



Univerzitet u Novom Sadu
Prirodno-matematički fakultet
Departman za hemiju, biohemiju i
zaštitu životne sredine



Olga Vajdle

Voltametrijske metode na bazi jednostavnih i savremenih
elektroda/senzora za određivanje odabranih analita od
farmakološkog značaja

-Doktorska disertacija-

Novi Sad, 2017.

Zahvalnica

Doktorska disertacija rađena je u Laboratoriji za Instrumentalnu analizu Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu.

Želela bih prvo da se zahvalim svom mentoru prof. dr Valeriji Gužvanj (Valéria Guzsvány), redovnom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, što me je prihvatila za studenta doktorskih studija i predložila temu moje doktorske disertacije. Želim da joj se zahvalim na pomoći tokom izvođenja eksperimenata i pisanja doktorske disertacije, na strpljenju, podršci, savetima, sugestijama i na nesebičnom prenošenju znanja i iskustva.

Zahvaljujem se prof. dr Biljani Abramović, redovnom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, na iskazanom interesovanju za moju doktorsku disertaciju i na datim savetima i sugestijama.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Janošu Čanadiju (János Csanádi), redovnom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, što je prof. dr Valeriji Gužvanj ustupio 3-dehidro-deoksiholnu kiselinu sintetisanu u Laboratoriji za organsku hemiju Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, na iskazanom interesovanju, savetima i na prenesenom znanju iz organske hemije i ^1H NMR tehnike.

Iskreno se zahvaljujem i prof. dr Aleksandru Đorđeviću, redovnom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, što je ustupio doksorubicin prof. dr Valeriji Gužvanj, na savetima i sugestijama i na interesovanju za doktorsku disertaciju.

Veliku zahvalnost dugujem i prof. dr Slobodanu Petroviću, redovnom profesoru Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, što je prof. dr Valeriji Gužvanj ustupio antibiotike eritromicin-etilsukcinat, azitromicin, klaritromicin i roksitromicin, na iskazanom interesovanju za doktorsku disertaciju, kao i na opštim diskusijama i prenetom znanju iz oblasti makrolida.

Zahvaljujem se i prof. dr Slavomiri Skrzipek (Sławomira Skrzypek), vanrednom profesoru na Departamanu za neorgansku i analitičku hemiju Univerziteta u Lođu, Poljska, na interesovanju za moju doktorsku disertaciju i na pruženim savetima i sugestijama.

Htela bih da se zahvalim prof. dr Zoltanu Konji (Zoltán Kónya), redovnom profesoru na Univerzitetu u Segedinu, Mađarska, što je omogućio nabavljanje srebrne žice neophodne za popravku obnovljive srebro-amalgam film elektrode i za uloženi trud tokom popravke pomenute elektrode. Takođe, želim da se zahvalim što je prof. dr Valeriji Gužvanj ustupio koloidno zlato sintetisano u njihovoj laboratoriji.

Zahvalnost dugujem i prof. dr Andreju Bobrovskom (Andrzej Bobrowski), redovnom profesoru na AGH Univerzitetu u Krakovu, Poljska, na iskazanom interesovanju za moje rezultate kao i na prenesenom znanju i savetima pre svega iz oblasti adsorptivne inverzne voltametrije.

Zahvaljujem se i kolegama Dušanu Škoriću na velikoj pomoći tokom snimanja ^1H NMR spektara, Jasmini Anojčić, Ani Tasić, Sandri Petrović i Nikoli Čelebiću na iskazanoj kolegijalnosti.

Zahvaljujem se prof. dr Vladimiru Saviću sa Univerziteta u Beogradu što je ustupio NMR uređaj prof. dr Janošu Čanadiju i dr Milošu Petkoviću sa Univerziteta u Beogradu što je učestvovao zajedno sa Dušanom Škorićem u sprovođenju završnih snimanja nekih ^1H NMR spektara.

Zahvaljujem se Milošu Bokorovu, sa Departmana za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, za urađena SEM/EDS merenja.

Zahvaljujem se projektima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije OI 172059, OI 172012, III 45005 i OI 172013, kao i CEEPUSIII mreži (CZ-0212-09-1516) koji su doprineli da se ovo istraživanje realizuje.

Veliku zahvalnost dugujem svojim roditeljima koji su verovali u mene, bodrili i podržavali me tokom svih godina studija.

Autor

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	TEORIJSKI DEO	3
2.1.	Antibiotici	3
2.1.1.	Antitumorni antibiotici. Doksorubicin	5
2.1.2.	Analitičke metode određivanja doksorubicina	7
2.1.2.1.	Određivanje doksorubicina primenom voltametrijskih metoda.....	7
2.1.2.2.	Određivanje doksorubicina primenom metoda tečne hromatografije visoke efikasnosti.....	9
2.1.3.	Makrolidni antibiotici	10
2.1.3.1.	Eritromicin	14
2.1.3.2.	Azitromicin	15
2.1.3.3.	Klaritromicin.....	16
2.1.3.4.	Roksitromicin.....	16
2.1.4.	Analitičke metode određivanja makrolidnih antibiotika	17
2.1.4.1.	Određivanje makrolidnih antibiotika primenom voltametrijskih metoda.....	17
2.1.4.2.	Određivanje makrolidnih antibiotika primenom metoda tečne hromatografije visoke efikasnosti.....	19
2.2.	Žučne kiseline	21
2.2.1.	Okso derivati žučne kiseline	22
2.2.2.	Analitičke metode određivanja žučnih kiselina	23
2.2.2.1.	Određivanje žučnih kiselina primenom voltametrijskih metoda	23
2.2.2.2.	Određivanje žučnih kiselina primenom metoda tečne hromatografije visoke efikasnosti.....	24
2.3.	Voltametrijske tehnike	25
2.3.1.	Pulsne voltametrijske tehnike	27
2.3.1.1.	Diferencijalno pulsna voltametrija.....	27
2.3.1.2.	Voltametrija sa pravougaonim talasima.....	28
2.3.2.	Inverzna (striping) voltametrija	30
2.3.3.	Radne elektrode	33
2.3.3.1.	Obnovljiva srebro-amalgam film elektroda i njena primena	33
2.3.3.2.	Elektroda od ugljenične paste i njena primena	38

2.3.3.3.	Elektroda od staklastog ugljenika. Bizmut-film elektroda i njena primena.....	44
2.4.	Druge tehnike primenjene u eksperimentalnom radu	47
2.4.1.	Nuklearna magnetna rezonanca.....	47
2.4.2.	Tečna hromatografija visoke efikasnosti.....	48
2.4.3.	Skenirajuća elektronska mikroskopija.....	50
3.	EKSPERIMENTALNI DEO	51
3.1.	Hemikalije i rastvori	51
3.2.	Instrumenti.....	54
3.3.	Postupci	59
3.3.1.	Voltometrija.....	59
3.3.1.1.	Priprema nativne i površinski modifikovane elektrode od ugljenične paste	59
3.3.1.2.	Voltometrijska karakterizacija i određivanje ciljnih analita primenom različitih tipova radnih elektroda	60
3.3.2.	Tečna hromatografija visoke efikasnosti.....	62
3.3.3.	¹ H NMR spektroskopija	62
4.	REZULTATI I DISKUSIJA.....	64
4.1.	Voltometrijsko određivanje analita od farmakološkog značaja primenom obnovljive srebro-amalgam film elektrode.....	64
4.1.1.	Voltometrijsko ponašanje doksorubicina i njegovo određivanje u model rastvoru i obogaćenom uzorku humanog urina.....	64
4.1.1.1.	Voltometrijska karakterizacija	64
4.1.1.2.	Voltometrijsko određivanje u model rastvoru.....	67
4.1.1.3.	Voltometrijsko određivanje u obogaćenom uzorku humanog urina	70
4.1.2.	Voltometrijsko ponašanje eritromicin-etilsukcinata i njegovo određivanje u model rastvoru i odabranim uzorcima.....	73
4.1.2.1.	Voltometrijska karakterizacija	73
4.1.2.2.	Određivanje u model rastvoru primenom voltometrijskih metoda i metode tečne hromatografije visoke efikasnosti.....	81
4.1.2.3.	Određivanje u odabranim uzorcima.....	88
4.1.3.	Voltometrijsko ponašanje azitromicina i njegovo određivanje u model rastvoru	92
4.1.3.1.	Voltometrijska karakterizacija	92
4.1.3.2.	Voltometrijsko određivanje u model rastvoru.....	101

4.1.4.	Voltametrijsko ponašanje klaritromicina i njegovo određivanje u model rastvoru	103
4.1.4.1.	Voltametrijska karakterizacija	103
4.1.4.2.	Voltametrijsko određivanje u model rastvoru.....	112
4.1.5.	Voltametrijsko ponašanje roksitromicina i njegovo određivanje u model rastvoru i odabranom farmaceutskom proizvodu	114
4.1.5.1.	Voltametrijska karakterizacija	114
4.1.5.2.	Voltametrijsko određivanje u model rastvoru.....	122
4.1.5.3.	Voltametrijsko određivanje u odabranom farmaceutskom proizvodu.....	123
4.2.	Voltametrijsko ponašanje 3-dehidro-deoksiholne kiseline i njeno određivanje u model rastvoru primenom <i>ex situ</i> pripremljene bizmut-film elektrode.....	125
4.2.1.	Priprema <i>ex situ</i> bizmut-film elektrode, osnovno voltametrijsko ponašanje elektrode i voltametrijska karakterizacija 3-dehidro-deoksiholne kiseline	126
4.2.2.	Voltametrijsko određivanje u model rastvoru	134
4.3.	Voltametrijsko određivanje makrolidnih antibiotika primenom elektrode od ugljenične paste	137
4.3.1.	Voltametrijsko ponašanje eritromicin-etilsukcinata i njegovo određivanje u model rastvoru.....	137
4.3.1.1.	Voltametrijska karakterizacija	137
4.3.1.2.	Voltametrijsko određivanje u model rastvoru.....	140
4.3.2.	Voltametrijsko ponašanje azitromicina i njegovo određivanje u model rastvoru	143
4.3.2.1.	Voltametrijska karakterizacija	143
4.3.2.2.	Voltametrijsko određivanje u model rastvoru.....	144
4.3.3.	Voltametrijsko ponašanje klaritromicina i njegovo određivanje u model rastvoru	151
4.3.3.1.	Voltametrijska karakterizacija	151
4.3.3.2.	Voltametrijsko određivanje u model rastvoru.....	154
4.3.4.	Voltametrijsko ponašanje roksitromicina i njegovo određivanje u model rastvoru i odabranom farmaceutskom proizvodu	156
4.3.4.1.	Voltametrijska karakterizacija	156
4.3.4.2.	Voltametrijsko određivanje u model rastvoru.....	158
4.3.4.3.	Voltametrijsko određivanje u odabranom farmaceutskom proizvodu.....	160

5.	ZAKLJUČAK	162
6.	CONCLUSION	168
7.	LITERATURA	174
8.	BIOGRAFIJA	186
9.	SPISAK NAUČNIH RADOVA.....	188
	KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	190
	KEYWORDS DOCUMENTATION.....	196

LISTA SKRAĆENICA

3-DH-DHK – 3-dehidro-deoksiholna kiselina

Ag/AgCl – Srebro/srebro-hloridna elektroda

AIDS – Sindrom stečene imunodeficijencije

A_p – Površina pika

ASV – Anodna inverzna (striping) voltometrija

Au-CPE – Elektroda od ugljениčne paste površinski modifikovana sa koloidnim zlatom

AZI – Azitromicin

BiFE – Bizmut-film elektroda

BiF-GCE – Elektroda od staklastog ugljenika površinski modifikovana bizmut-filmom

c – Koncentracija

CLA – Klaritromicin

CPE – Elektroda od ugljениčne paste

CPE-TCP – Elektroda od ugljениčne paste sa trikrezilfosfatom kao vezivnom tečnošću

CPS – Inverzna (striping) hronopotenciometrija

CV – Ciklična voltometrija

DAD – Detektor na bazi niza dioda

DNK – Dezoksiribonukleinska kiselina

DOX – Doksorubicin

D₂O – Deuterisana voda

DSS – 4,4-dimetil-4-silapentan-1-sulfonska kiselina

DPV – Diferencijalna pulsna voltometrija

E – Potencijal

E^0 – Standardni redoks potencijal

E_{acc} – Potencijal akumulacije

EDS – Energetsko disperzioni spektrometrijski detektor

EES – Eritromicin-etilsukcinat

E_p – Potencijal maksimuma pika

Fen – Fenoksalin

FT – Fourier-ova transformacija

Ga – Galijum

GCE – Elektroda od staklastog ugljenika

GD – Granica detekcije

GO – Granica određivanja

Hg(Ag)FE – Obnovljiva srebro-amalgam film elektroda

HIV – Humani imunodeficijenti virus

HPLC – Tečna hromatografija visoke efikasnosti

I – Jačina struje tj. intenzitet struje

I_p – Intenzitet struje maksimuma pika

KSV – Katodna inverzna (striping) voltometrija

KŽE – Kapljuća živina elektroda

LC – Tečna hromatografija

LC-MS/MS – Tečna hromatografija sa tandemskim masenim spektrometrijskim detektorom

LSV – Linearno skenirajuća voltometrija

MeOH – Metanol

NAD⁺ – Nikotinamid adenin dinukleotid

NMR – Nuklearna magnetna rezonanca

PIGE – Parafilmom impregnirana grafitna elektroda

p*K_k* – Logaritamska mera konstante disocijacije

r – Koeficijent korelacije

ROX – Roksitromicin

RSD – Relativna standardna devijacija

SEM – Skenirajući elektronski mikroskop

SWV – Voltometrija sa pravougaonim talasima

SW-AdSV – Adsorptivna inverzna (striping) voltometrija sa pravougaonim talasima

t_{acc} – Vreme akumulacije

v – Brzina skeniranja

v^{1/2} – Kvadratni koren brzine skeniranja

ZKE – Zasićena kalomelova elektroda

1. UVOD

S obzirom na činjenicu da se danas antibiotici široko primenjuju kako u humanoj medicini tako i u veterini i da njihova prekomerna upotreba može da ima ozbiljne posledice kao što su npr. pojava rezistencije i alergijske reakcije, neophodno je razviti pouzdane metode za njihovo određivanje i njihov monitoring u realnim uzorcima.

Žučne kiseline predstavljaju fiziološke deterdžente koji su neophodni za regulisanje rada žuči, a stvaranje ovih kiselina predstavlja glavni put izbacivanja viška holesterola iz organizma. Ukoliko je koncentracija žučnih kiselina izrazito visok, one mogu da budu citotoksične po organizam i zbog toga je neophodno razviti pouzdane analitičke metode za praćenje njihove koncentracija u odabranim uzorcima.

Danas se najčešće koristi tečna hromatografija visoke efikasnosti kuplovana sa različitim tipovima detektora za određivanje analita od farmakološkog značaja. Međutim, ova tehnika je relativno skupa i zahteva prethodnu pripremu uzorka. S toga, teži se ka razvoju brze, osetljive i jednostavne analitičke metode za određivanje analita od farmakološkog značaja, kao što su elektroanalitičke metode pre svega iz oblasti analitičke voltametrije. Poznato je da se elektrode od žive, ugljenične elektrode kao što su elektroda od staklastog ugljenika, elektroda od ugljenične paste itd. u kombinaciji sa linearno skenirajućom voltametrijom ili sa odabranim pulsni voltametrijskim tehnikama primenjuju za određivanje farmakološki važnih ciljnih analita.

Doktorska disertacija bavi se razvojem i primenom različitih voltametrijskih metoda, kao i voltametrijskih senzora za određivanje analita od farmakološkog značaja kao što su antibiotici i žučne kiseline u model rastvorima i u nekim model uzorcima, kao i u odabranim realnim uzorcima kao što je komercijalna formulacija. U tu svrhu primenjuju se različiti tipovi elektroda kao što su obnovljiva srebro-amalgam film elektroda, elektroda od staklastog ugljenika površinski modifikovana bizmut-filmom i elektroda od ugljenične paste u svom nativnom obliku i površinski modifikovana sa koloidnim zlatom.

U **Teorijskom delu** opisani su ciljni analiti korišćeni u ekpserimentalnom radu, sa ciljem da se istakne važnost razvoja analitičkih metoda za njihovo određivanje, kao i literaturni pregled

do sada primenjenih analitičkih metoda zasnovanih na tačnoj hromatografiji visoke efikasnosti i voltametrijskim tehnikama. Takođe u ovom poglavlju su opisane radne elektrode koje su se koristile u eksperimentalnom delu doktorske disertacije, sa osvrtom na njihove elektrohemijske karakteristike, kao i literaturni pregled njihove primene.

U **Eksperimentalnom delu** navedene su korišćene hemikalije i rastvori, instrumenti primenjeni u eksperimentalnom radu, kao i postupak rada.

U poglavlju **Rezultati i diskusija** predstavljeni su rezultati optimizacije i primene voltametrijskih metoda za određivanje analita od farmakološkog značaja tj. predstavnika antracikličnog antibiotika doksorubicina, pojedinih makrolidnih antibiotika i okso derivata žučne kiseline, 3-dehidro-deoksiholne kiseline, zasnovano na njihovoj oksidaciji i/ili redukciji kako u model rastvoru tako i u model uzorcima i odabranim realnim uzorcima. Takođe, u ovom poglavlju prikazani su rezultati optimizacije i određivanja odabranog makrolidnog antibiotika primenom tačne hromatografije visoke efikasnosti kao komparativne metode za određivanje ciljnog analita u model rastvoru i realnom uzorku.

2. TEORIJSKI DEO

2.1. Antibiotici

Po definiciji, pod antibioticima se smatraju samo prirodni proizvodi mikroorganizama koji sprečavaju rast ili uništavaju druge mikroorganizme. Međutim postoji veliki broj polusintetskih antibiotika, odnosno antibiotika dobijenih biosintezom, što uključuje fermentaciju, izolaciju i prečišćavanje i prevođenje dobijenog proizvoda u farmaceutski oblik, nakon čega se dobijeni lek hemijski modifikuje. Danas su u svetu najzastupljeniji sintetski antibiotici koji su dobijeni hemijskom sintezom [1]. U bukvalnom prevodu reč antibiotik (anti - što znači protiv i reči bios - što znači život) znači "protiv života". Ovo značenje je "kontradiktorno" s obzirom na činjenicu da su antibiotici spasili preko sedam miliona života u toku poslednjih pola veka [2].

Borba protiv mikroorganizama datira još od 3500 godina pre nove ere. Veći napredak u borbi protiv štetnih mikroorganizama počinje u 19. veku. Roberts je 1874. godine uočio da kultura plesni *Penicillium glaucum* ne pokazuje bakterijsku infekciju. Paster i Žuber su otkrili da kultura antraksa zaražena sa plesni sprečava dalji razvoj bakterija antraksa. Takođe, Paster je uveo postupak pasterizacije, kao način zaustavljanja razvoja i ubijanje bakterija. Dančesn je 1897. godine otkrio supstance koje zaustavljaju dalji rast bakterija. Izvor tih supstanci je bila plesan penicilina. Prvi prirodni antibiotik nazvan je penicilin a predstavlja supstancu plesni *Penicillium notatum*. Otkriće penicilina vezano je za škotskog naučnika Fleminga [3].

Klasifikacija antibiotika može se izvršiti na osnovu različitih kriterijuma. Najčešća podela antibiotika je na osnovu klasa mikroorganizama na koje deluju. Oni mogu biti:

- antivirusni
- antibakterijski
- antifungalni (antimikotici) i
- antiprotozalni antibiotici [1].

Osetljivost bakterije na antibiotik uveliko zavisi od strukture ćelijske membrane date bakterije, jer to određuje mogućnost antibiotika da prodre u unutrašnjost bakterijske ćelije. Stoga se antibakterijski antibiotici dele na osnovu aktivnosti protiv:

- gram-pozitivnih
- gram-negativnih bakterija i
- mikobakterija [1].

Prema načinu delovanja antibiotici mogu biti:

- baktericidi - ubijaju mikroorganizme i
- bakteriostatici - sprečavaju razvoj mikroorganizama [3].

Antibiotici se prema biološkoj aktivnosti mogu podeliti na one:

- koji deluju na sintezu bakterijske ćelijske membrane (ili je razaraju)
- koji deluju na ćelijsku membranu citoplazme
- koji ometaju sintezu proteina u ćeliji bakterija i
- koji utiču na metabolizam nukleinskih kiselina [3].

