinu. Nagrađena je Vukovom diplomom i proglašena đakom generacije za postignuti uspeh u osnovnoj i srednjoj školi.

Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 1997/1998. godine i diplomirala 2004. godine sa prosečnom ocenom 8,65 tokom studija. Po završetku fakulteta, obavila je pripravnički staž i položila stručni ispit za farmaceute 2005. godine.

Doktorske akademske studije iz farmaceutske hemije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2007/2008. Tokom školske 2009/2010. i 2013/2014. godine imala je status mirovanja na doktorskim studijama zbog trudničkog, odnosno porodijskog odsustva.

Od oktobra 2004. godine angažovana je kao saradnik, izabrana je aprila 2008. u zvanje asistenta, reizabrana je u julu 2012. godine, od aprila 2017. je u statusu stručnog saradnika na Katedri za analitičku hemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, gde aktivno učestvuje u realizaciji praktične nastave dva obavezna predmeta: Analitička hemija 1 i Analitička hemija 2; i dva izborna predmeta: Uvod u laboratorijski rad i Odabrana poglavlja analitičke hemije. Na anketama od strane studenata ocenjena je visokom ocenom (oko 4,70). Bila je član komisija za odbranu 56 diplomskih odnosno završnih radova. Komentor je jednog studentskog naučno-istraživačkog rada.

Od 2011. godine istraživač je na projektu Ministarstva nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom *Sinteza, kvantitativni odnosi između strukture i dejstva, fizičko-hemijska karakterizacija i analiza farmakološki aktivnih supstanci* (broj projekta 172033), čiji je rukovodilac prof. dr Danica Agbaba. Nakon postupka sprovedenog na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu, 26.11.2016. izabrana je u zvanje istraživač-saradnik.

Posедуje aktivno znanje engleskog jezika.

Do sada je objavila 5 radova (2 rada u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21), 1 rad u istaknutom međunarodnom časopisu (M22) i 2 rada u međunarodnim časopisima (M23)) i 8 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima štampanim u izvodu (M34).

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Валентина Радуловић

Број индекса 15/07

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

"Електрохемијско проучавање варениклина и бримонидина, и развој електроаналитичких метода за њихово одређивање у различитим матриксама"

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

Потпис аутора

У Београду, 07.05.2017.

В. Радуловић

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Валентина Радуловић
Број индекса 15/07
Студијски програм Фармацеутска хемија
Електрохемијско проучавање варениклина и бримонидина, и развој
Наслов рада електроаналитичких метода за њихово одређивање у различитим матриксама
Ментор Др сц. Вера Капетановић, редовни професор (у пензији) и
Др сц. Даница Агбаба, редовни професор

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива 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 аутора

У Београду, 07.05.2017.

В. Радуловић

Изјава о коришћењу

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

"Електрохемијско проучавање варениклина и бримонидина, и развој електроаналитичких метода за њихово одређивање у различитим матриксама"

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 07.05.2017.

В. Рагуловић

1. **Ауторство.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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 прерада.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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 прерада.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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.