Prirodni ili polusintetski antibiotici sa zajedničkom osnovnom hemijskom strukturom grupisani su u klasu koja je nazvana po članu koji je prvi otkriven ili po glavnoj hemijskoj strukturi. Ovaj način klasifikacije je veoma koristan u praksi i koristiće se u daljem tekstu teorijskog dela ove disertacije. Na osnovu nje antibiotici se dele na:

- β -laktamske (penicilini i cefalosporini)
- tetracikline
- aminoglikozidne antibiotike (aminociklitoli)
- makrolide
- anzamicine
- peptidne antibiotike
- glikopeptidne antibiotike
- antitumorne antibiotike i
- razne antibiotike [1].

Da bi antibiotici bili primenljivi u terapijske svrhe treba da deluju na što veći broj mikroorganizama, da ne budu toksični po organizam u kojem deluju, da su rastvorni u vodi i fiziološkim tečnostima. Takođe, bitno je da se degradacioni proizvodi antibiotika, u obliku netoksičnih jedinjenja, lako i brzo izlučuju iz organizma [3]. Antibiotici imaju svoj

karakteristični "spektar" antimikrobnog dejstva što znači da ne deluju svi antibiotici na sve mikroorganizme, nego samo na određene, dok na druge deluju slabije ili uopšte ne deluju [4].

I pored svih dobrih strana otkrića antibiotika (kao što je npr. suzbijanje tuberkuloze otkrićem streptomicina) treba biti oprezan i na adekvatan način upotrebljavati antibiotike. Nesavesnom upotrebom antibiotika može doći do pojave otpornosti odnosno rezistencije mikroorganizama na dati antibiotik. Sve do 1950. godine penicilin je bio dostupan svima, bez recepta i zbog toga je često ovaj antibiotik bio korišćen bez preke potrebe. Kao dokaz pojave rezistencije mikroorganizma zbog nesavesne upotrebe penicilina jesu podaci istraživanja jedne bolnice koja je prijavila 1946. godine da je 14% iz pacijanata izolovanih *Staphylococcus* bilo otporno na penicilin, a 1950. godine čak 59% [3].

Rezistencija bakterija se može ispoljiti na različite načine kao što su:

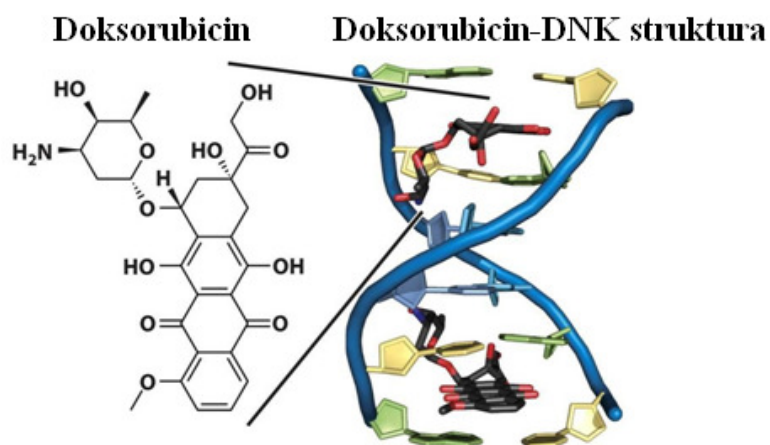
- primarna rezistencija - otpornost *Pseudomonas*-a na skoro sve antibiotike
- stečena rezistencija - otpornost mnogih bakterija tokom primene antibiotika i
- ukrštena rezistencija - otpornost bakterija prema svim antibioticima iz neke grupe [5].

2.1.1. Antitumorni antibiotici. Doksorubicin

Zajedničko za sve članove ove klase antibiotika jeste da svi deluju na replikaciju dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) ali različitim mehanizmima. Jedan od predstavnika antitumornih antibiotika, od istorijskog značaja, jeste aktinomicin koji u svojoj strukturi sadrži fenoksazin prsten supstituisan sa dva identična peptidna lanca i on se ugrađuje u DNK čime utiče na samo funkcionisanje DNK [1].

U kliničkoj praksi daunorubicin i doksorubicin (DOX) predstavljaju najznačajnije predstavnike ove klase antibiotika [1] i pripadaju podgrupi antitumornih antibiotika, antineoplasticima, tj. podgrupi antitumornih antibiotika koji se koriste u terapiji malignih tumora. Oni pripadaju jednoj veoma važnoj klasi pomenute grupe antibiotika, antraciklinima, koji se dugi niz godina primenjuju za lečenje različitih tipova kancera. Mehanizam delovanja antraciklina je ispitivan dugi niz godina ali ni do danas nije pouzdano utvrđen tačan način njihovog delovanja. Glavni mehanizam delovanja sastoji se od umetanja antibiotika u lanac DNK (ilustrativni primer

ugradjivanja DOX u DNK, slika 1), inhibicije topoisomerase II i proizvodnje slobodnih radikala koji napadaju i oštećuju DNK [6].



Slika 1. Ilustrativni prikaz ugrađivanja DOX u DNK [7]

U eksperimentalnom delu ove doktorske disertacije vršena je voltametrijska karakterizacija i određivanje doksorubicina zbog čega će biti dat detaljniji opis upravo ovog antitumornog antibiotika.

Doksorubicin

Kao što je u prethodnom poglavlju spomenuto, DOX predstavlja jedan od najčešće primenjivanih antitumornih antibiotika u kliničkoj praksi prilikom lečenja kancera, malignih neoplazmi.

Naziv po IUPAC nomenklaturi ovog antibiotika je (7S,9S)-7-[(2R,4S,5S,6S)-4-amino-5-hidroksi-6-metiloksan-2-il]oksi-6,9,11-trihidroksi-9-(2-hidroksiacetil)-4-metoksi-8,10-dihidro-7H-tetracen-5,12-dion. U svojoj strukturi, kao i kod svih antraciklinskih antibiotika, nalazi se tetraciklični prsten sa hinon-hidrohinon grupama na susednim prstenovima i supstituisan amino šećer, daunozamin [6], kao što se vidi na slici 1.

DOX je izolovan iz mutanta *Streptomyces peucetius* i pokazivao je širi spektar delovanja i aktivnost prema čvrstim tumorima za razliku od prethodno izolovanog daunorubicina iz sojeva *Streptomyces peucetius* [8]. Oba antibiotika izolovana su ranih 1960-tih godina i dan danas se

široko primenjuju u hemoterapijama. Iako je DOX prirodni antibiotik, industrijski se proizvodi u više faza počevši od daunorubicina zbog nestabilnosti DOX u različitim reakcionim uslovima [6].

Adriamycin (Pfizer, New York City, New York, USA), komercijalni naziv doksorubicina, uglavnom se koristi kao glavna komponenta prilikom lečenja kancera dojke, dečijih čvrstih tumora i sarkoma mekih tkiva [6].

Međutim, loša strana primene antracikličnih antibiotika, pa samim tim i DOX-a, je da izazivaju dozno - zavisnu kardioksičnost. Kardioksičnost se može objasniti delovanjem ovih antibiotika na različite biohemijske procese u miocitima ili proizvodnjom slobodnih radikala koji mogu da dovedu do različitih subćelijskih promena miokarda uključujući i spor gubitak miofibrila [9].

2.1.2. Analitičke metode određivanja doksorubicina

Zbog veoma opasnih neželjenih dejstava prilikom nepravilne upotrebe DOX, neophodno je razviti pouzdanu i osetljivu analitičku metodu za praćenje ovog analita u različitim tipovima složenih realnih uzoraka. Među analitičkim tehnikama za praćenje koncentracije DOX najčešće je korišćena tečna hromatografija visoke efikasnosti (HPLC) kuplovana sa različitim tipovima detektora. Elektroanalitičke metode predstavljaju odgovarajuću alternativu gore navedenim metodama zbog niske cene instrumenta, brze i osetljive analize i jednostavnije pripreme uzoraka za merenje. Voltametrijske metode zasnovane na primeni različitih tipova radnih elektroda pokazale su se pogodne za određivanje ovog leka zahvaljujući činjenici da DOX u svojoj strukturi sadrži elektroaktivne grupe [10-14].

2.1.2.1. Određivanje doksorubicina primenom voltametrijskih metoda

Hinon-hidrohinon parovi, prisutni u strukturi DOX-a, predstavljaju primere organskih redoks sistema i proučavanje elektrohemijskog ponašanja ovih jedinjenja je aktuelno od početka dvadesetog veka [15].

Zhang i dr. su određivali adriamicin primenom elektrode od ugljenične paste (carbon paste electrode, CPE) u prisustvu cetiltrimetilamonium-bromida. Intenzitet redukcionog signala

adriamicina se linearno menja sa koncentracijom u opsegu od $2,5 \cdot 10^{-8}$ mol L⁻¹ do $5 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹. Granica detekcije (GD) je bila $4 \cdot 10^{-10}$ mol L⁻¹ pri vremenu akumulacije od 3 min. Primenom razvijene metode adriamicin je određivan u uzorcima urina pacijenata koji primaju hemoterapiju sa adriamicinom [16].

Hu i Li su primenili elektrodu od staklastog ugljenika (glassy carbon electrode, GCE) u koju je inkorporiran Ni jon kao radnu elektrodu za određivanje adriamicina. U 0,1 mol L⁻¹ acetatnom puferu uočen je pik od adriamicina na potencijalu -0,55 V u odnosu na zasićenu kalomelovu elektrodu (ZKE). Linearnost metode postignuta je u koncentracionom opsegu $5,2 \cdot 10^{-7}$ - $1,0 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹ pri čemu je granica detekcije iznosila $2,7 \cdot 10^{-7}$ mol L⁻¹. Metoda je primenjena za određivanje adriamicina u uzorcima urina [17].

Komorsky-Lovrić je proučavala kinetiku površinske redoks reakcije adriamicina (doksorubicin-hidrohlorida) adsorbovanog na parafinom impregniranoj grafitnoj elektrodi (PIGE) i na živinoj elektrodi primenom voltometrije sa pravougaonim talasima. U 0,9 mol L⁻¹ KNO₃ puferu pH 4,65 standardne konstante brzine elektrodne reakcije prvog hinon/hidrohion redoks para na PIGE i živinoj elektrodi iznose $k_{s1}=49 \pm 12$ s⁻¹ i $k_{s1}=147 \pm 36$ s⁻¹. Pod istim uslovima standardna konstanta brzine drugog redoks para na PIGE je manja od 4 s⁻¹ i koeficijent elektron transfera redukcije je $\alpha_2=0,35$ [11].

Kano i dr. su proučavali elektrohemijsko ponašanje adriamicina primenom ciklične voltometrije (CV), voltometrije sa naizmeničnom strujom i kapljuće živine elektrode (KŽE), kvinizarin je primenjen kao model jedinjenje. I adriamicin i kvinizarin su izrazito adsorbovani na živinoj elektrodi sa njihovim aromatičnim prstenom orjentisanim paralelno prema elektrodnoj površini i daju dva seta redukcionih talasa. Prvi talas, na osnovu hinonske grupe adsorbovanog adriamicina ili kvinizarina može biti objašnjen kao jedno - elektronska površinska redoks reakcija. Utvrđeni su formalni standardni redoks potencijali, konstanta formiranja semihinona i konstanta brzine prenosa naelektrisanja površinske redoks reakcije hinonske grupe. Pošto redukovana forma adriamicina nije stabilna ona se konvertuje u stabilnu i elektrohemijski aktivnu formu za nekoliko minuta pri pH 4,54. Drugi talas se javlja na negativnijem potencijalu kao posledica kinetičkog ili katalitičkog procesa [12].

Vacek i dr. su primenili voltometriju sa linearno skenirajućim potencijalom i inverznu (striping) hronopotenciometriju (chronopotentiometric stripping voltammetry, CPS) sa konstantom jačinom struje za analizu doksorubicina na KŽE. Po prvi put CPS je primenjena za proučavanje reverzibilne redukcije hinonske grupe DOX na -0,45 V kao i elektrodnog procesa pri čemu se formira ireverzibilni signal na oko -1,45 V na KŽE u 0,2 mol L⁻¹ acetatnom ili Briton-Robinsonovom puferu različitih pH vrednosti. CPS metoda je takođe primenjena za praćenje interakcije DOX-a sa dvolančanim tj. heliksom i jednolančanim DNK. U prisustvu dvolančanog DNK uočavaju se izraženije promene u intenzitetu signala DOX što je u saglasnosti sa jakom interkalacijom redoks centra DOX-a u dvostruki heliks DNK [10].

2.1.2.2. Određivanje doksorubicina primenom metoda tečne hromatografije visoke efikasnosti

Arnold i dr. su razvili tečnu hromatografiju sa tandemskim masenim spektrometrijskim detektorom (LC-MS/MS) za identifikaciju i kvantifikaciju doksorubicina i ključnih metabolita u biološkim uzorcima male zapremine. Linearnost kalibracione krive primenom razvijene metode je postignuta u opsegu koncentracija 0,125-10,000 nmol L⁻¹. Mogućnost određivanja doksorubicina i detekcije metaboličkih produkata omogućava uvid u toksičnost i biološku raspoloživost leka ugrađenog u nosače kao što su lipozomi [18].

Kümmerle i dr. su određivali doksorubicin primenom osetljive HPLC tehnike kuplovane sa fluorescentnim detektorom u četiri različita uzorka: infuziji, serumu i tkivima sa manjim ili većim sadržajem doksorubicina. Daunorubicin je korišćen kao interni standard. Precipitacija proteina izvršena je tako što je u 500,0 µL uzorka dodato 250,0 µL acetona i 50,0 µL 70% vodenog rastvora cink(II)-sulfata. Tako dobijen supernatant uparen je do suva na temperaturi od 60 °C za tačno 45 minuta u struji azota. Čvrsti ostatak je rastvoren u 200,0 µL prečišćene vode. Za analizu korišćena je Nukleozil 100-5 µm C18 AB kolona opremljena sa pretkolonom (Nukleozil 100-5 µm C₆H₅ (fenil)). Primeno je gradijentno eluiranje sa acetonitrilom i 0,2% 1-heptansulfonskom kiselinom, pH 4. Analit je detektovan fluorescentnim detektorom pri čemu je talasna dužina ekscitacije bila 480 nm, a talasna dužina emisije 550 nm. Linearnost kalibracione krive postignuta je u koncentracionom opsegu 2-1000 ng mL⁻¹ u sličaju infuzije i seruma, a prilikom određivanja u tkivima linearnost kalibracione krive postignuta je u opsegu

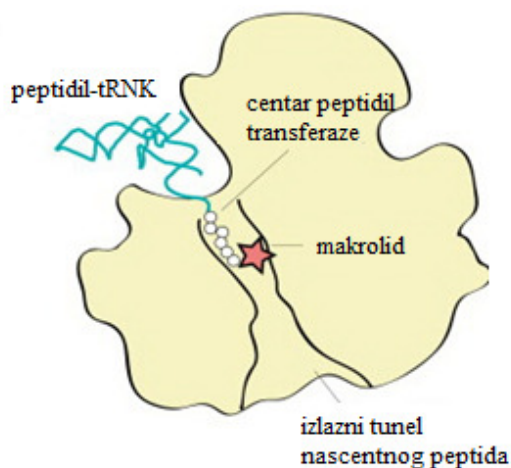
koncentracija 0,1-750 $\mu\text{g g}^{-1}$. Metoda je uspešno primenjena za određivanje doksorubicina u otpadnoj vodi, serumu i tkivima svinja i pacova [19].

Ricciarello i dr. su primenili HPLC sa elektrohemijским detektorom za istovremeno određivanje epirubicina, 13-*S*-dihidroepirubicina, doksorubicina i 13-*S*-dihidrodoksorubicina u humanoj plazmi. Primenjena je C18 reverzno-fazna kolona, a mobilna faza je bila voda : acetonitril (71:29, V/V) uz dodatak 0,05 mol L⁻¹ Na₂HPO₄ i 0,05% V/V trietilamina. pH vrednost mobilne faze podešena je do pH 4,6 sa limunskom kiselinom. Linearnost metode je postignuta u koncentracionom opsegu 1-500 ng mL⁻¹ za sva četiri ispitivana analita. Razvijena metoda je primenjena za analizu uzoraka humane plazme pacijenata koji su lečeni sa epirubicinom uz primenu doksorubicina kao internog standarda [20].

2.1.3. Makrolidni antibiotici

Makrolidi, velika grupa antibiotika, dobili su naziv na osnovu strukture jer sadrže makrociklični laktoski prsten. Osnovna klasifikacija makrolida vrši se na osnovu broja ugljenikovih atoma u makrocikličnom laktoskom prstenu. Najznačajniji makrolidi u svojoj strukturi sadrže 14-očlani, 15-očlani ili 16-očlani laktoski prsten za koji je vezan jedan ili više šećera, najčešće dezoamin i kladinoza, glikozidnim vezama [21,22].

Antibiotici iz ove grupe koji pokazuju slična antibakterijska svojstva deluju na gram-pozitivne i neke gram-negativne bakterije uključujući *Campylobacter* i *Haemophilus* ali ne i većinu *Enterobacteriaceae*. Aktivni su i protiv *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Chlamydia*, *Legionella* i *Coxiella*. Neki makrolidi se u novije vreme primenjuju u lečenju oportunističkih infekcija kod inficiranih pacijenata sa humanim imunodeficientnim virusom (HIV) [23]. Makrolidni antibiotici predstavljaju dobru alternativu prilikom lečenja pacijenata alergičnih na penicilin zbog veoma sličnog antibakterijskog dejstva penicilinu [22]. Njihovo dejstvo zasniva se na vezivanju za 50S subjedinicu bakterijskog ribozoma čime se inhibira sinteza proteina bakterija jer se blokira translokacija i produžavanje peptidnih lanaca (slika 2) [5].



Slika 2. Mesto vezivanja makrolida na većoj strani ribozomalne podjedinice 50S [24]

Široka upotreba makrolidnih antibiotika dovela je do pojave otpornosti pojedinih sojeva bakterija na njihovo dejstvo naročito među *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus piogenes* i *Staphylococcus aureus*. Zbog pojave rezistencije razvija se treća generacija makrolida čiji predstavnik je ketolidni telitromicin [25].

U toku lečenja zaraznih bolesti makrolidni antibiotici zauzimaju važno mesto zbog njihove relativne neškodljivosti i odgovarajuće širokog spektra antimikrobnog delovanja. Danas se ovi antibiotici uglavnom koriste pri lečenju cistične fibroze, difuznog panbronhiolitisa, a mogu da se primene i za lečenje hronične opstruktivne bolesti pluća, hroničnog sinusitisa, astme, bronhiektazije itd. [26,27]. Na osnovu dobijenih rezultata detaljnih pretkliničkih i kliničkih istraživanja, može se reći da makrolidni antibiotici imaju imunomodulatorna svojstva, dok se u osnovi takvih delovanja nalazi i inhibicija proizvodnje faktora virulencije *Pseudomonas aeruginosa* i nastanka biofilma. Posledice ovakvog delovanja makrolidnih antibiotika vidljive su i pri lečenju zaraznih bolesti kao što su vanbolnički stečena pneumonija i sepsa, a manifestuju se kroz veću stopu preživljavanja i kraći boravak u bolnici [26]. U kliničkoj praksi među makrolidnim antibioticima najzastupljeniji su eritromicin, klaritromicin i azitromicin koji se primenjuju kod lečenja infekcija disajnih puteva. Eritromicin je vrlo efikasan u borbi sa najučestalijim bakterijskim patogenima disajnih sistema, ali pokazuje slabu aktivnost na vrste *Haemophilus influenzae*.

Makrolidni antibiotici pokazuju jedinstvenu farmakokinetiku. Iako su njihove koncentracije u serumu niske, njihova koncentracija u tkivima je izrazito visoka i može da bude višestruko veća od koncentracije u plazmi, u zavisnosti od makrolida. Makrolidi se skupljaju u različitim vrstama ćelija ali najviše se skladište u fagocitnim ćelijama kao što su polimorfonuklearni leukociti, monociti i makrofazi, gde su unutarćelijske koncentracije ponekad sto puta veće od vanćelijskih koncentracija [28].

Od neželjenih dejstava prilikom primene makrolidnih antibiotika, najčešće se javljaju gastrointestinalne tegobe (koje su obično blaže i ređe prilikom primene klaritromicina i azitromicina, nego u slučaju primene eritromicina), opasnost od pseudomembranskog kolitisa, alergijske reakcije, holestaza i žutica [5,28].

Neki od značajnijih makrolidnih antibiotika predstavljeni su u tabeli 1.

Tabela 1. Pojedini makrolidni antibiotici i njihove strukture [29-35]

Trivijalni naziv	Naziv po IUPAC-u	Molekulska formula	Strukturna formula
<i>Eritromicin A</i>	(3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>R</i> ,11 <i>R</i> ,12 <i>R</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>R</i>)-6- {[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-4-(dimetilamino)-3- hidroksi-6-metiloksan-2-il]oksi}- 14-etil-7,12,13-trihidroksi-4- {[(2 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)- 5-hidroksi-4-metoksi-4,6-dimetiloksan-2- il]oksi}- 3,5,7,9,11,13-heksametil-1- oksaciklotetradekan-2,10-dion	$C_{37}H_{67}NO_{13}$	
<i>Azitromicin</i>	(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,10 <i>R</i> ,11 <i>R</i> ,12 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>R</i>)- 2-etil-3,4,10-trihidroksi-3,5,6,8,10,12,14- heptametil-15-okso-11-[[3,4,6-trideoksi- 3-(dimetilamino)-β-D-ksilo- heksopiranozil]oksi]-1-oksa-6- azaciklopentadek-13-il 2,6-dideoksi-3- <i>C</i> - metil-3- <i>O</i> -metil-α- <i>L</i> -ribo-heksopiranozid	$C_{38}H_{72}N_2O_{12}$	
<i>Roksitromicin</i>	(3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>R</i> ,11 <i>S</i> ,12 <i>R</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>R</i>)-6- {[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-4-(dimetilamino)-3- hidroksi-6-metiloksan-2-il]oksi}-14-etil- 7,12,13-trihidroksi-4-[[2 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-5- hidroksi-4-metoksi-4,6-dimetiloksan-2- il]oksi]-3,5,7,9,11,13-heksametil-10- (2,4,7-trioksa-1-azaoktan-1-iliden)-1- oksaciklotetradekan-2-on	$C_{41}H_{76}N_2O_{15}$	
<i>Spiramicin</i>	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>R</i> ,11 <i>E</i> ,13 <i>E</i> ,16 <i>R</i>)-10- {[(2 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-5-(dimetilamino)-6- metiltetrahidro-2 <i>H</i> -piran-2-il]oksi}-9,16- dimetil-5-metoksi-2-okso-7-(2- oksoetil)oksacikloheksadeka-11,13-dien- 6-il 3,6-dideoksi-4- <i>O</i> -(2,6-dideoksi-3- <i>C</i> - metil-α- <i>L</i> -ribo-heksopiranozil)-3- (dimetilamino)-α- <i>D</i> -glukopiranozid	$C_{43}H_{74}N_2O_{14}$	
<i>Klaritromicin</i>	(3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>R</i> ,11 <i>S</i> ,12 <i>R</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i>)-6- {[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-4-(dimetilamino)-3- hidroksi-6-metiloksan-2-il]oksi}-14-etil- 12,13-dihidroksi-4-[[2 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-5- hidroksi-4-metoksi-4,6-dimetiloksan-2- il]oksi]-7-metoksi-3,5,7,9,11,13- heksametil-1-oksaciklotetradekan-2,10- dion	$C_{38}H_{69}NO_{13}$	

Ova doktorska disertacija se bavi voltametrijskom karakterizacijom eritromicin-etilsukcinata (EES), azitromicina (AZI), klaritromicina (clarithromycin, CLA) i roksitromicina (roxithromycin, ROX) i njihovim određivanjem, kako u model rastvorima, tako i u različitim model uzorcima i nekim realnim uzorcima.

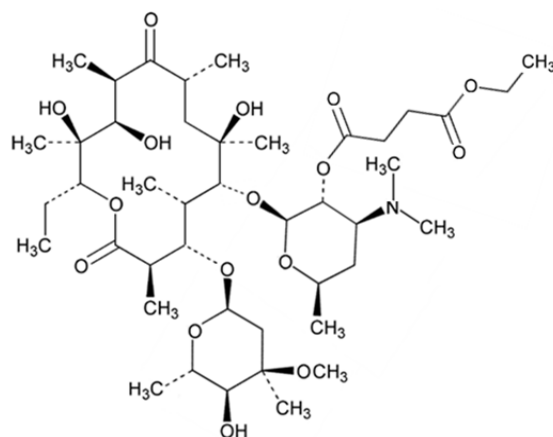
2.1.3.1. Eritromicin

Eritromicin kao prvi komercijalno dostupni makrolidni antibiotik primenjuje se od ranih 1950-tih godina [36]. Izolovan je iz *Streptomyces erythreus* u toku fermentacije i jedan je od najčešće primenjivanih antibiotika iz ove grupe, naročito kod pacijenata alergičnih na penicilin [37]. Eritromicin je prekursor u sintezi drugih makrolidnih antibiotika kao što su azitromicin, klaritromicin i roksitromicin [38]. U svojoj strukturi, koja je prikazana u tabeli 1, sadrži 14-očlani laktonski prsten za koji su β -glikozidnim vezama vezani L-kladinoza i amino šećer D-dezozamin [22]. Eritromicin predstavlja kompleks veoma slične četiri supstance eritromicina A, B, C i D [39] od kojih eritromicin A predstavlja glavnu i najviše aktivnu komponentu, dok su ostale komponente prisutne u tragovima. Eritromicin B u svojoj strukturi ne sadrži hidroksilnu grupu u položaju 12, eritromicin C nema metil-grupu u položaju 3", a eritromicin D u svojoj strukturi nema ni hidroksilnu grupu u položaju 12, ni metil-grupu u položaju 3" u odnosu na strukturu eritromicina A.

Eritromicin je nestabilan u kiseljoj sredini u kojoj se formiraju degradacioni proizvodi koji imaju slabiju antibakterijsku aktivnost [40,41]. U želji da se spreči degradacija eritromicina u kiseljoj sredini, neophodno je izvršiti njegovu derivatizaciju (esterifikaciju ili dodatak soli). U praksi se najčešće koriste dve esterifikovane forme eritromicina: eritromicin-etilsukcinat i eritromicin-estolat. U slučaju oralne primene eritromicin u obliku soli stearata ili u esterifikovanom obliku se takođe koristi dok za intravensku primenu koristi se eritromicin-gluceptat i eritromicin-laktobionat [42].

Eritromicin je efikasan za lečenje infekcija izazvanih nekim intracelularnim patogenima kao što su *Legionella*, *Mycoplasma* i *Chlamydia* i često se koristi u tretmanu gornjeg respiratornog trakta, kao i za lečenje infekcija kože i mekih tkiva izazvanih različitim mikroorganizmima [36]. Koristi se i za zaštitu životinja i poljoprivrednih useva od delovanja bakterija [43].

U ovoj doktorskoj disertaciji kao ciljni analit za voltametrijsku karakterizaciju i određivanje eritromicina koristio se eritromicin-etilsukcinat čija je struktura prikazana na slici 3.



Slika 3. Struktura eritromicin-etilsukcinata

2.1.3.2. Azitromicin

Azitromicin je jedan od novijih makrolidnih antibiotika i predstavlja polusintetički derivat eritromicina [44]. U svojoj strukturi sadrži 15-očlani laktonski prsten i metil supstituisan azot u aglikonskom prstenu (tabela 1). Ove strukturne promene dovele su do boljih mikrobioloških i farmakokinetičkih osobina azitromicina i bolju stabilnost u kiseloj sredini u poređenju sa eritromicinom [45].

Pokazuje superiorno terapeutsko dejstvo u poređenju sa starijim makrolidima, uključujući širi antibakterijski spektar delovanja sa dodatnim antimalarijskim aktivnostima [46]. Zbog specifične farmakokinetike koju poseduje AZI, lečenje ovim antibiotikom je veoma kratko, od 3 do 4 dana, a u organizmu ostaje do 14 dana. Lako prodire u tkiva i leukocite u kojima se dugo zadržava i iz kojih se sporo eliminiše. Preporučene doze azitromicina za odrasle su 500 mg/dan, a za decu 10 mg/kg jednom dnevno [5]. Azitromicin se primenjuje kod lečenja oportunističkih infekcija kod sindroma stečene imunodeficijencije (AIDS), toksoplazmoza, infekcije respiratornog trakta [47], hronične upale pluća, upale grla, sindroma bronhitisa, astme, polno prenosivih i kožnih bolesti [45,48]. Efikasan je protiv gram-pozitivnih bakterija, mikoplazme, pojedinih anaerobnih bakterija i atipičnih patogenih mikroorganizama [45].

Prilikom primene AZI-a kao neželjena dejstva kod nekih pacijenata mogu se javiti diareja, mučnina, bol u stomaku i glavobolja ili vrtoglavica [36].

2.1.3.3. Klaritromicin

Klaritromicin je noviji polusintetski makrolidni antibiotik [49] dobijen tako što je C₆ hidroksilna grupa eritromicina supstituisana metil-grupom (tabela 1). Ovom strukturnom promenom poboljšana je stabilnost CLA-a u kiseloj sredini kao i resorpcija nakon oralne primene, u odnosu na eritromicin [4,50].

Klaritromicin ima slično antibakterijsko dejstvo u poređenju sa eritromicinom s tim da jače deluje na *Mycobacterium avium* kompleks u odnosu na eritromicin [4]. Primenjuje se kod lečenja infekcija respiratornog trakta, kože i potkožnog tkiva, urogenitalnih infekcija kao i prilikom iskorenjivanja heliko bakterije [49].

Pojava neželjenih dejstava prilikom primene CLA-a je znatno ređa nego primenom eritromicina. Najčešća neželjena dejstva koja izaziva klaritromicin su mučnina, bol u stomaku glavobolja, itd. [36].

2.1.3.4. Roksitromicin

Roksitromicin takođe pripada podgrupi polusintetičkih makrolidnih antibiotika i predstavlja derivat eritromicina [51]. Dobijen je tako što je keto grupa 14-očlanog laktonskog prstena u položaju 9 eritromicina A zamenjena sa oksimetarskim bočnim nizom (tabela 1) kako bi se sprečila razgradnja u želudačnoj sredini [52].

Roksitromicin je hemijski stabilniji u odnosu na eritromicinom. Takođe, ima bolju aktivnost i njegova koncentracija u serumu nakon oralne primene je veća u poređenju sa eritromicinom [51].

Uspešno se primenjuje za lečenje astme, infekcija gornjeg i donjeg respiratornog trakta, upale desni, nekih polno prenosivih bolesti i kod bakterijskih infekcija povezanih sa čirom na želucu i crevima. Smatra se bezbednim i efikasnim lekom [53].

Nakon resorpcije ROX-a, on difunduje u većinu tkiva i do mesta infekcije dospeva aktivnim transportom, pri čemu samo mali deo ovog makrolida podleže metabolizmu. Najveći deo antibiotika u svom nepromenjenom obliku se izlučuje iz organizma preko žuči i izdahnutog vazduha [54].

Najčešća neželjena dejstva koja se mogu javiti prilikom primene ovog makrolida jesu gastrointestinalni poremećaji, ali se neželjena dejstva ređe javljaju nego prilikom primene eritromicina [52].

2.1.4. Analitičke metode određivanja makrolidnih antibiotika

Nepравilnom upotrebom antibiotika može doći do pojave njihovih ostataka na primer u prehrambenim proizvodima izazivajući neželjene efekte koji mogu da utiču na zdravlje potrošača, kao što su alergijske reakcije i pojava rezistencije. Zbog toga je neophodno razviti pouzdane i osetljive analitičke metode za praćenje koncentracije makrolidnih antibiotika u sirovinama, biološkim uzorcima, kao i u farmaceutskim formulacijama [55].

2.1.4.1. Određivanje makrolidnih antibiotika primenom voltametrijskih metoda

Zahvaljujući prisustvu elektroaktivne grupe(a) u molekulima prethodno opisanih makrolida, moguće je primeniti i voltametrijske tehnike za njihovo određivanje. Različiti tipovi voltametrijskih tehnika mogu se primeniti za određivanje velikog broja elektrohemijski aktivnih organskih supstanci od biološke važnosti zbog njihovog brzog odgovora, visoke osetljivosti, relativno niske cene i jednostavne pripreme uzoraka [56,57]. Različiti tipovi radnih elektroda mogu se primeniti za određivanje makrolidnih antibiotika, kao što su elektrode na bazi žive, elektrode od ugljeničnih materijala, elektrode od zlata itd., ali do sada je više ispitivano oksidativno ponašanje predstavljenih makrolida primenom različitih tipova ugljeničnih elektroda i elektrode na bazi zlata.

Wang i dr. su primenili adsorptivnu inverznu voltametriju i elektrodu na bazi staklastog ugljenika za određivanje eritromicina. Uočili su da se primenom CV javlja jedan ireverzibilni oksidacioni signal eritromicina na elektrodi od staklastog ugljenika koja je elektrohemijski tretirana u $0,025 \text{ mol L}^{-1} \text{ NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ (pH 9,0) tokom 6 minuta. Eritromicin je akumuliran na

površinu elektrode pri pH 9,0 na potencijalu 0,2 V u toku određenog vremena, a zatim je određivan primenom adsorptivne inverzne voltometrije. Drugi izvod intenziteta signala eritromicina, koji se javlja na 0,86 V, je linearna funkcija koncentracije eritromicina u opsegu $2,5 \cdot 10^{-8}$ - $3,5 \cdot 10^{-7}$ mol L⁻¹ (pri vremenu akumulacije od 90 s) i $1,2 \cdot 10^{-8}$ - $2,5 \cdot 10^{-7}$ mol L⁻¹ (pri vremenu akumulacije od 120 s), a granica detekcije je bila $5,0 \cdot 10^{-9}$ mol L⁻¹ (kada je vreme akumulacije bilo 4 min). Metoda je primenjena za određivanje eritromicina u komercijalno dostupnim tabletama eritromicina i u spajkovanim uzorcima urina. Postignuti su zadovoljavajući rezultati. Relativna standardna devijacija (RSD), n=5, je bila manja od 4,5 % [58].

Avramov Ivić i dr. su proučavali elektrohemijsku aktivnost azitromicina i klaritromicina na elektrodi od zlata u neutralnom elektrolitu primenom CV. Oksidacioni pik AZI-a javlja se na potencijalu 0,6 V. Intenzitet signala azitromicina je linearna funkcija koncentracije u opsegu 0,235-0,588 mg mL⁻¹. HPLC i FTIR spektroskopija su korišćene za analizu rastvora nakon elektrohemijske reakcije. Pokazano je da pod istim eksperimentalnim uslovima azitromicin i klaritromicin ispoljavaju različito elektrohemijsko ponašanje zbog razlike u strukturi makrolidnog prstena [59].

Avramov Ivić i dr. su primenom elektrode od zlata, kao radne elektrode, izvršili karakterizaciju klaritromicina. Za karakterizaciju ovo ciljnog analita primenili su CV i potenciostatska merenja. Utvrdili su da se u opsegu potencijala od -1,2 V do 1,0 V u 0,05 mol L⁻¹ NaHCO₃, elektroda od zlata uspešno primenjuje za karakterizaciju ovog makrolida. Uočili su prisustvo tri anodna pika na vrednostima potencijala -0,58 V; 0,10 V i 0,33 V i jedan katodni pik na -0,61 V u odnosu na ZKE. U ispitivanoj oblasti koncentracija od 0,235 mg mL⁻¹ do 0,588 mg mL⁻¹ intenziteti navedenih pikova ne pokazuju linearnu zavisnost, što znači da nisu primenljivi za analitičke svrhe [60].

Drljević-Djurić i dr. su proučavali elektrohemijsko ponašanje antibiotika roksitromicina primenom elektrode od zlata u 0,05 mol L⁻¹ NaHCO₃ koristeći CV i diferencijalno pulsnu voltometriju (DPV). Utvrđeno je primenom CV da je intenzitet oksidacionog signala roksitromicina na potencijalu 0,81 V, linearna funkcija koncentracija u opsegu 0,10006-0,654 mg mL⁻¹. Primenom DPV javlja se oksidacioni signal na potencijalu 0,75 V. Relativno dobra linearnost kalibracione krive postignuta je u opsegu koncentracija 0,10006-0,476 mg mL⁻¹.

Roksitromicin je kvantitativno određivan u tabletama i u urinu. Dobijeni rezultati su upoređeni sa rezultatima dobijenim primenom HPLC tehnike [52].

Wan i dr. su proučavali elektrohemijsko ponašanje roksitromicina na elektrodi od staklastog ugljenika modifikovanoj sa jednozidnim ugljeničnim nanocevima. Uočen je ireverzibilni anodni pik ROX-a koji se pri pH 7,0 javlja na potencijalu 0,86 V. Za određivanje roksitromicina primenjena je anodna inverzna voltometrija pri čemu je izdvajanje roksitromicina na elektrodi vršeno u toku 180 s na potencijalu -0,8 V. Pri datim uslovima određivanja, granica detekcije je bila $5,0 \cdot 10^{-7}$ mol L⁻¹, a linearnost kalibracione krive je postignuta u opsegu koncentracija od $5,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ do $1,0 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹. Modifikovana elektroda je pokazivala dobru stabilnost i ponovljivost odziva analitičkog signala, i uspešno se primenila za određivanje roksitromicina u medicinskim uzorcima (roksitromicin kapsule) [61].

Zhang i Tuo su ispitivali elektrohemijsko ponašanje eritromicin-etilsukcinata primenom linearno skenirajuće polarografske metode. U fosfatnom puferu pH 7,46 uočeno je prisustvo signala eritromicin-etilsukcinata na potencijalu -1,64 V. Linearna zavisnost između intenziteta signala eritromicin-etilsukcinata i njegove koncentracije postignuta je u koncentracionom opsegu od 10 mg L⁻¹ do 800 mg L⁻¹. Granica detekcije metode je 7,5 mg L⁻¹. Razvijena metoda je primenjena za određivanje eritromicin-etilsukcinata u tabletama [62].

2.1.4.2. Određivanje makrolidnih antibiotika primenom metoda tečne hromatografije visoke efikasnosti

HPLC tehnika spada u visoko sofisticirane tehnike i verovatno je jedna od glavnih tehnika za određivanje i praćenje koncentracija makrolidnih antibiotika. Za određivanje makrolidnih antibiotika mogu se primeniti različiti detektori ali najzastupljenija je masena spektrometrijska detekcija. Makrolidni antibiotici poseduju nisku molarnu apsorptivnost zbog izostanka odgovarajućih hromofora i zbog toga se ređe primenjuje UV detekcija, ali hemijskom derivatizacijom može se povećati osetljivost njihovog određivanja [63]. Prema Evropskoj farmakopeji 5,0 određivanje eritromicina i azitromicina zasniva se na detekciji u UV oblasti na 215 nm, dok se klaritromicin i roksitromicin određuju na 205 nm [64]. Izbor navedenih literaturnih citata je u skladu sa ciljnim analitima, iz grupe makrolidnih antibiotika, ove disertacije.

Jiang i dr. su razvili brzu metodu za određivanje klaritromicina u humanoj plazmi primenom LC-MS/MS. Kao mobilna faza prilikom hromatografskog razdvajanja CLA-a i unutrašnjeg standarda, telmisartana, korišćena je smeša mravlja kiselina : 10 mmol L⁻¹ amonijum-acetat : metanol (MeOH) u odnosu 1:99:400 (V/V/V). Linearnost date metode postignuta je u koncentracionom opsegu 10,0-5000,0 ng mL⁻¹, a granica detekcije je bila 0,5 ng mL⁻¹ [65].

Wang i dr. su opisali metodu za određivanje roksitromicina u plućnim tkivima pacova primenom LC-MS/MS. Tečno-tečna ekstrakcija je primenjena za pripremu uzorka i hromatografsko razdvajanje je sprovedeno na C18 koloni koristeći smešu metanola, vode i mravlje kiseline (80:20:1, V/V/V) kao mobilne faze, pri brzini protoka od 0,5 mL min⁻¹. Zadovoljavajuća linearnost analitičke metode je postignuta u opsegu koncentracija 0,05-20,0 µg mL⁻¹ [66].

Garcia-Mayor i dr. su određivali makrolidne antibiotike u ovčijem mleku primenom brze, jednostavne i osetljive tečne hromatografije (LC) sa detektorom na bazi niza dioda (DAD). Istovremeno su određivali sedam makrolidnih antibiotika (eritromicin, oleandomicin, roksitromicin, josamicin, spiramicin, tilosin i ivermectin) u ovčijem mleku. Relativna standardna devijacija se kretala od 1% do 6,5%. Granica detekcije je bila 72,4 µg kg⁻¹ za ivermectin, 48,3 µg kg⁻¹ za roksitromicin i 24,1 µg kg⁻¹ za ostale ispitivane makrolide [67].

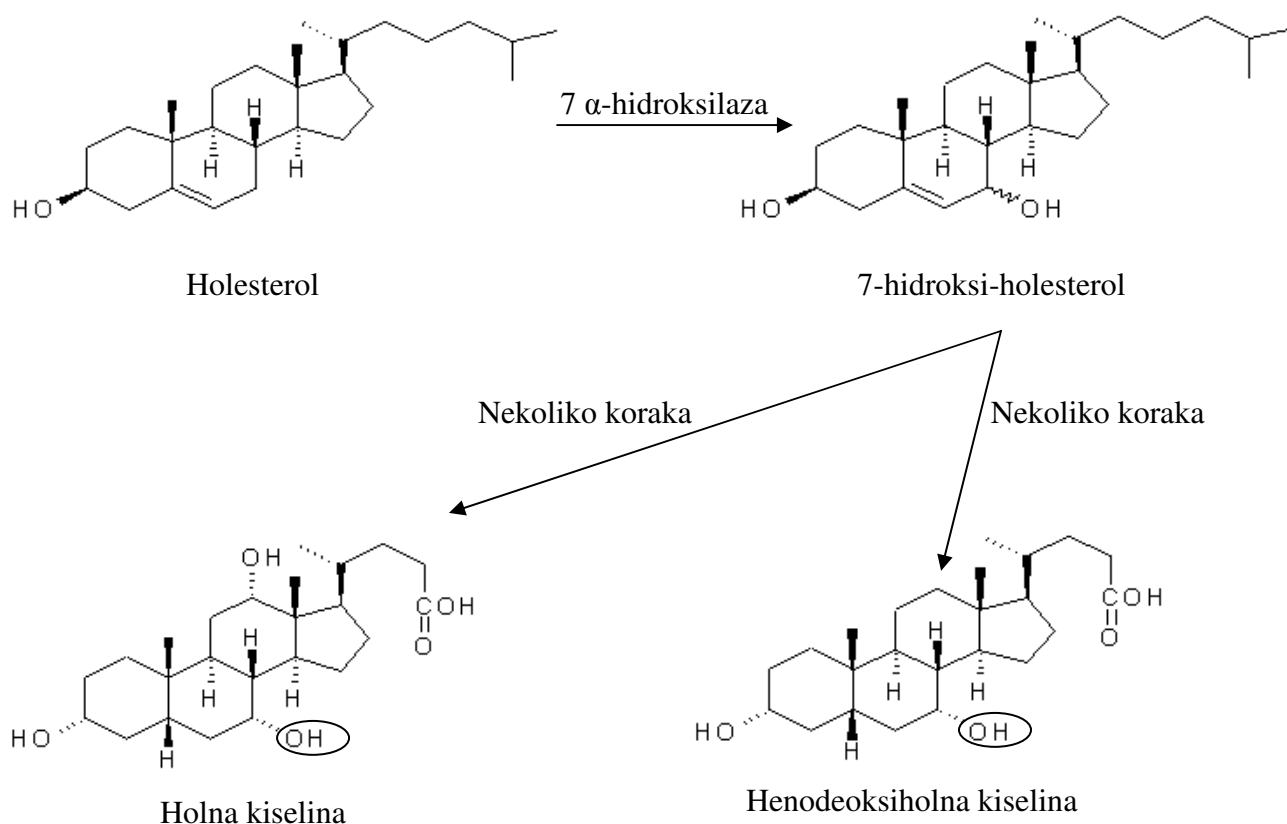
Bahrani i dr. su razvili brzu i osetljivu HPLC metodu sa fluorescentnim detektorom za određivanje AZI-a u humanom serumu. Azitromicin i interni standard (klaritromicin) su ekstrahovani iz seruma korišćenjem *n*-heksana i podvrgnuti su odgovarajućoj prekolonskoj derivatizaciji. Zadovoljavajuća linearnost kalibracione krive postignuta je u koncentracionom opsegu od 10 do 500 ng mL⁻¹ azitromicina u humanom serumu. Granica određivanja je bila 10 ng mL⁻¹ [68].

Deubel i dr. su razvili osetljivu, preciznu i tačnu metodu, zasnovanu na primeni LC-MS/MS, za merenje eritromicina A i srodnih supstanci u komercijalnim formulacijama. Primenom ove metode postignuta je visoka osetljivost (granica određivanja je 0,25 ng mL⁻¹ za eritromicin A i manja od 7,3 ng mL⁻¹ za srodne supstance), visoka preciznost (≤ 0,52%), kao i odlična linearnost ($r^2 \geq 0,991$). Vreme trajanja analize je 13 minuta [69].

2.2. Žučne kiseline

Žučne kiseline su grupa steroida koji se formiraju u jetri kao proizvod katabolizma holesterola. Pre nego što napuste jetru, žučne kiseline formiraju konjugate sa glicinom i taurinom pri čemu nastaju žučne soli. U ljudskoj žuči odnos konjugata sa glicinom naspram taurina je 3:1 [70].

Holna kiselina i henodeoksiholna kiselina predstavljaju primarne žučne kiseline i klasičan put prevođenja holesterola u primarne žučne kiseline prikazan je na slici 4 [71]. Delovanjem crevne bakterijske flore na primarne žučne kiseline dolazi do stvaranja sekundarnih žučnih kiselina pri čemu iz holne kiseline nastaje deoksiholna kiselina a iz henodeoksiholne kiseline nastaje litholna kiselina [72]. Na slici 4, zaokružene OH grupe primarnih žučnih kiselina se odstranjuju prilikom formiranja odgovarajućih sekundarnih žučnih kiselina.



Slika 4. Klasičan put prevođenja holesterola u primarne žučne kiseline, holnu i henodeoksiholnu kiselinu [71]

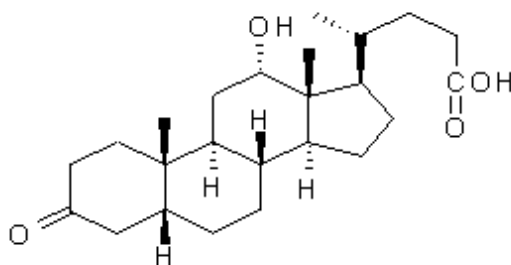
Klasičan put sinteze primarnih žučnih kiselina je odgovoran za sintezu 90-95% žučnih kiselina kod ljudi. Alternativni put sinteze žučnih kiselina jeste preko mitohondrijalne sterol 27-hidroksilaze [73].

Za žučne kiseline je odavno poznato da imaju važnu ulogu prilikom apsorpcije lipida iz tankog creva, da olakšavaju varenje, kao i da regulišu homeostazu holesterola. Međutim, danas su žučne kiseline prepoznate i kao hormoni koji su uključeni u regulaciju raznih metaboličkih procesa. Aktivacijom različitih signalnih puteva žučne kiseline regulišu, kako i svoju sopstvenu sintezu i enterohepatičnu cirkulaciju, tako i balans triglicerida, holesterola, glukoze i energetske homeostazu [72].

Ukoliko koncentracija žučnih kiselina dostigne visok nivo, one mogu da budu citotoksične po organizam. Citotoksičnost žučnih kiselina u velikoj meri zavisi od njihove hidrofobnosti, hidrofobnije žučne kiseline su citotoksičnije. Zbog toga se formiranje i eliminacija žučnih kiselina mora strogo kontrolisati, pa samim tim i pratiti njihova koncentracija u organizmu [74].

2.2.1. Okso derivati žučne kiseline

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitivano je voltametrijsko ponašanje sintetisane 3-dehidro-deoksiholne kiseline (3-DH-DHK) čija je struktura prikazana na slici 5. Ispitivani analit spada u grupu okso derivata žučnih kiselina koji su od velike važnosti u farmakološkim ispitivanjima. Ispitivana okso žučna kiselina sintetisana je na osnovu predloženog puta sinteze od strane Kou-Yi Tserng-a [75].



Slika 5. Struktura 3-dehidro-deoksiholne kiseline

Delovanjem crevne mikroflore mogu nastati između 15-20 različitih metabolita žučnih kiselina iz holne i henodeoksiholne kiseline. Poznate biotransformacije uključuju dekonjugaciju primarnih žučnih kiselina u položaju C-24 i oksidaciju α -hidroksilnih grupa u položaju C-3, C-7 i C-12, dovode do nastajanja različitih okso derivata žučnih kiselina [76] koji pripadaju sekundarnoj grupi žučnih kiselina.

Okso derivati žučnih kiselina pokazuju manji membrano - toksični efekat u poređenju sa holnom, deoksiholnom i henodeoksiholnom kiselinom. Pored toga, okso derivati žučnih kiselina promovišu farmakološko dejstvo određenih lekova [77,78].

2.2.2. Analitičke metode određivanja žučnih kiselina

Ukupna koncentracija žučnih kiselina ili pojedinačne žučne kiseline mogu da se određuju primenom testova na bazi enzima ili drugim analitičkim metodama kao što su radioimunološke metode. Takođe, gasna hromatografija se primenjuje za određivanje žučnih kiselina, međutim ona se ne može primeniti za određivanje konjugata žučnih kiselina. Razvoj visoko sofisticirane HPLC tehnike omogućio je određivanje žučnih kiselina u skoro svim vrstama bioloških tečnosti [79]. Pregledom literature uočeno je samo par radova u vezi sa voltametrijskim određivanjem žučnih kiselina. Čiste i modifikovane čvrste elektrode nisu se pokazale kao visoko selektivne, jer većina metoda se bazira na adsorpciji i zbog toga je neophodno obnavljanje površine elektrode nakon svakog merenja [80].

2.2.2.1. Određivanje žučnih kiselina primenom voltametrijskih metoda

Yilmaz i dr. su primenili kapljuću živinu elektrodu i inverznu voltametriju sa pravouganim talasima za određivanje holne kiseline. Kao optimalna pH vrednost odabrana je pH 9,0 (Briton-Robinson pufer) pri kojoj se katodni pik holne kiseline javlja na potencijalu -1352 mV. Prilikom akumulacije od 60 s na potencijalu -600 mV dobijena je kalibraciona kriva sa tri linearna opsega, prva linearna oblast je u opsegu koncentracije 0,2-0,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$, druga u koncentracionom opsegu 1,0-6,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, a treća linearna oblast postignuta je u opsegu koncentracija 10,0-70,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Granice detekcije su bile 67,0 nmol L^{-1} , 0,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ i 3,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Razvijena metoda je uspešno primenjena za određivanje holne kiseline u žučnoj kesi

goveda i ovaca i uočeno je da nema potrebe za dugotrajnim ekstrakcijama i postupcima razdvajanja [81].

Zhang i dr. su razvili indirektnu voltametrijsku metodu za određivanje žučnih kiselina u ljudskom serumu primenom štampane ugljenične elektrode. Pošto žučne kiseline nisu elektroaktivne, prevedene su u 3-ketosteroide primenom 3- α -hidroksisteroid dehidrogenaze u prisustvu nikotinamid adenin dinukleotida (NAD⁺) koji se pri tome redukovao do NADH. Na osnovu oksidacionog signala NADH izračunata je ukupna koncentracija žučnih kiselina. Kako bi se ispitala linearna oblast razvijene indirektno voltametrijske metode korišćen je rastvor holne kiseline pri čemu su različite koncentracije dodavane u serum. Primenom diferencijalno pulsne voltametrije linearnost kalibracione krive postignuta je u opsegu koncentracija holne kiseline od $5,0 \cdot 10^{-6}$ do $4,0 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹. Potom je testirana razvijena metoda tako što je određivana ukupna koncentracija žučnih kiselina u 35 uzoraka humanog seruma i dobijeni rezultati su se dobro slagali sa rezultatima dobijenim primenom enzimatske ciklične metode, koristeći upareni *t*-test [82].

2.2.2.2. Određivanje žučnih kiselina primenom metoda tečne hromatografije visoke efikasnosti

Glavni izazov prilikom analize žučnih kiselina, naročito nekonjugovanih, jeste njihova detekcija. Različiti tipovi detektora se mogu koristiti kao što su detektori na bazi UV absorpcije, indeksa prelamanja, fluorescencije itd. Elektrohemijski detektori i detektori na bazi indeksa prelamanja igraju samo marginalnu ulogu u analizi žučnih kiselina [79].

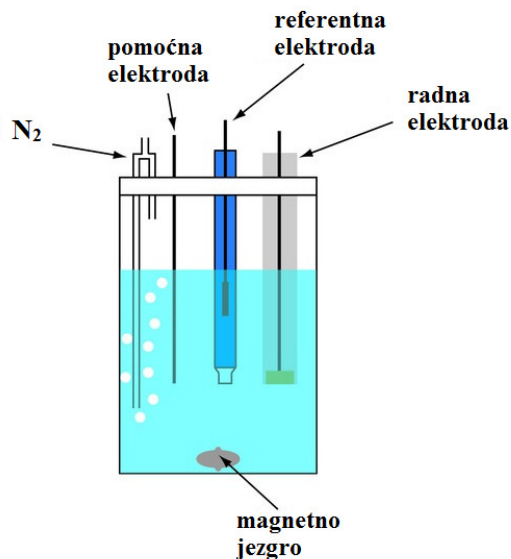
Kamada i dr. su razvili visoko osetljivu tečnu hromatografiju primenom imobilizovane 3 α -hidroksisteroid-dehidrogenaze na koloni i elektrohemijske detekcije za određivanje individualnih žučnih kiselina u serumu i žuči. Žučna kiselina u eluatu reaguje sa NAD u enzimatskoj koloni pri čemu se generiše NADH koji je praćen voltametrijskim detektorom nakon mešanja sa fenazin-metasulfatnim rastvorom. Svaka žučna kiselina je bila merljiva na nivou 20 pmol. Srednja vrednost prinosa i reproduktivnosti su bile 86,7-104,6% u toku testa i 83,8-103,4% između testova [83].

John i dr. su predstavili metodu zasnovanu na primeni HPLC-MS/MS za istovremeno određivanje 34 sterola (hidroksi steroli, primarne, sekundarne žučne kiseline, kao i konjugati žučnih kiselina sa taurinom i glicinom). Razvijena metoda poseduje jednostavan postupak ekstrakcije ispitivanih analita iz krvne plazme, urina, žučne kese, jetre, fekalija i masnog tkiva. Ukupni ekstrakcioni prinos za reprezentativne analite je bio 58-86% u plazmi, 85% u urinu, 79-92% u jetri, 76-98% u masnom tkivu, 93-104% u fekalijama, 62-79% u žučnoj kesi. Koeficijent određivanja (r^2) je veći od 0,99. Prilikom studije ishrane divljih miševa utvrđeno je da razrađena metoda može da se primeni za istovremenom određivanje derivata holesterola i žučnih kiselina u metabolički aktivnim tkivima i da se prati enterohepatična cirkulacija [84].

Minato i dr. su razvili jednostavnu, selektivnu i osetljivu metodu za određivanje 16 žučnih kiselina uključujući pet koje su karakteristične za glodare u uzorcima plazme pacova. Metoda se zasniva na primeni HPLC kuplovana sa masenim spektrometrijskim detektorom na bazi vremena preletanja jona. Linearnost kalibracione krive postignuta je za sve ispitivane žučne kiseline u opsegu koncentracije od 10-25 ng mL⁻¹ do 1000-10,000 ng mL⁻¹. Razvijena metoda primenjena je za određivanje žučnih kiselina u više od 300 uzoraka plazme pacova sa oštećenjem jetre prouzrokovane primenom α -naftilzocijanatom, ugljen-tetrahloridom i flutamidom. Na osnovu rezultata može se zaključiti da je razvijena metoda primenljiva za određivanje žučnih kiselina u plazmi pacova i za strukturne analize metabolita u ranoj fazi razvoja leka [85].

2.3. Voltametrijske tehnike

Voltametrijske tehnike spadaju u grupu elektroanalitičkih tehnika i zasnivaju se na merenju intenziteta struje u funkciji potencijala u zadatim granicama. Voltametrijske tehnike potekle su iz polarografije koja se zasniva na primeni kapljuće živine elektrode, kao radne elektrode, a razvio ju je češki hemičar Hejrovski 20-tih godina prošlog veka. Ove tehnike koriste se za proučavanje procesa oksidacije i redukcije, procesa adsorpcije kao, i mehanizma prenosa elektrona. Voltametrijska ćelija sadrži troelektrodni sistem koji se sastoji od pomoćne elektrode, referentne elektrode (elektroda sa stalnim hemijskim sastavom i konstantnim potencijalom) i radne elektrode (elektroda na kojoj se odigrava elektrodna) i sistema za uvođenje gasa (najčešće azota) radi postizanja inertne atmosfere (slika 6) u slučajevima kada je to potrebno [86].



Slika 6. Elektrohemijska ćelija za voltametriju [87]

Napon tj. razlika potencijala se meri između radne i referentne elektrode dok skoro sva struja protiče između radne i pomoćne elektrode [86].

Kvalitativna i kvantitativna analiza primenom voltametrijske tehnike vrši se na osnovu snimljene krive struja-potencijala odnosno voltamograma. Potencijal pika predstavlja analitički parametar koji omogućava kvalitativnu analizu, dok se na osnovu intenziteta signala dobijenog pika koji je proporcionalan koncentraciji ciljnog analita, može izvršiti kvantitativna analiza [88].

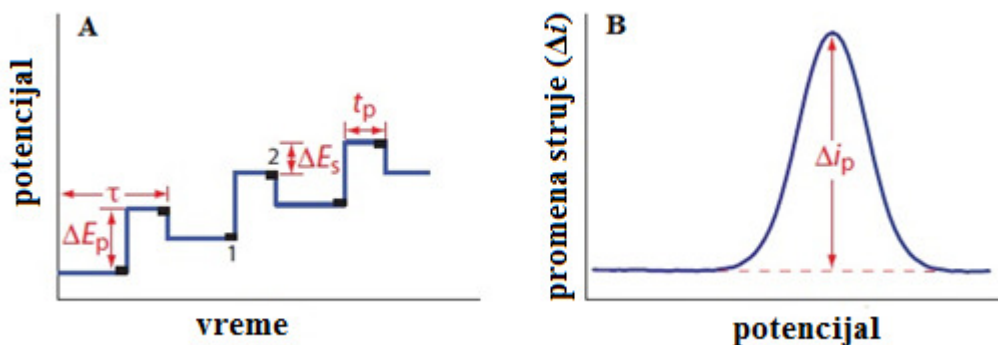
Kontrolisano promenljivi potencijal koji izaziva odgovarajući strujni odziv, na kojem se zasniva voltametrija, naziva se pobudni ili ekscitacioni signal. Klasičan pobudni signal u voltametriji je linearan i on se primenjuje kod polarografije i hidrodinamičke voltametrije. Međutim, pored linearne promene potencijala sa vremenom, postoje i impulsni pobudni signali, koji se primenjuju kod pulsnih voltametrijskih tehnika, i u ovom slučaju struja se meri u različitim vremenskim intervalima tokom trajanja tih impulsa, a primenom ovakvih ekscitacionih signala postiže se visoka osetljivost metoda [86].

2.3.1. Pulsne voltametrijske tehnike

Kao što je već napomenuto, primenom pulsne tehnike ima se za cilj da se snizi granica detekcije voltametrijskih merenja. Povećanjem odnosa između faradejske i nefaradejske struje, ove tehnike omogućavaju određivanje koncentracije ispod 10^{-8} mol L⁻¹. Od pulsne voltametrijske tehnike poznate su: normalna pulsna voltametrija, diferencijalna pulsna voltametrija, voltametrija sa pravougaonim talasima (square wave voltammetry, SWV), stepenasta voltametrija i voltametrija sa naizmeničnom strujom. Princip svih voltametrijskih pulsne tehnike jeste da se primenjuje sekvenca potencijalskih koraka na radnu elektrodu u definisanom trajanju i nakon primene pulsa kondenzatorska struja opada znatno brže u odnosu na faradejsku struju. Razlika između pulsne tehnike je u obliku ekscitacionog talasa i načina uzorkovanja struje [57].

2.3.1.1. Diferencijalno pulsna voltametrija

Kod diferencijalno pulsne voltametrije pobudni signal dobija se dodavanjem periodičnog pulsa na linearno rastući potencijal (slika 7A). Struja se meri/uzorkuje dva puta, neposredno pre primene pulsa (slika 7A, 1) i kasnije u toku pulsa, nakon ~40 ms (slika 7A, 2). Od intenziteta struje merene u toku pulsa oduzima se intenzitet struje merene na samom početku i ta razlika u intenzitetu struje ($\Delta i = i(t_2) - i(t_1)$) se grafički prikazuje u odnosu na primenjeni potencijal (slika 7B) [57,86].



Slika 7. Oblik ekscitacionog talasa za DPV (A) i izgled voltamograma (B). Vreme trajanja jednog ciklusa, τ ; vreme trajanja pulsa, t_p ; potencijal pulsa, ΔE_p ; promena potencijala po ciklusu, ΔE_s ; vreme merenja/uzorkovanja struje, 1 i 2; razlika intenziteta struje, Δi_p [87]

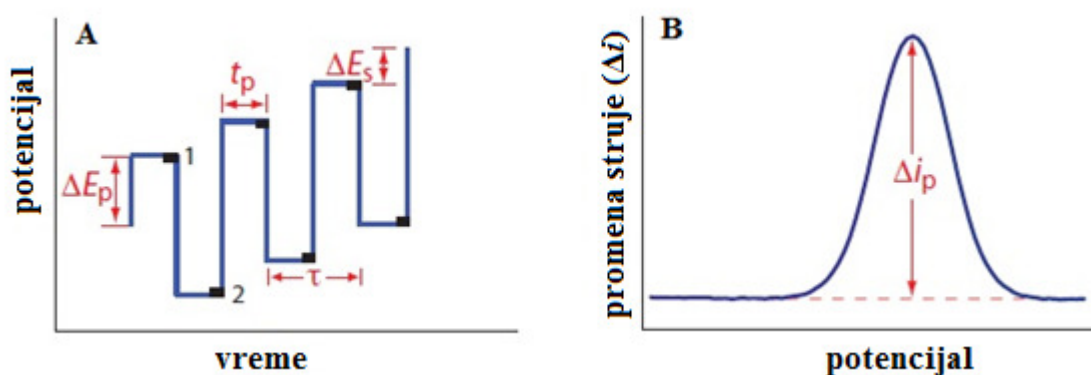
Primenom diferencijalno pulsne voltametrije postiže se bolje razdvajanje pikova supstanci sa sličnim redoks potencijalom, tako da pikovi koji su međusobno razdvojeni za oko 50 mV mogu da se analiziraju [57].

Izbor vrednosti za amplitudu pulsa i brzinu polarizacije zahteva kompromis između osetljivosti, rezolucije i brzine. Na primer, ukoliko se primeni velika amplituda pulsa dobijeni pikovi su veliki i široki. Optimalne vrednosti za diferencijalno pulsnu voltametriju su 25-50 mV za amplitudu pulsa i 5 mV s^{-1} za brzinu polarizacije [57].

Diferencijalno pulsna voltametrija se pokazala kao veoma korisna tehnika za određivanje tragova kako organskih tako i neorganskih jedinjenja [57,86].

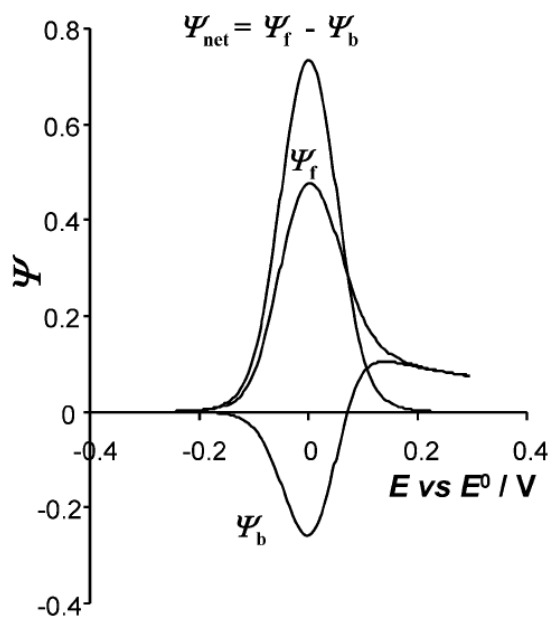
2.3.1.2. Voltametrija sa pravougaonim talasima

Voltametriju sa pravougaonim talasima karakteriše visoka osetljivost i velika brzina, pri čemu ceo voltamogram može se dobiti u nekoliko sekundi. Kod SWV tehnike pobudni signal se dobija kada se niz pulseva doda na stepeničasti signal, a struja se meri/uzorkuje dva puta u toku svakog ciklusa pravougaonog talasa, jednom na kraju direktnog pulsa (1) i jednom na kraju reverznog pulsa (2) što je prikazano na slici 8A i razlika u intenzitetu struje se grafički predstavlja u odnosu na potencijal osnove stepenica kako bi se dobio odgovarajući voltamogram (slika 8B) [57].



Slika 8. Oblik ekscitacionog talasa za SWV (A) i izgled voltamograma (B). Vreme trajanja jednog ciklusa, τ ; vreme trajanja pulsa, t_p ; potencijal pulsa, ΔE_p ; promena potencijala po ciklusu, ΔE_s ; vreme merenja/uzorkovanja struje, 1 i 2; razlika intenziteta struje, Δi_p [87]

S obzirom da je modulacija amplitude pravougaonog talasa velika, reverzni puls izaziva reverznu reakciju produkta nastalog primenom direktnog pulsa. Poređenjem voltametrije sa pravougaonim talasima i diferencijalno pulsne voltametrije, primenom SWV tehnike kod reverzibilnih procesa dobijaju se intenziteti signala oko 4 puta veći u odnosu na primenu diferencijalno pulsne voltametrije jer se kod DPV tehnike ne uzima u obzir intenzitet struje reversnog pulsa [57]. Ukupna struja kod SWV, kao što je već napomenuto, predstavlja razliku intenziteta struje uzorkovane na kraju direktnog pulsa i intenziteta struje uzorkovane na kraju reverznog pulsa, što je grafički predstavljeno na slici 9.



Slika 9. SW voltamogram za reverzibilni prenos elektrona. Intenzitet struje uzorkovane na kraju direktnog pulsa, ψ_f ; intenzitet struje uzorkovane na kraju reverznog pulsa, ψ_b ; ukupna struja, ψ_{net} ; potencijal, E ; standardni redoks potencijal, E^0 [89]

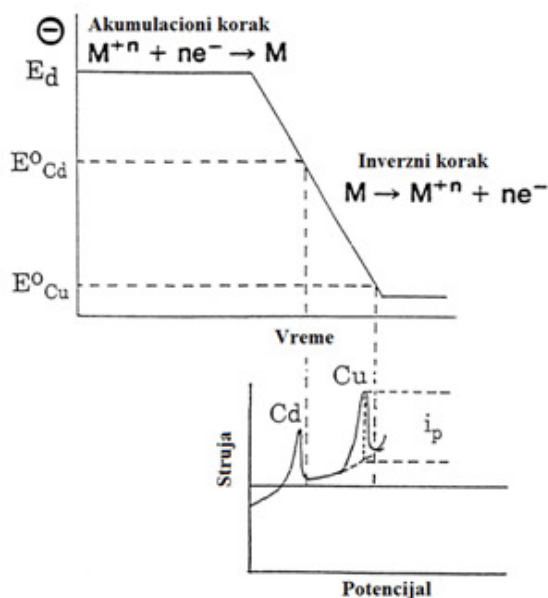
Voltametrija sa pravougaonim talasima, kao jedna od najnaprednijih voltametrijskih tehnika, često se koristi za određivanje različitih organskih jedinjenja kao što su lekovi, biološki aktivne supstance, pesticidi itd. i neorganskih jedinjenja, a takođe se može primeniti i kao detektor za HPLC merenja [57,86,89]. SWV tehnika se može i vrlo se često kombinuje sa inverznom voltametrijom (katodnom, anodnom ili adsorptivnom inverznom voltametrijom) koja omogućava prekoncentraciju ciljnog analita, pri čemu se dodatno povećava osetljivost tehnike i omogućava određivanje analita na nivou pikomolarnih koncentracija [89].

2.3.2. Inverzna (striping) voltametrija

Inverzna voltametrija omogućava analizu tragova ciljnih analita. Tehnika se zasniva na elektrolitičkom koncentrovanju određivane supstance pri kontrolisanom potencijalu u toku određenog vremena na površini radne elektrode, a zatim na rastvaranju koncentrovane supstance obrnutim elektrolitičkim procesom. U zavisnosti koji se elektrolitički proces primenjuje za koncentrovanje odnosno rastvaranje (određivanje) ispitivane supstance razlikuju se anodna, katodna i adsorptivna stripping voltametrija [57].

Anodna inverzna voltametrija

Anodna inverzna (striping) voltametrija (ASV) najčešće se primenjuje za određivanje tragova metala. Kod ASV tehnike metal se na površini radne elektrode prekoncentruje elektrohemijskom redukcijom u toku određenog vremenskog perioda uz mešanje nakon čega se vrši rastvaranje odnosno određivanje ispitivanog metala procesom elektrohemijske oksidacije u mirnom rastvoru (slika 10) [57,86].



Slika 10. Anodna inverzna voltametrija. Oblik talasa potencijal-vreme i rezultujući voltamogram. Metalni jon, M^{+n} ; broj razmenjenih elektrona, n ; standardni redoks potencijal bakra (Cu), E^0_{Cu} ; standardni redoks potencijal kadmijuma (Cd), E^0_{Cd} ; potencijal depozicije, E_d ; intenzitet maksimuma pika, i_p [57]

Smetnje koje mogu da utiču na smanjenje osetljivosti ASV metode jesu prisustvo organskih površinski aktivnih supstanci koje se adsorbuju na površinu elektrode i time sprečavaju elektrodpoziciju ciljnog analita, kao i građenje intermetalnih jedinjenja (npr. Cu-Zn) što dovodi do promene u veličini i poziciji dobijenog pika [57].

Katodna inverzna voltometrija

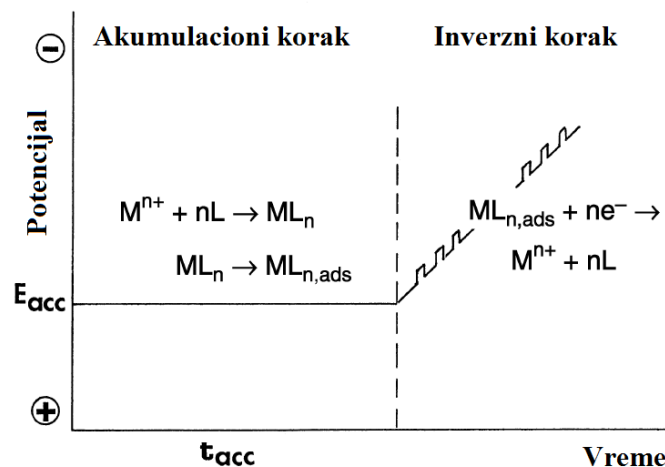
Za katodnu inverznu (striping) voltometriju (KSV) bi se moglo reći da predstavlja sliku u ogledalu anodne striping voltetrije. Elektrodpozicija ciljnog analita se vrši procesom elektrohemijske oksidacije (anodna depozicija) dok se određivanje ciljnog analita zasniva na elektrohemijskoj redukciji, odnosno voltamogrami se snimaju u smeru negativnijih potencijala [57].

Katodna striping voltetrija se primenjuje za određivanje velikog broja organskih i neorganskih jedinjenja koji grade nerastvorljive soli sa metalom od kojeg je sačinjena radna elektroda (npr. Hg). Halogenidi koji grade nerastvorljive soli sa srebrom mogu da se određuju primenom srebrne elektrode, itd. [57].

Adsorptivna inverzna voltetrija

Adsorptivna inverzna voltetrija može da se primeni kako za određivanje tragova metala tako i za određivanje tragova organskih jedinjenja.

U slučaju primene ove voltetrijske tehnike za određivanje metala, adsorptivna inverzna voltetrija se sastoji od formiranja kompleksa metala, adsorptivne akumulacije i redukcije površinski aktivnog kompleksa metala, što je i prikazano na slici 11. Formirani kompleksi trebalo bi da budu površinski aktivni i elektroaktivni. Primenom optimalnih uslova za određivanje odabranih metala moguće je postići veoma niske granice detekcije od 10^{-10} do 10^{-11} mol L⁻¹. U kombinaciji adsorptivne akumulacije sa katalitičkom reakcijom može se postići i granica detekcije reda 10^{-12} mol L⁻¹. Odabirom selektivnog kompleksirajućeg agenta može da se poveća i ukupna selektivnost metode [57].



Slika 11. Akumulacioni i inverzni korak metalnog jona u prisustvu odgovarajućeg helata primenom adsorptivne inverzne voltametrije. Metalni jon, M^{n+} ; helat, L ; broj helata i broj razmenjenih elektrona, n ; potencijal akumulacije, E_{acc} ; vreme akumulacije, t_{acc} [57]

Adsorptivna stripping voltometrija se pokazala veoma pogodnom za određivanje i različitih organskih molekula kao što su na primer pesticidi, vitamini, nukleinske kiseline i neki kardio ili antitumorni lekovi koji poseduju osobinu da su površinski aktivni. U zavisnosti od redoks aktivnosti ispitivanih adsorbovanih organskih molekula, oni se određuju ili procesom oksidacije ili procesom redukcije. Elektroinaktivni makromolekuli takođe mogu biti određivani na osnovu rezultata njihovog adsorptivnog-desorptivnog mehanizma [57].

2.3.3. Radne elektrode

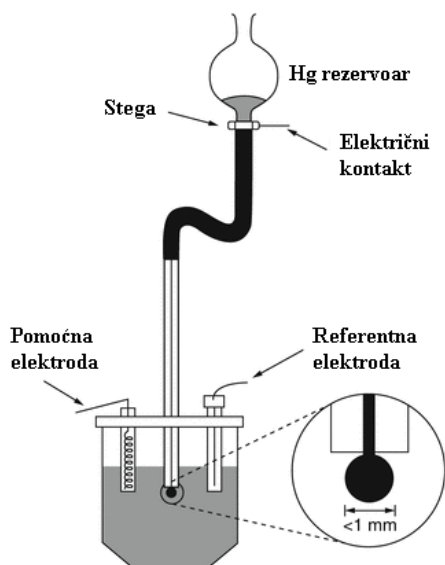
Izbor radne elektrode u velikoj meri zavisi od primenljivosti elektrode u ispitivanoj oblasti potencijala, kao i od čistoće i kvaliteta elektrodnog materijala [90].

Od voltametrijskih senzora u eksperimentalnom delu disertacije primenjene su obnovljiva srebro-amalgam film elektroda (Hg(Ag)FE), elektroda od staklastog ugljenika površinski modifikovana bizmut-filmom (BiF-GCE) i nemodifikovana CPE kao i koloidnim zlatom površinski modifikovana CPE (Au-CPE).

2.3.3.1. Obnovljiva srebro-amalgam film elektroda i njena primena

Živa predstavlja jedan od najboljih elektrodnih materijala, zbog visoke osetljivosti, reproduktivnosti i primenljivosti u širokoj negativnoj oblasti potencijala. Od živih elektroda najveću upotrebu ima kapljuća živina elektroda (slika 12), a potom i živa-film elektrode [91].

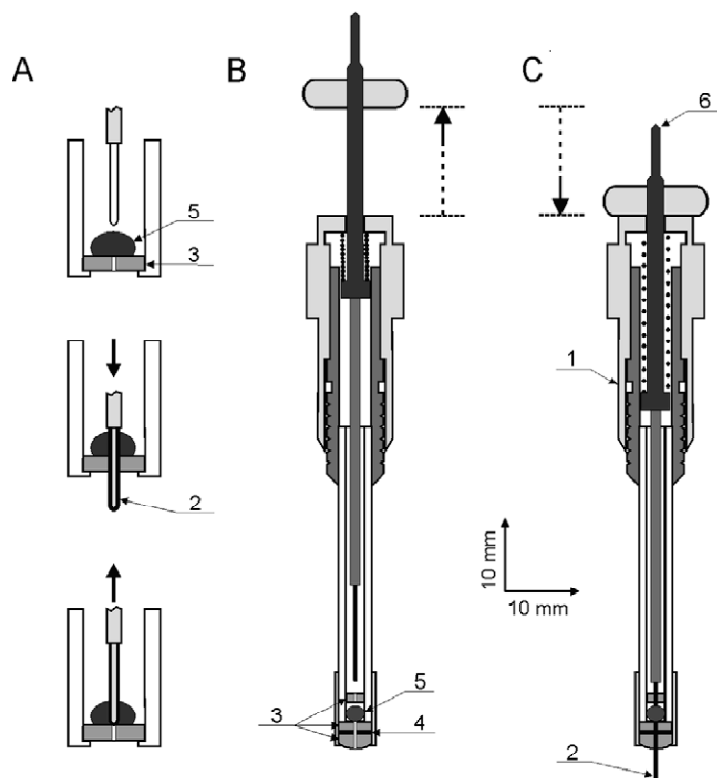
KŽE su bile najčešće primenjivane radne elektrode u voltametriji zbog niza svojih prednosti. Dobra strana KŽE je što se stalno stvara nova metalna površina (nova kap žive) čime se postiže nova, obnovljena senzorska površina, što ističe ovu elektrodu u odnosu na čvrste metalne elektrode kod kojih je glavni problem adsorpcija ili taloženje nečistoća. Među drugim dobrim osobinama KŽE jesu širok potencijalski prozor u negativnoj oblasti rada, afinitet elektrodne površine prema apolarnijim molekulima zbog osnovne prirode žive, kao i mogućnost izgradnje amalgama sa većim brojem metala. Nedostaci KŽE jesu što ne može da se primeni u anodnoj oblasti potencijala zbog oksidacije žive. Na potencijalim većim od 0,4 V dolazi do stvaranja Hg(I). Takođe, nefaradejska osnovna struja ograničava osetljivost na koncentracioni nivo od oko 10^{-5} mol L⁻¹. Od mehaničkih nedostataka KŽE mogu se istaći nezgrapnost elektrode i mogućnost začepjenja [86].



Slika 12. Kapljuča živina elektroda i troelektrodna elektrohemijska ćelija [92]

Međutim toksičnost žive, glavni nedostatak živinih elektroda, dovela je do tendencije da se ove elektrode zamene sa nekim drugim netoksičnim ili manje toksičnim elektrodnim materijalima [91]. Kao dobra alternativa živinim elektrodama pokazale su se Hg(Ag)FE i BiF-GCE [93].

Princip rada i prvi predlog konstrukcije Hg(Ag)FE dat je od strane profesora Baša i Kovalskog [94]. Konstrukcija elektrode prikazana je na slici 13. Slika 13A prikazuje princip obnavljanja površine elektrode, dok su na slici 13B i C prikazane konfiguracije elektrode pre merenja i elektrode spremne za merenje.



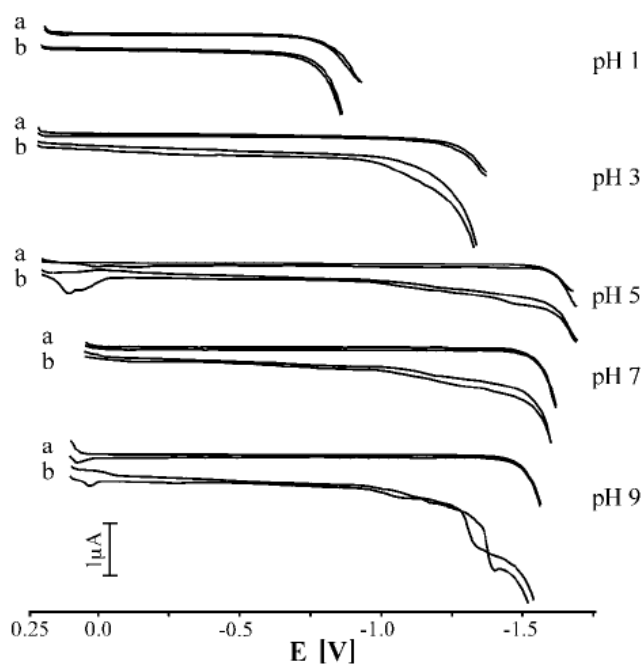
Slika 13. Princip mehaničkog obnavljanja površine Hg(Ag)FE (A), konfiguracija elektrode pre merenja (B) i konfiguracija elektrode spremne za merenja (C). Mikrometrski zavrtnj, 1; srebrena žica, 2; O-prsten, 3; srebrni film, 4; rastvor srebro-amalgama, 5; električni kontakt, 6 [95]

Sama konstrukcija elektrode se sastoji od mikrometrskog zavrtnja (1) koji omogućava precizno podešavanje senzorske površine, srebrenog žice (2) koja je u dodiru sa ispitivanim rastvorom, O-prstena (3) koji služi da ukloni moguće mehaničke nečistoće i da ukloni višak amalgama i koji je razdvojen srebrnim filmom debljine 0,05 mm (4), komore sa rastvorom srebro-amalgama, kojeg ima približno 10,0 μL (5) i električnog kontakta (6) [96]. Ova jednostavna konstrukcija Hg(Ag)FE omogućava obnavljanje površine elektrode pre svakog merenja, a ona se odvija u dva koraka: povlačenje srebrenog žice kroz komoru u kojoj se nalazi srebro-amalgam, a zatim vraćanje nazad srebrenog žice van tela elektrode, takođe kroz komoru, kako je to prikazano na slici 13A. Prilikom ovakvog obnavljanja površine Hg(Ag)FE srebrena žica dolazi dva puta u kontakt sa rastvorom srebro amalgama. U odnosu na čistu živu, amalgam omogućava da elektroda funkcioniše na stabilan način za veliki broj ciklusa regeneracije (barem

2000, vreme regeneracije manje od 1 s) i da ostane upotrebljiva u dužem vremenskom periodu i do nekoliko meseci [95,96].

Kao glavni nedostaci konstrukcije opisane elektrode ističu se njena krtoš i mogućnost prodiranja ispitivanog rastvora u unutrašnjost elektrode [97].

Hg(Ag)FE ima veoma slične osobine sa živinim elektrodama. Od sličnosti mogu se istaći primenljivost u dalekoj negativnoj oblasti potencijala i mogućnost stalnog obnavljanja senzorske površine, zahvaljujući njenoj konstrukciji. Na slici 14 prikazane su sličnosti u elektrohemijском ponašanju KŽE i Hg(Ag)FE u osnovnom elektrolitu različite pH vrednosti.



Slika 14. Poređenje strujno-potencijalnih krivi za a) KŽE i b) Hg(Ag)FE u KNO_3+HNO_3 ili KNO_3+KOH sredini. Brzina skeniranja je $0,025 V s^{-1}$. Geometrijska površina elektrode je bila $0,056 cm^2$ [94]

Odabrani primeri primene obnovljive srebro-amalgam film elektrode

Primena Hg(Ag)FE se pokazala kao veoma uspešna za određivanje kako tragova metala, kao što su cink [98,99], bakar [98], kobalt, nikal [100], olovo, kadmijum [99] itd., tako i za određivanje različitih organskih jedinjenja koja u sebi sadrže elektroaktivne grupe. Od organskih

jedinjenja primenom Hg(Ag)FE određivani su pesticidi kao što su neonikotinoidni insekticidi [93,101,102] i fungicid blastocidin S [103], potom medikamenti kao što je moroksidin [104], kao i vitamini [105] i dr.

Guzsvány i dr. su razvili brzu i osetljivu voltametrijsku metodu za karakterizaciju i određivanje insekticida imidakloprida primenom SWV i Hg(Ag)FE kao radne elektrode u Briton-Robinson puferu kao pomoćnom elektrolitu. Uočena su dva redukciona pika imidakloprida, oba u prilično negativnoj oblasti potencijala od -0,8 V do -1,5 V. Analitička merenja, na osnovu prvog pika, izvedena su pri pH 7,0 u koncentracionom opsegu 0,91-47,48 $\mu\text{g mL}^{-1}$. RSD je bila manja od 1,0%, a vrednosti granice detekcije i granice određivanja (GO) su bile 0,27 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i 0,91 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Primenljivost ove metode je testirana praćenjem koncentracije imidakloprida tokom solarne fotolitičke i fotokatalitičke degradacije u prisustvu dva heterogena katalizatora: TiO_2 i modifikovanog TiO_2 sa 1,9% Fe (1,9% Fe/ TiO_2). Rezultati dobijeni primenom SWV i Hg(Ag)FE su u dobroj saglasnosti sa rezultatima dobijenim komparativnom HPLC-DAD metodom što potvrđuje da razvijena voltametrijska metoda može da se koristi za praćenje razgradnje imidakloprida [93].

Smarzewska i dr. su proučavali elektrohemijske osobine dinotefurana, u opsegu pH 2,0-8,0, primenom SWV i Hg(Ag)FE. Analiziran je mehanizam njegove elektroredukcije. Ispitana je zavisnost intenziteta signala dinotefurana od pH, koncentracije pufera, prirode pufera, amplitude, frekvencije, potencijalskog koraka i brzine polarizacije. Pri optimalnim uslovima metode granica detekcije je bila $2,01 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, a granica određivanja je bila $6,71 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ [106].

Baś je razvio metodu koja se zasniva na primeni Hg(Ag)FE za određivanje tragova Cr(VI) pomoću katalitičke adsorptivne inverzne voltametrije. Za površinu elektrode od 4 mm^2 linearni opseg pri vremenu depozicije od 20 s je bio od 0,5 nmol L^{-1} do 50 nmol L^{-1} , a granica detekcije iznosila je 0,19 nmol L^{-1} . RSD prilikom određivanja Cr(VI) je bila manja od 5% [107].

Guziejewski i dr. su primenili SWV i adsorptivnu inverznu (stripping) voltametriju sa pravougaonim talasima (square wave adsorptive stripping voltammetry, SW-AdSV) kao i Hg(Ag)FE za određivanje aklonifena u obogaćenim uzorcima vode. Uočen je redukcioni signal na potencijalu -0,65 V u odnosu na srebro/srebro-hloridnu elektrodu (Ag/AgCl) elektrodu u odabranom puferu (boraks pufer pH 9,2). Ispitivan je uticaj SW frekvencije, SW amplitude,

potencijalskog koraka, kao i parametara akumulacije (vreme i potencijal). Linearnost kalibracione krive primenom SWV postignuta je u koncentracionom opsegu aklonifena od $1,0 \cdot 10^{-7}$ do $1,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ i primenom SW-AdSV od $1,0 \cdot 10^{-8}$ do $1,0 \cdot 10^{-7}$ mol L⁻¹. Granice detekcije i određivanja primenom SWV metode iznosile su $3,1 \cdot 10^{-8}$ mol L⁻¹ i $1,0 \cdot 10^{-7}$ mol L⁻¹, a primenom SW-AdSV metode $2,9 \cdot 10^{-9}$ mol L⁻¹ i $9,6 \cdot 10^{-9}$ mol L⁻¹. Metoda je uspešno primenjena za određivanje aklonifena u obogaćenim uzorcima vode [108].

Brycht i dr. su razvili novu, jednostavnu i visoko osetljivu voltametrijsku metodu za određivanje niskih koncentracija novijeg fungicida, fenoksanila (Fen). Primeno su SWV i SW-AdSV metode i Hg(Ag)FE kao radnu elektrodu. Elektrohemijska redukcija Fen na Hg(Ag)FE u Briton-Robinson puferu pH 6,8 po prvi put je proučavana. Radi odabira optimalnih eksperimentalnih uslova ispitivan je uticaj pomoćnog elektrolita, pH vrednosti, potencijala i vremena kondicioniranja elektrode, frekvencije, amplitude, potencijalskog koraka, kao i potencijala i vremena akumulacije. Razvijene metode omogućavaju određivanje Fen-a u koncentracionom opsegu od $5 \cdot 10^{-7}$ do $4 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ primenom SWV i od $1 \cdot 10^{-10}$ do $9 \cdot 10^{-10}$ mol L⁻¹ primenom SW-AdSV. Metoda je uspešno primenjena za određivanje Fen-a u obogaćenom uzorku Warta rečne vode i u obogaćenom uzorku pirinča primenom metode standardnog dodatka [109].

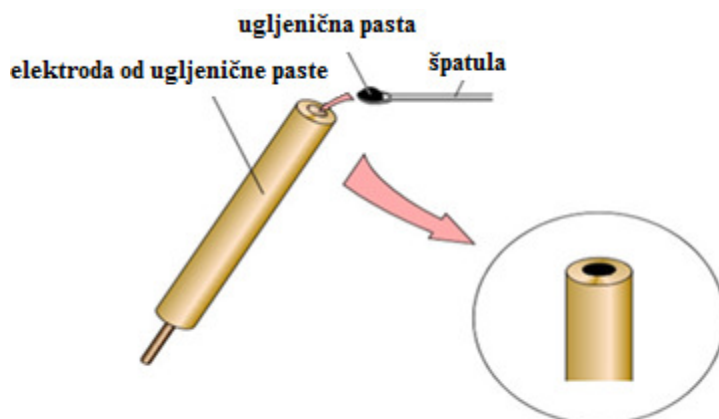
Na osnovu odabranih primera primene obnovljive srebro-amalgam film elektrode može se zaključiti da je Hg(Ag)FE, kao radna elektroda, pogodna za određivanje velikog broja organskih molekula zasnovano na njihovoj redukciji, kao i za određivanje tragova metala. Takođe, ova elektroda je pogodna za razvoj adsorptivnih metoda čime se povećava osetljivost određivanja ciljnih analita.

2.3.3.2. Elektroda od ugljenične paste i njena primena

Ideja o ugljeničnoj pasti nastala je krajem 1950-tih godina od strane profesora Adamsa sa Kanzaškog Univerziteta u Sjedinjenim Američkim Državama. Prvobitna zamisao Adamsa bila je da konstruiše kapljuću ugljeničnu elektrodu, nalik kapljućoj živinoj elektrodi, kako bi se eliminisao nedostatak čvrstih elektroda kao što je kontaminacija elektrodne površine. Kapljuća ugljenična elektroda bi za razliku od kapljuće živine elektrode bila primenljiva u pozitivnijoj oblasti potencijala i ne bi bila toksična. Međutim ova ideja nije urodila plodom zbog tehničkih

nedostataka zamišljene elektrode, jer je pri protoku ugljenične paste kroz kapilaru došlo do razdvajanja ugljeničnih čestica od vezivne komponente, pri čemu je dolazilo do prekida električnog signala [110]. Ipak, kao rezultat ovih eksperimenata nastala je ugljenična pasta, koja danas predstavlja jedan od važnijih elektrodnih materijala.

CPE predstavljaju homogenu ugljeničnu pastu, smešu ugljeničnog (najčešće grafitnog) praha i odgovarajuće vezivne tečnosti, s kojom je napunjeno telo elektrode (slika 15) [111,112]. Homogena ugljenična pasta dobija se ručnim mešanjem ugljeničnog praha i odabrane vezivne supstance u avanu. Preporučljivo je da se homogenizacija odvija u dva ili tri uzastopna koraka. Nakon 2-3 minuta intenzivne homogenizacije, pasta se skida sa zidova avana pomoću špatule i potom se nastavlja sa intenzivnim mešanjem [110].



Slika 15. Elektroda od ugljenične paste [113]

Obe komponente ugljenične paste, kao i njihov međusobni odnos, određuju fizičko-hemijske i elektrohemijske osobine elektrode [112].

CP elektrode se danas široko primenjuju zbog njihovih dobrih elektrohemijskih osobina kao što su niska pozadinska struja i dobra električna provodljivost. Primenljive su u širokoj, uglavnom pozitivnoj oblasti potencijala, relativno su jeftine i jednostavno se pripremaju, uglavnom su netoksične, a možda jedna od najvažnijih osobina CPE jeste njihova relativno laka, brza i jednostavna modifikacija [110,112].

Hidrofobnost ugljениčne paste ima veliki uticaj na elektrohemijsko ponašanje CPE jer hidrofobnost paste dovodi do odbijanja hidrofilnih jona i molekula na površini elektrode, kao i do specifičnih interakcija između modifikatora i ugljениčne paste. Hidrofobni molekuli vezivnih tečnosti formiraju hidrofobna mesta pri čemu dolazi do odbijanja hidrofilnih vrsta od granične površine elektroda/rastvor zbog čega se usporava elektrodni proces odnosno usporava se prenos elektrona tokom redoks reakcije. Hidrofobni karakter ugljениčne paste može biti smanjen različitim hemijskim i elektrolitičkim postupcima tretiranja ugljениčne paste i samim tim se elektrohemijski procesi mogu ubrzati [110,114].

CPE su stabilne tokom nekoliko meseci, a upotrebnii vek zavisi od kvaliteta vezivne tečnosti i od količinskog odnosa ugljениčnog praha i vezivne supstance [114].

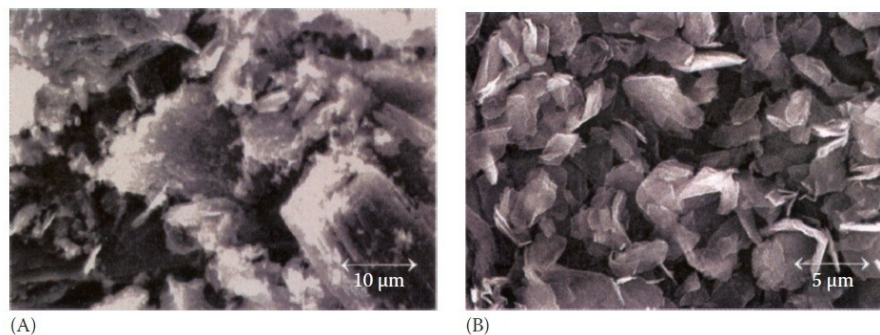
Komponente ugljениčne paste

Ugljениčni prah predstavlja elektroprovodnu komponentu CPE. Pri izboru pogodnog ugljениčnog materijala treba imati u vidu sledeće kriterijume:

- mikrometerska veličina čestica
- uniformna raspodela čestica
- visoka hemijska čistoća i
- niska adsorpciona sposobnost.

Od samog početka primene CPE pa do danas najčešće korišćen ugljениčni materijal je spektroskopski grafit sa veličinom čestica od 5 do 20 μm . Procenjuje se da je 80-90% ugljениčne paste napravljeno od ovog tipa grafita [111].

Mikrostruktura ugljениčnog praha koji se koristi za pripremu ugljениčne paste je od velikog značaja. Spektroskopski grafit ne pokazuje nikakvu karakterističnu strukturu ili šaru i njegova tipična morfologija može se približno opisati kao splet geometrijski nepravilnih objekata sa oštrim ivicama (slika 16) [110].



Slika 16. SEM snimci mikrostrukture dva tipična spektroskopska grafitna praha "RW-B" (A) i "CR-5" (B) [110]

Ugljična pasta može biti pripravljena i od drugih ugljičnih materijala kao što su čađ i ugalj, crni acetilen (poliacetilen, odnosno melanin), prah staklastog ugljenika, prah dijamanta (koji se dobija od prirodnog i sintetskog dijamanta), porozne ugljične pene itd. [110-112].

Zahvaljujući intenzivnoj popularizaciji novijih oblika ugljenika, ugljična pasta može da se pripremi i od fulerena (C_{60}), ugljičnih nanovlakana, grafena ili različitih vrsta ugljičnih nanocevi [110-112].

Vezivno sredstvo jeste organska tečnost koja mehanički povezuje pojedinačne čestice ugljičnog praha i ona određuje svojstva ugljične paste. Vezivna komponenta koja se koristi za pripremu ugljične paste treba da ima sledeće karakteristike:

- hemijsku inertnost i elektrohemijsku neaktivnost
- visoku viskoznost i nisku volatilnost
- minimalnu rastvorljivost u vodenim rastvorima i
- nemešljivost sa organskim rastvaračima.

Najčešće primenjivane vezivne supstance jesu mineralna ulja odnosno parafinsko ulje. Međutim, pored parafinskog ulja mogu se koristiti još i alifatični i aromatični ugljovodonici, uključujući njihove halogene derivate, silikonska ulja i masti, trikrezil fosfat, organski estri organofosfata i dialkil-ftalata, a u novije vreme i jonske tečnosti [111].

Modifikacija elektrode od ugljenične paste

Cilj modifikacije elektrode jeste da se poboljša prenos mase ili transport elektrona na elektrodnoj površini. Na osnovu načina modifikacije elektrode ona može biti površinska ili zapreminska modifikacija [110].

Površinska modifikacija podrazumeva da se modifikator nalazi samo na površini elektrode i može biti prisutan u tankom sloju, u filmovima ili u membranama. To se postiže kovalentnim vezivanjem modifikatora na površinu elektrode, hemisorpcijom ili prevlačenjem elektrode polimernim filmom, uključujući i elektropolimerizaciju monomera, kao i jednostavnom fizisorpcijom [110].

Zapreminska modifikacija podrazumeva modifikaciju cele mase ugljenične paste. Modifikator može direktno da se dodaje u ugljeničnu pastu, a može i da se rastvori u vezivnoj tečnosti. Zbog bolje homogenosti tečni modifikatori su se pokazali boljim od čvrstih modifikatora [110].

Na osnovu karakteristika modifikatora, modifikovane CPE se mogu podeliti na:

- hemijski modifikovane
- biološki modifikovane i
- fizički modifikovane (pod dejstvom magnetnog polja, sunčeve svetlosti, povišene temperature i dr).

Modifikacijom elektrode postiže se bolja osetljivost i selektivnost, bolji intenzitet i oblik elektrohemijuskog signala, a i sprečavaju se nepoželjne sporedne reakcije [110].

Odabrani primeri primene elektrode od ugljenične paste

Dorđević i dr. su određivali herbicid linuron primenom diferencijalno pulsne voltametrije i elektrode od ugljenične paste sa trikrezil-fosfatom kao vezivnom tečnošću (CPE-TCP). Najbolje elektrohemijske karakteristike radne elektrode ispoljavaju se pri pH 2,0. Na ovoj pH vrednosti javlja se i signal linurona na potencijalu 1,3 V u odnosu na ZKE. Pri datim uslovima linearnost kalibracione krive postignuta je u koncentracionom opsegu 1,25-44,20 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Razvijena metoda je potom primenjena za određivanje linurona u spajkovanom uzorku rečne

vode i u komercijalnoj formulaciji linurona. Dobijeni rezultati se dobro slažu sa rezultatima dobijenim primenom HPLC-UV [115].

Papp i dr. su primenili tri vrste elektrode od ugljenične paste, sa trikrezil-fosfatom, silikonskim uljem i *n*-tetradekanom kao vezivnom komponentom za određivanje imidakloprida. Kao najpogodnija pokazala se CPE-TCP na osnovu oblika i intenziteta dobijenog signala. DPV i CPE-TCP primenjene su za određivanje imidakloprida u uzorku rečne vode i u dve komercijalne formulacije ispitivanog insekticida. Određivano je u koncentracionom opsegu od 1,7 do 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a RSD nije prelazila 2,2%. Ovo predstavlja prvu primenu CPE za voltametrijsko određivanje neonicotinoidnog insekticida [116].

Farghaly i Mohamed su razvili SW-AdSV za određivanje azitromicina u čistom obliku, komercijalnoj formulaciji i u biološkim uzorcima. Kao radna elektroda korišćena je CPE. Primenom optimizovane metode granica detekcije prilikom određivanja azitromicina u čistom obliku je bila 0,463 ng mL^{-1} , a granica određivanja je 1,544 ng mL^{-1} . Metoda je uspešno primenjena i za određivanje ovog makrolidnog antibiotika u uzorku urina i u dva oblika komercijalne formulacije ispitivanog makrolidnog antibiotika [117].

Ashrafi i dr. su primenili CPE sa trikrezil-fosfatom kao vezivnom tečnošću za voltametrijsku karakterizaciju fungicida karbendazima. Ispitivanjem uticaja pH vrednosti sredine na oblik i intenzitet signala ispitivanog analita, uočeno je da se optimalan odnos signal/šum postiže u blago kiseloj sredini (pH 4,0). Karbendazim je određivan primenom diferencijalno pulsne adsorptivne stripping voltametrije. Voltamogrami su snimani u opsegu potencijala od -0,10 V do 1,30 V, pri čemu je potencijal akumulacije bio -0,35 V, a vreme akumulacije 120 s. Linearnost kalibracione krive je postignuta u koncentracionom opsegu od $5,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ do $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, a granica detekcije je bila $3,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Razvijena metoda se pokazala pogodnom za određivanje ciljnog analita u spajkovanom uzorku rečne vode [118].

Elektroda od ugljenične paste, na osnovu navedenih radova, pokazala se pogodnom za voltametrijsku karakterizaciju i određivanje organskih molekula (različitih pesticida i antibiotika), zbog njihove elektrohemijske oksidacije ili redukcije, primenom direktnih i adsorptivnih metoda.

2.3.3.3. Elektroda od staklastog ugljenika. Bizmut-film elektroda i njena primena

Elektroda od staklastog ugljenika pripada grupi ugljeničnih elektroda. GC je specijalno tretiran ugljenik dobijen pirolitičkom degradacijom visoko molekularnih smola [110]. Karakteriše ga primenljivost u negativnoj oblasti potencijala u kiseloj sredini, nepropustljivost za molekule gasova, širok potencijalski prozor, čvrstoća i stabilnost. Od nedostataka ovog ugljeničnog materijala mogu se istaći krtoš i obavezno mehaničko poliranje [119] kojim se postiže aktivna i reproduktivna elektrodna površina [57].

Kao i CPE tako i GCE može biti površinski modifikovana. Jedan od tipova površinski modifikovanih GCE jesu metal film elektrode, a u daljem tekstu će biti reči o bizmut-film elektrodama.

Bizmut-film elektroda (BiFE) spada u metal film elektrode i prvi put je predstavljena tokom ranih 2000-tih godina [120,121]. Predstavlja veoma dobru zamenu za živine elektrode, što je već pomenuto u poglavlju 2.3.3.1. BiFE se danas široko primenjuje jer je ekonomski relativno pristupačna, ima visoku mehaničku stabilnost, bizmut se može izdvojiti na različitim tipovima supstrata, visoko je selektivna i osetljiva, daje dobro definisan signal i na kraju, fizičko-hemijske osobine bizmuta su veoma slične živinim [122,123]. Takođe, bitni razlozi zbog kojih se bizmut-film elektroda široko primenjuje je što bizmut može da gradi legure sa različitim elementima i što nije osetljiv na prisustvo rastvorenog kiseonika [124]. Glavna prednost bizmuta u odnosu na živu jeste što nije toksičan i spada u tzv. "zelene" elemente [123]. U početku su se BiFE primenjivala za određivanje tragova metala [120,125-127], a danas nalaze primenu i za određivanje različitih organskih jedinjenja kao što su pesticidi [128,129], medikamenti [130], vitamini [131,132], hormoni [122,133] i dr.

Postoje dva osnovna načina izdvajanja bizmut-filma na površini elektrode, to su *ex situ* i *in situ* metode [134]. Kod *ex situ* metode izdvajanja bizmut-filma koristi se zaseban rastvor za elektrodepoziciju u kojem se izdvaja film a potom se pripremljena elektroda ispere i uroni u ispitivani rastvor, dok se kod *in situ* metode izdvajanje filma i analiza ispitivanog analita vrše iz istog rastvora.

Odabrani primeri primene bizmut-film elektrode

Guzsvány i dr. su određivali insekticid tiametoksama primenom BiF-GCE. Najpogodnijih uslovi za izdvajanje bizmut-filma (postupak predtretmana elektrode, sastav rastvora za izdvajanje filma, potencijal izdvajanja, kao i stabilnost filma) su ispitivani primenom elektrohemijskih i mikroskopskih tehnika. Pokazalo se da je bizmut-film izdvojen na površini GCE iz rastvora koji je sadržao $0,02 \text{ mol L}^{-1} \text{ Bi}(\text{NO}_3)_3$, $1,0 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$ i $0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ KBr}$ u toku 60 s na potencijalu $-0,25 \text{ V}$ u odnosu na $\text{Ag}/\text{AgCl}/3 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ bio pogodan za analitičke svrhe. Tiametoksam je određivan primenom DPV u prisustvu Briton-Robinsonovog pufera pH 8,0. Linearnost kalibracione krive je postignuta u opsegu koncentracija tiametoksama $1,26\text{--}45,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. RSD je bila manja od 1,5%, a granice detekcije i određivanja bile su $0,38 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ i $1,26 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Razvijena metoda je primenjena za određivanje tiametoksama u krompiru i kukuruzu [128].

Sá i dr. su uspešno određivali riboflavin (vitamin B₂) u sirupu i tabletama primenom *ex situ* pripremljene BiFE. Primenom ciklične voltometrije u acetatnom puferu pri pH 4,0 uočeno je da vitamin B₂ podleže adsorptivno-kontrolisanoj reakciji kvazireverzibilnog transfera elektrona. Primenom AdSWV dobijena je kalibraciona kriva sa dva linearna opsega: prvi je u koncentracionom opsegu od $0,3 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ do $0,8 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, a drugi od $1,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ do $9,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ vitamina B₂. U slučaju prvog linearnog opsega granica detekcije je iznosila 100 nmol L^{-1} , a granica određivanja 300 nmol L^{-1} . Takođe, postignuta je odlična selektivnost, stabilnost i ponovljivost tokom merenja. Fluorescencija je korišćena kao komparativna metoda čime su potvrđene dobre osobine BiFE-AdSWV za određivanje vitamina B₂ [132].

Guzsvány i dr. su razvili elektroanalitičku metodu za određivanje dva neonikotinoidna insekticida imidakloprida i acetamiprida zasnovanu na primeni DPV i BiFE u prisustvu Briton-Robinsonovog pufera kao pomoćnog elektrolita. Redukcioni signali neonikotinoida su se javili na potencijalima negativnijim od $-0,5 \text{ V}$ i uočeno je da karakteristike signala zavise od pH vrednosti sredine. Kao najpogodnija pH vrednost za određivanje imidakloprida pokazala se pH 8,0 dok za acetamiprid pH 3,0. Zadovoljavajuća linearnost kalibracione krive postignuta je za imidaklopid u koncentracionom opsegu od $2,43 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ do $51,1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, a za acetamiprid od $2,95 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ do $47,3 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Granica detekcije je iznosila $0,73 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ za imidaklopid i $0,88$

$\mu\text{g mL}^{-1}$ za acetamidrid. Razvijena elektroanalitička metoda omogućila je praćenje heterogene fotokatalitičke ($\text{O}_2/\text{TiO}_2/\text{UV}$) razgradnje oba insekticida. Dobijeni rezultati kinetike i brzine reakcije na osnovu elektroanalitičkih rezultata potvrđeni su komparativnim HPLC-DAD i FTIR merenjima [129].

Grabarczyk i Wasqg su određivali tragove galijuma (Ga) primenom adsorptivne inverzne voltometrije i *in situ* pripremljene BiFE. Metoda se zasnivala na istovremenom izdvajanju bizmut-filma i prekoncentrisanju kompleksa Ga(III)-kupferona na potencijalu $-0,65\text{ V}$. Određivanje Ga(III) baziralo se na njegovoj elektrohemijskoj redukciji. Proučavani su uticaji koncentracije Bi(III) i kupferona, vremena i potencijala depozicije pri određivanju Ga(III). Za vreme akumulacije od 180 s postignuta je linearnost kalibracione krive u opsegu koncentracija $3 \cdot 10^{-10}$ - $3 \cdot 10^{-7}\text{ mol L}^{-1}$ sa koeficijentom korelacije od 0,998. Granica detekcije pri datim uslovima iznosila je $1,05 \cdot 10^{-10}\text{ mol L}^{-1}$. BiFE je uspešno primenjena za određivanje Ga(III) u sertifikovanom referentnom materijalu morske vode NASS-5 [135].

Guzsvány i dr. su primenili dva tipa bizmut elektroda, BiF-GCE i zapreminski modifikovana bizmutom CPE za određivanje odabranih nitrovanidinskih neonicotinoidnih insekticida. Metoda zasnovana na *ex situ* pripremi BiF-GCE i DPV primenjena je za određivanje klotianidina u koncentracionom opsegu od 2,5 do 23 $\mu\text{g mL}^{-1}$ sa RSD koja nije prelazila 1,5%. Elektrode od ugljenične paste sa trikrezil-fosfatom kao vezivnom komponentom zapreminski modifikovane sa 5 i 20 m/m% bizmuta, pokazivale su različite analitičke osobine prilikom određivanja imidakloprida, što se tiče oblika signala, potencijalskog prozora i nivoa šuma. CPE-TCP modifikovana sa 5% bizmuta je bila pogodnija za određivanje imidakloprida i primenom razvijene DPV metode imidakloprid je određivan u koncentracionom opsegu od 1,7 do 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pri čemu je RSD bila 2,4%. Kako bi se dobio bolji uvid u morfologiju senzorske površine, primenjena je skenirajuća elektronska mikroskopija i u slučaju površinskog filma od bizmuta i u slučaju zapreminske modifikacije bizmutom [134].

Bizmut-film elektroda je pogodna za određivanje kako organskih molekula tako i metala u odabranim uzorcima kao npr. praćenje heterogene fotokatalitičke razgradnje odabranih insekticida ili određivanje ciljnih analita u odabranom sertifikovanom referentnom materijalu, što se može zaključiti na osnovu predstavljenih odabranih primera primene ove elektrode.

2.4. Druge tehnike primenjene u eksperimentalnom radu

2.4.1. Nuklearna magnetna rezonanca

Nuklearna magnetna rezonanca (NMR) je visokosofisticirana tehnika kojom se proučavaju magnetne osobine nukleusa. Apsorpcija i emisija elektromagnetnog zračenja može se uočavati kada se nukleus nalazi u jakom spoljašnjem magnetnom polju [136]. Pri konstantnom magnetnom polju može da se varira frekvencija energije dok se ne uspostave rezonantni uslovi, odnosno kada jezgra počinju da apsorbuju. Svaka vrsta jezgra će rezonirati pri nekoj drugoj vrednosti frekvencije. Uspostavljanjem rezonantnih uslova omogućava se apsorpcija radio-frekventne energije koju predajnik emituje u toku analize. Odgovor registruje radio-frekventni prijemnik. Serija dobijenih signala na frekventnoj skali predstavlja NMR spektar, pri čemu je svaki signal okarakterisan svojim položajem na NMR skali i svojim intenzitetom. Površina dobijenog NMR signala direktno je proporcionalna broju jezgara koja rezoniraju pri datim uslovima. Promena položaja rezonantnog signala, kao posledica hemijske strukture jedinjenja naziva se hemijsko pomeranje. Na osnovu dobijenih NMR spektara može da se izvrši i kvalitativna i kvantitativna analiza [137].

Danas se uglavnom primenjuje pulsna FT (Fourier-ova transformacija) tehnika koja za razliku od prevaziđenih CW spektrometara, gde se vrši kontinualno ozračivanje, koristi snažan i kratak radiofrekventni puls dužine nekoliko mikrosekundi. Kod CW tehnike energetski prelazi se sukcesivno pobuđuju promenom magnetnog polja dok se kod FT tehnike svi energetski prelazi posmatranog spinskog sistema pobuđuju istovremeno.

Pulsni FT NMR spektrometar je znatno brži i osetljiviji od CW spektrometra i omogućava detekciju svih spin-aktivnih jezgara za razliku od CW instrumenta koji je podešen za snimanje NMR spektara jedne vrste jezgara. Zahvaljujući softveru, kod FT tehnike moguće je snimiti raspad slobodne indukcije (engl. FID) više puta pod identičnim uslovima pri čemu se izmereni interferogram sabira sa sumom prethodno snimljenih i ovaj zbir se čuva u memoriji. Signali NMR spektra dobijeni Fourier-ovom transformacijom n interferograma su intenzivniji \sqrt{n} puta u odnosu na signale dobijene primenom samo jednog pulsa. Radi dobijanja NMR spektra informacije dobijene pulsnom tehnikom se na kraju softverski pretvaraju iz tzv.

vremenskog domena u domen frekvencije primenom matematičke operacije, Fourier-ove transformacije [138].

NMR tehnika se najčešće koristi u organskoj hemiji radi dobijanja informacija o strukturi nekog sintetisanog jedinjenja. Takođe, ova tehnika se može primeniti i za prećenje promena u strukturi molekula u zavisnosti od pH vrednosti.

Radi utvrđivanja da se ispitivani makrolidni antibiotici (EES, azitromicin, klaritromicin i roksitromicin) nalaze u svom protonovanom obliku tj. da bi se ispitala moguća protonacija tercijarne amino grupe svakog molekula ponaosob pri optimalnoj pH vrednosti, u ovom radu primenjena je ^1H NMR tehnika, odnosno praćeno je hemijsko pomeranje N,N-dimetil protona za sva četiri makrolida pri odabranim pH vrednostima. Metilski protoni tercijarne amino grupe imaju značajno različita hemijska pomeranja kada je u pitanju protonovana/pozitivno naelektrisana i deprotonovana/nenaelektrisana forma atoma azota, s toga je moguće odrediti da li se molekul nalazi u svom protonovanom obliku pri odabranoj pH vrednosti. *Brennan i Barber* su snimili ^1H NMR spektar rastvora azitromicina pripremljenog u natrijum-fosfatu i deuterisanoj vodi (D_2O) pri pH 7,4. Izvršili su asignaciju ^1H NMR spektra azitromicina pri čemu je hemijsko pomeranje signala za N,N-dimetil protone bilo 2,85 ppm [139]. Assignaciju ^1H NMR spektra klaritromicina izvršili su *Awan i dr.* iz rastvora klaritromicina pripremljenog u D_2O puferu (fosfatni pufer pH 7,4) i hemijsko pomeranje signala za N,N-dimetil protone je 2,84 ppm [140]. U slučaju roksitromicina asignaciju njegovog ^1H NMR spektra uradili su *Gharbi-Benarous i dr.* i na osnovu njihovih rezultata hemijsko pomeranje za signale N,N-dimetil protona je 2,63 ppm [141].

2.4.2. Tečna hromatografija visoke efikasnosti

Tečna hromatografija je analitička tehnika koja se koristi za razdvajanje smeše u rastvoru na njihove individualne komponente. Kod Tečne hromatografije visoke efikasnosti se mobilna faza mehanički pumpa kroz kolonu koja sadrži stacionarnu fazu. Svaki HPLC uređaj sastoji se od rezervoara mobilne faze, pumpe, injektora, kolone i detektora [142]. Kao rezultat hromatogramske analize nastaju hromatogrami koji omogućavaju kavalitativnu i kvantitativnu analizu. Kvalitativna analiza se zasniva na merenju retencionog vremena (vreme potrebno analitu da stigne do detektora) ili položaja analita na stacionarnoj fazi posle određenog vremena

eluiranja dok se kvantitativna analiza zasniva na merenju površine ili visine dobijenih hromatografskih pikova [86].

Najčešće primenjena tehnika za određivanje doksorubicina i makrolidnih antibiotika je tečna hromatografija visoke efikasnosti sa masenom spektrometrijskom detekcijom [18,143-148]. Pored masene spektrometrijske detekcije za određivanje doksorubicina mogu se koristiti različiti detektori kao što su UV-Vis [149], hemiluminescentni [150], fluorimetrijski [19], elektrohemijski [20], itd. Kod određivanja makrolidnih antibiotika, zbog nedostatka osetljivih hromofora u njihovoj strukturi, DAD detektor nije toliko pogodan, ali hemijskom derivatizacijom je moguće povećati osetljivost metode [63]. Pored ovih detektora može se primeniti i fluorescentni detektor [68,151], hemiluminescentni [152], elektrohemijski [153], itd. kao što je slučaj i sa dokosrubicinom.

U skladu sa Evropskom Farmakopejom 5,0 metode za određivanje u ovom radu ispitivanih antibiotika doksorubicin-hidrohlorida, eritromicin-etilsukcinata, azitromicina, klaritromicina i roksitromicina zasniva se na tečnoj hromatografiji sa spektrofotometrijskom detekcijom sa radnom talasnom dužinom u UV oblasti: 254 nm za doksorubicin hidrohlorid; 215 nm za eritromicin, EES i AZI i 205 nm za CLA i ROX. U slučaju eritromicina i EES-a kolona je punjena sa stiren-divinilbenzen kopolimerom dok se u slučaju ostalih ispitivanih antibiotika preporučuju različiti tipovi oktadecilsilil kao stacionarna faza u zavisnosti od ispitivanog analita. Kod metode za određivanje doksorubicin-hidrohlora predložena mobilna faza se sastoji od jednakih zapremina acetonitrila, 2,88 g L⁻¹ rastvora natrijum-lauril-sulfata i 2,25 g L⁻¹ rastvora fosforne kiseline. Za određivanje eritromicina i eritromicin-etilsukcinata mobilna faza se sastoji od 450,0 mL fosfatnog pufera pH 9,0 (u slučaju eritromicina) odnosno pH 8,0 (u slučaju eritromicin-etilsukcinata), 165,0 mL 2-metil-2-propanola, 30,0 mL acetonitrila i 355,0 mL vode, dok se za određivanje azitromicina mobilna faza sastoji iz smeše 34,84 g L⁻¹ rastvor dikalijum-hidrogen-fosfat, pH 6,5 : acetonitril : voda u odnosu 10%:35%:55% (V/V/V). Kod metode za određivanje klaritromicina i roksitromicina predloženo je gradijentno eluiranje po određenom protokolu pri čemu je kod CLA-a komponenta A 4,76 g L⁻¹ rastvor kalijum-dihidrogen-fosfata, pH 4,4 ili 45 g L⁻¹ rastvor kalijum-hidroksida, dok je komponenta B acetonitril. Kod ROX-a komponentu A čini smeša acetonitril : 59,7 g L⁻¹ rastvor amonijum-dihidrogenfosfat, pH 4,3 u odnosu 26%:74% (V/V), a komponenta B je smeša voda : acetonitril (30%:70%, V/V). Protok

mobilne faze po predloženim metoda Evropske Farmakopeje 5,0 jeste 2,0 mL min⁻¹ za eritromicin i eritromicin-etilsukcinat; 1,1 mL min⁻¹ u slučaju klaritromicina i roksitromicina; kod metode za određivanje doksorubicin-hidrohlorida i azitromicina predloženi protok mobilne faze je 1,0 mL min⁻¹ [64].

U ovom radu je razvijena i primenjena HPLC metoda sa DAD detektorom, kao komparativna metoda, za određivanje eritromicin-etilsukcinata u model rastvoru i komercijalnoj formulaciji Eritromicin® (Hemofarm a.d., Farmaceutsko - Hemijska Industrija, Vršac, Srbija).

2.4.3. Skenirajuća elektronska mikroskopija

Skenirajući elektronski mikroskop (SEM) je instrument koji omogućava ispitivanje i karakterizaciju heterogenih organskih i neorganskih materijala [154]. Primenjuje se u skoro svakoj grani nauke, tehnologije i industrije [155]. Kod skenirajućeg elektronskog mikroskopa koristi se usmereni snop elektrona umesto vidljive svetlosti za dobijanje slike o ispitivanom preparatu [154]. Sastoji se od elektronskog topa (katoda od volframa) koji produkuje elektronski snop, elektrode za ubrzavanje elektrona, magnetnih sočiva, držača za uzorak i detektora. Prečnik elektronskog snopa je 1 nm i usmeren je na površinu uzorka. Elektronski snop skenira površinu preparata i na osnovu sekundarnih i reflektovanih elektrona (signali od interesa) od spoljašnje površine preparata formira sliku ispitivane površine tako da su ivice svetle, a udubljenja tamna [154,155]. Zahvaljuću SEM-u moguće je proučavati topografiju i morfologiju preparata [154]. Skenirajući elektronski mikroskop se pokazao veoma pogodnim za karakterizaciju elektrodnih površina kako u njihovom nativnom obliku tako i u modifikovanom obliku.

U ovom radu primenom SEM vršeno je proučavanje morfologije elektrode od ugljenične paste površinski modifikovane sa koloidnim zlatom dok je prisustvo zlata na površini dokazano primenom energetsko disperzionog spektrometrijskog detektora (EDS). *Hu i dr.* su takođe primenili SEM radi dokazivanja prisustva koloidnog zlata na površini elektrode od staklastog ugljenika modifikovane L-cisteinom [156]. *Majid i dr.* su dokazivali prisustvo nanočestica zlata na površini elektrode od staklastog ugljenika nakon 120 s elektrohemijske depozicije zlatnih nanočestica iz rastvora primenom SEM. Takođe, primenom ove tehnike mogli su da ispitaju kako vreme elektrodepozicije utiče na veličinu izdvojenih nanočestica [157].

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Hemikalije i rastvori

Sve korišćene hemikalije bile su analitičke čistoće.

Osnovni rastvor DOX-a pripremljen je rastvaranjem odgovarajuće količine doksorubicin-hidrohlorida (Pfizer, New York City, New York, USA) u bidestilovanoj vodi tako da je koncentracija DOX $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Osnovni rastvor eritromicin-etilsukcinata (standard sadrži 79,82% eritromicina u formi eritromicin-etilsukcinata) koncentracije $117,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ pripremljen je rastvaranjem odgovarajuće količine eritromicin-etilsukcinata u smeši bidestilovana voda : metanol (80:20, V/V). Osnovni rastvori azitromicina, klaritromicina i roksitromicina pripremljeni su na istovetan način kao i osnovni rastvor eritromicin-etilsukcinata, s tim da je azitromicin rastvoren u smeši bidestilovana voda : metanol u odnosu 70:30, V/V, pri čemu su koncentracije osnovnih rastvora bile $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Sva četiri makrolida su ustupljena prof. dr Valeriji Gužvanj od strane prof. dr Slobodana Petrovića. Osnovni rastvor 3-DH-DHK, koja je sintetisana u Laboratoriji prof. dr Janoša Čanadija (János Csanádi), Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu, pripremljen je rastvaranjem odgovarajuće količine 3-DH-DHK u Briton-Robinsonovom puferu pH 11,8 tako da je koncentracija osnovnog rastvora $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Rastvor komercijalne formulacije eritromicin-etilsukcinata, Eritromicin[®] tablete (po deklaraciji jedna tableta sadrži 250 mg eritromicina u obliku eritromicin-etilsukcinata, Hemofarm a.d., Farmaceutsko-hemijska industrija, Vršac, Srbija) pripremljen je rastvaranjem odgovarajuće količine tablete u smeši bidestilovana voda : metanol (65:35, V/V) tako da je koncentracija eritromicin-etilsukcinata bila $294,1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Rastvor Runac[®] tablete koja po deklaraciji proizvođača sadrži 150 mg roksitromicina, pripremljen je na anlogan način kao i rastvor Eritromicin[®] tablete, pri čemu je koncentracija roksitromicina bila $150,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Uzorci su filtrirani kroz hidrofilni filter (Millex, $0,22 \mu\text{m}$) pre merenja.

Rastvor za elektrodepoziciju bizmut-filma na površini GCE, $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ rastvor $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ u HCl-u, pripremljen je rastvaranjem $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ (ekstra čistoće, proizveden u USSR) i

KBr (Kemika Zagreb, Hrvatska) u 1,0 mol L⁻¹ HCl-u (37% HCl, Zorka Pharma Hemija d.o.o., Šabac, Srbija).

Briton-Robinsonov pufer pripremljen je od osnovnih rastvora 0,04 mol L⁻¹ fosforne kiseline (Merck, Nemačka), borne kiseline (Merck, Nemačka) i sirćetne kiseline (Merck, Nemačka) uz dodatak 0,2 mol L⁻¹ natrijum-hidroksida (Merck, Nemačka) do željene pH vrednosti, u opsegu od pH 2,0 do pH 11,98 (kako se pH vrednost 11,98 može zaokružiti na pH 12,0 u daljem tekstu korišćena je ova zaokružena pH vrednost).

Za HPLC merenja korišćen je acetonitril (Sigma Aldrich, HPLC čistoće, ≥99,9%), metanol (Sigma Aldrich, HPLC čistoće, ≥99,9%) i fosfatni pufer pH 6,5; 7,5 i 8,0 pripremljen od 0,02 mol L⁻¹ dikalijum-hidrogen-fosfata (Merck, Nemačka) uz dodatak odgovarajuće količine koncentrovane fosforne kiseline (Zorka Pharma Hemija d.o.o., Šabac, Srbija).

Uzorci makrolidnih antibiotika za ¹H NMR merenja pripremljeni su od njihovih komercijalnih formulacija. U slučaju eritromicin-etilsukcinata, set uzoraka različite pH vrednosti je pripremljen tako da je odgovarajuća količina Eritromicin[®] tablete rastvorena u rastvaraču koji sadrži 980,0 μL D₂O (Sigma Aldrich, 99,9 atom % D, 1% w/w 4,4-dimetil-4-silapentan-1-sulfonska kiselina (DSS)), 980,0 μL odgovarajućeg Briton-Robinsonovog pufera (pH 6,4; 6,8; 7,0; 7,5 i 8,0) i 40,0 μL metanola (Sigma Aldrich, HPLC grade, ≥99,9%) pri čemu je koncentracija eritromicin-etilsukcinata bila 24,0 mg mL⁻¹. Suspenzija je sonifikovana na ultrazvučnom kupatilu u toku 30 minuta a potom je 600,0 μL pripremljene suspenzije profiltrirano kroz hidrofilni filter (Millex, 0,22 μm) u 5 mm NMR kivetu. Odgovarajuća količina Hemomycin[®] kapsule (po deklaraciji jedna kapsula sadrži 250 mg azitromicina, Hemofarm a.d., Farmaceutsko - hemijska industrija, Vršac, Srbija) rastvorena je u smeši koja sadrži 980,0 μL D₂O (bez DSS-a, Sigma Aldrich, 99% atom D), 980,0 μL odgovarajućeg Briton-Robinsonovog pufera (pH 6,8; 7,0; 7,2; 7,4; 8,0; 8,2; 8,4; 8,6 i 8,8) i 40,0 μL metanola, tako da je koncentracija azitromicina 23,5 mg mL⁻¹. Postupak pripreme uzoraka i prenošenje u NMR kivetu analogno je kao i u slučaju EES-a. Postupak pripreme rastvora farmaceutske formulacije klaritromicina (Clathrocyn[®], po deklaraciji jedna tableta sadrži 250 mg klaritromicina, Hemofarm a.d., Farmaceutsko - hemijska industrija, Vršac, Srbija) i roksitromicina (Runac[®], po deklaraciji jedna tableta sadrži 150 mg roksitromicina, Jugoremedija a.d., Farmaceutska industrija, Zrenjanin,

Srbija) istovetan je pripremi rastvora komercijalne formulacija azitromicina s tim da su kod pripreme uzoraka Clathrocyn[®] tableta korišćeni Briton-Robinsonovi puferi pH 6,0; 7,2; 7,4; 8,0; 8,4; 8,7; 8,9; 9,2 i 10,0, a kod pripreme uzotaka Runac[®] tableta pH 6,0; 7,0; 7,4; 8,0; 8,2; 8,4; 9,0; 10,5 i 11,0. Pošto su u slučaju azitromicina, klaritromicina i roksitromicina uzorci pripremljeni primenom D₂O bez DSS-a zbog preklapanja signala, vršena je eksterna kalibracija, tako što su pripremljeni rastvori slepe probe za sve korišćene pH vrednosti. Slepe probe su pripremljene mešanjem 490,0 µL Briton-Robinsonovog pufera odgovarajuće pH vrednosti, 245,0 µL D₂O sa 1% w/w DSS, 245,0 µL D₂O bez DSS-a i 20,0 µL metanola. Alikvot od 600,0 µL prenet je u NMR cev.

Rastvor za praćenje toka elektrolize 3-DH-DHK, pripremljen je rastvaranjem odgovarajuće količine 3-DH-DHK u 15,0 mL D₂O (Sigma Aldrich, 99,9 atom % D, 1% w/w DSS) i 25,0 mL Briton-Robinsonovog pufera pH 11,8 tako da je koncentracija ispitivanog analita 1171,6 µg mL⁻¹.

Za površinsku modifikaciju CPE korišćeno je koloidno zlato prečnika 10 nm, koncentracije 100,0 µg mL⁻¹, pripremljeno na Univerzitetu u Segedinu, u Laboratoriji prof. dr Zoltana Konje (Zoltán Kónya), i preko MATCROSS projekta ustupljeno je prof. dr Valeriji Gužvanj (Valéria Guzsvány) za dalja proučavanja primenljivosti ovog nanomaterijala. Na slici 17 prikazano je sintetisano koloidno zlato pored standarda koloidnog zlata istog prečnika od 10 nm.



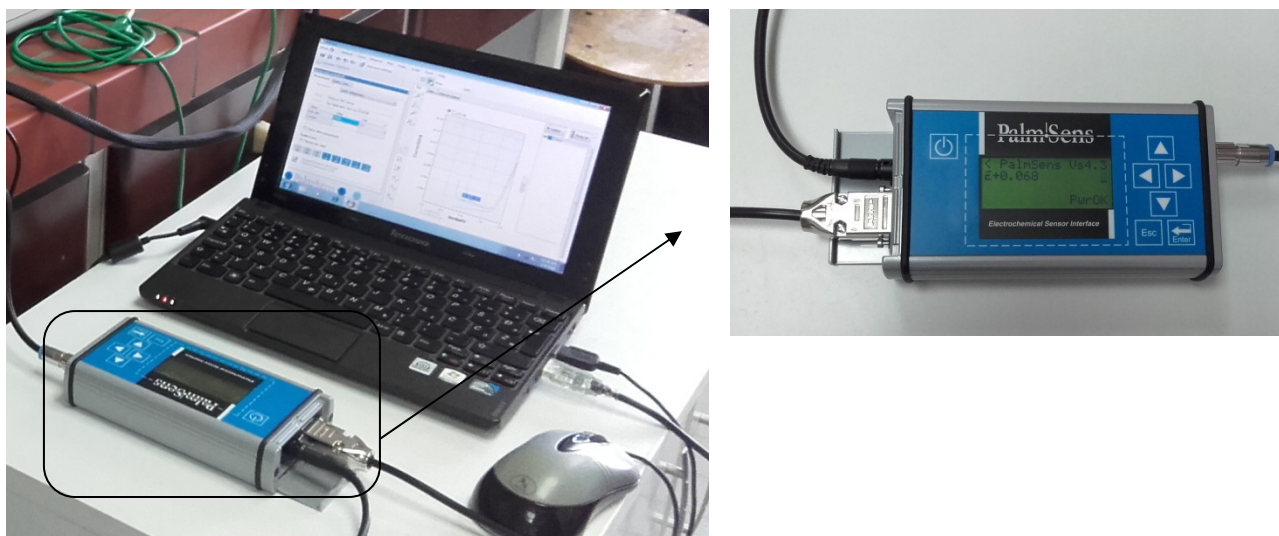
Slika 17. Standard koloidnog zlata (levo) i sintetisano koloidno zlato (desno) prečnika 10 nm

3.2. Instrumenti

Voltametrijska merenja su vršena na uređajima AUTOLAB PGSTAT 12 (slika 18) uz primenu GPES 4,9 softvera (Metrohm) i PalmSens u kombinaciji sa softverskim programom PSTrace 3.0. Na slici 19 prikazan je PalmSens povezan sa računarom.

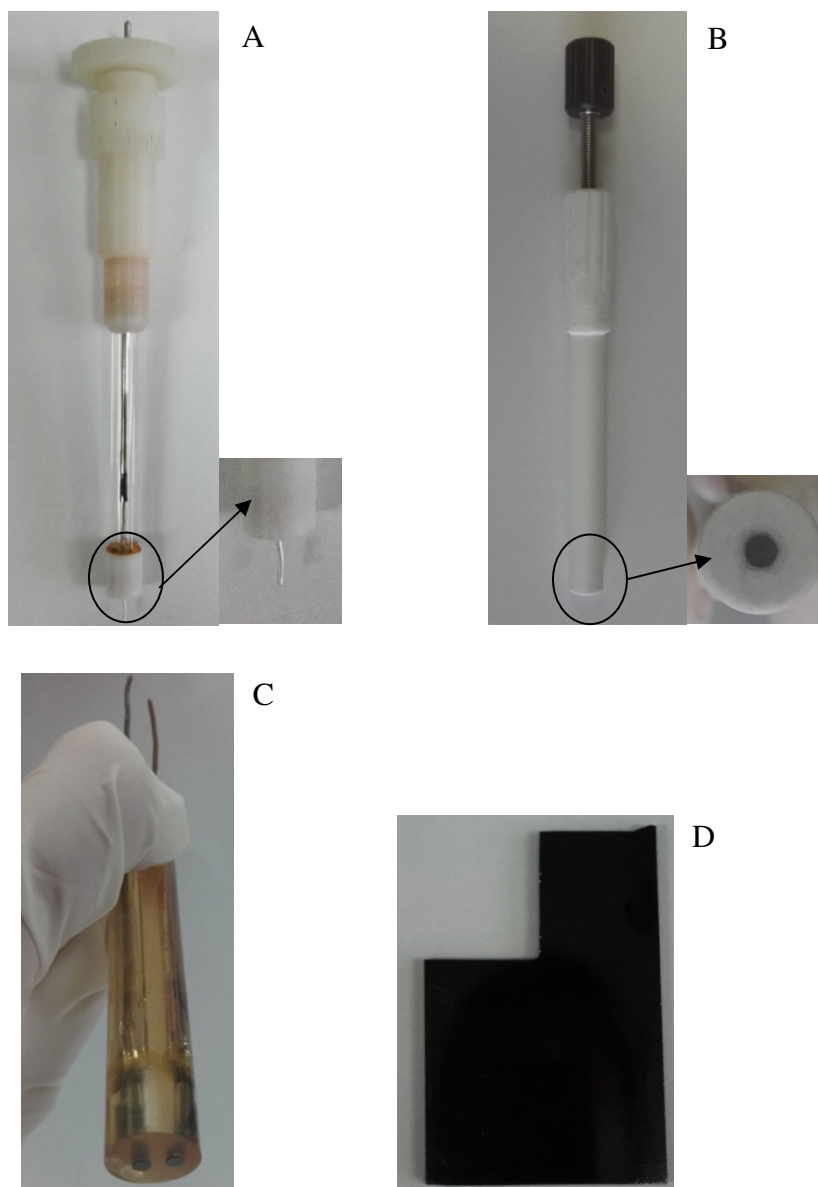


Slika 18. Voltametrijski uređaj, potenciostat i galvanostat, AUTOLAB PGSTAT 12



Slika 19. PalmSens zajedno sa računarom i uvećani prikaz PalmSensa

Primenjeni troelektrodni sistem sastojao se od referentne elektrode koja je bila zasićena kalomelova elektroda (Radiometer, Danska), pomoćne elektrode koja je bila platinska elektroda tipa 805/SPG/12J (Amel, Milano, Italija), i radne elektrode. Kao radne elektrode korišćene su Hg(Ag)FE (MTM Anko Instruments, Krakov, Poljska, slika 20A), CPE, prečnika 2,0 mm (slika 20B), u svom nativnom obliku i površinski modifikovana sa koloidnim zlatom (Au-CPE) i GCE (Sigri Electrographit, HTT (heat-treatment temperature) 2400 °C, prečnika 3,0 mm, slika 20C, u svom nativnom obliku) površinski modifikovan sa bizmut-filmom. Prilikom elektrolize 3-DH-DHK kao radna elektroda korišćena je ploča GCE (Sigri) površine 35,32 cm² (slika 20D) koja je površinski modifikovana sa bizmut-filmom. Prilikom primene Hg(Ag)FE površina radne elektrode je obnavljana pre svakog merenja.



Slika 20. *Primenjene radne elektrode: Hg(Ag)FE, konfiguracija spremna za merenje (A), CPE (B), GCE (C) i GCE ploča (D)*

pH vrednost pufera je podešena i kontrolisana primenom kombinovane staklene elektrode (Jenway, Velika Britanija) i prethodno kalibrisanog pH-metra (Radiometer, Danska, slika 21).



Slika 21. pH-metar

Uporedna HPLC merenja su izvršena na Agilent 1290 Infinity tečnom hromatografu (Agilent Technologies Inc., Sjedinjene Američke države) sa detektorom na bazi niza dioda uz primenu Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1 mm x 50 mm, 1,8 μ m) kolone (slika 22).



Slika 22. Tečni hromatograf Agilent 1290 Infinity i Zorbax Eclipse Plus C18 kolona

^1H NMR spektri su snimani na Bruker AVANCE III HD 400 MHz spektrometru (Bruker, Nemačka), opremljen sa Prodigy hladenom mernom glavom (slika 23) i na Bruker AVANCE III HD 400 MHz spektrometru sa BBFO mernom glavom.



Slika 23. NMR spektrometar Bruker AVANCE III HD 400 MHz - Prodigy

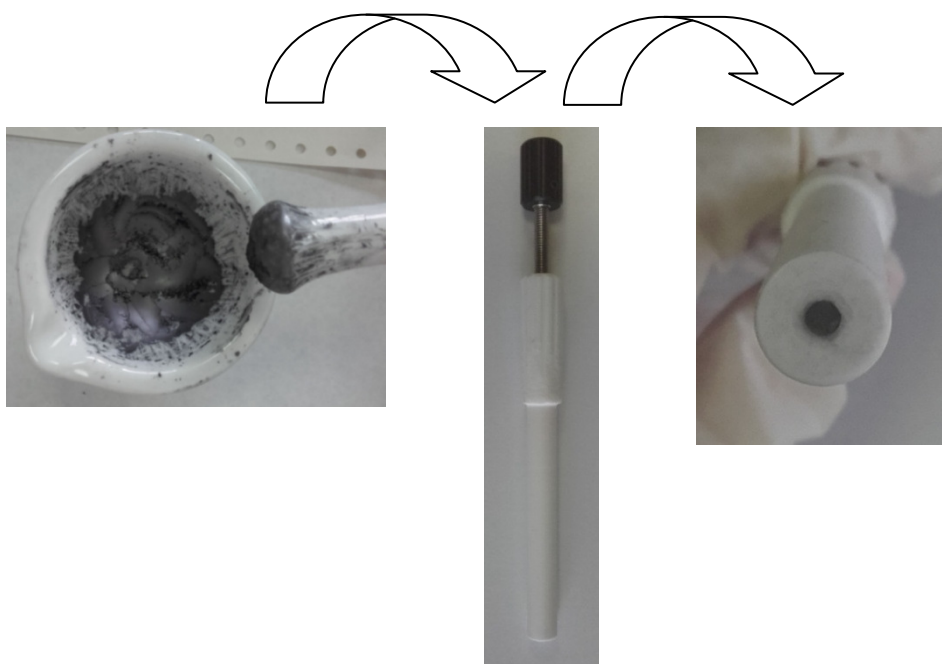
Skenirajući elektronski mikrografi su dobijeni primenom skenirajućeg elektronskog mikroskopa (SEM, JSM-6460LV, Japan Elektron Optička Laboratorija, Japan) dok je lokalna mikroanaliza površine sprovedena primenom EDS detektora (EDS, INCA, Oxford Instrumenti, Velika Britanija).

3.3. Postupci

3.3.1. Voltometrija

3.3.1.1. Priprema native i površinski modifikovane elektrode od ugljenične paste

Nativna CPE pripremljena je homogenizovanjem 0,5 g grafitnog praha "CR 5" i 200,0 μL parafinskog ulja (Kemika, Zagreb, Hrvatska), kao vezivne komponente, intenzivnim ručnim mešanjem u avanu pomoću tučka u toku pola sata. Nakon toga ugljeničnom pastom se napuni teflonski kalup radne elektrode [158]. Postupak pripreme CPE je prikazan na slici 24.



Slika 24. Prikaz pripreme nemodifikovane CPE

Kako bi se pripremila površinski modifikovana Au-CPE radna elektroda, na prethodno pripremljenu površinu CPE naneto je 3,0 μL koloidnog zlata metodom nanošenja kapi pomoću mikropipete (slika 25).



Slika 25. Postupak površinske modifikacije CPE sa suspenzijom koloidnog zlata metodom nanošenja kapi

3.3.1.2. Voltametrijska karakterizacija i određivanje ciljnih analita primenom različitih tipova radnih elektroda

Voltametrijska karakterizacija svih ciljnih analita (DOX, EES, AZI, CLA, ROX i 3-DH-DHK) izvršena je u Briton-Robinsonovom puferu pri odabranim pH vrednostima od pH 2,0 do pH 12,0. Karakterizacija je vršena primenom SWV metode a u slučaju EES i primenom DPV. Kao radne elektrode za voltametrijsku karakterizaciju ciljnih analita primenjene su Hg(Ag)FE za proučavanje redukcije DOX-a, EES-a, AZI, CLA i ROX, potom BiF-GCE prilikom ispitivanja procesa redukcije 3-DH-DHK i CPE u svom nativnom obliku za proučavanje oksidacije navedena četiri makrolidna antibiotika. Optimizovani osnovni uslovi kao i primenjena metoda i radna elektroda za voltametrijsku karakterizaciju svih pomenutih ciljnih analita sumirani su u tabeli 2.

Tabela 2. Osnovni parametri voltametrijske karakterizacije ciljnih analita

Ciljni analit	Proces redukcije	Proces oksidacije
Dokсорubicin	SWV; Hg(Ag)FE; opseg potencijala od -0,2 V do -1,4 V; pH od 2,0 do 8,0	Nije proučavano
Eritromicin-etilsukcinat	SWV; Hg(Ag)FE; opseg potencijala od -0,75 V do -1,8 V; pH od 4,0 do 9,0	SWV i DPV; CPE; opseg potencijala od 0,4 V do 1,1 V; pH od 2,0 do 12,0
Azitromicin	SWV; Hg(Ag)FE; opseg potencijala od -0,75 V do -1,8 V; pH od 4,0 do 11,9	SWV; CPE; opseg potencijala od 0,4 V do 1,1 V; pH od 2,0 do 9,0
Klaritromicin	SWV; Hg(Ag)FE; opseg potencijala od -0,75 V do -1,8 V; pH od 4,0 do 11,9	SWV; CPE; opseg potencijala od 0,4 V do 1,1 V; pH od 2,0 do 12,0
Roksitromicin	SWV; Hg(Ag)FE; opseg potencijala od -0,75 V do -1,8 V; pH od 4,0 do 11,9	SWV; CPE; opseg potencijala od 0,4 V do 1,1 V; pH od 2,0 do 12,0
3-dehidro-deoksiholna kiselina	SWV; BiF-GCE; opseg potencijala od -1,0 V do -1,8 V; pH od 9,5 do 11,8	Nije proučavano

Nakon osnovne voltametrijske karakterizacije i odabira optimalnih uslova rada ciljni analiti su određivani u model rastvorima primenom SWV, SW-AdSV i DPV metodom, a pojedini su određivani i u model uzorcima kao što je urin i u realnim uzorcima tj. odabranim komercijalnim formulacijama.

Svi potencijali u radu su mereni u odnosu na ZKE kao referentu elektrodu.

Površina Hg(Ag)FE zahteva predtretman pre merenja [93,102]. Elektroda je čišćena oko 5 minuta uranjanjem u rastvor 2,0% HNO₃ a potom je ponovo prevučena novom površinom amalgama. Pre početka seta merenja sveže obnovljena Hg(Ag)FE je elektrohemijski aktivirana u odabranom pomoćnom elektrolitu snimanjem cikličnih voltamograma u opsegu potencijala od -0,20 V do -1,60 V [93].

Pre nanošenja novog filma ili pre seta merenja neophodno je pristupiti mehaničkom predtretmanu GCE koji se zasniva na glačanju elektrode na prahu Al₂O₃ (Arachem reagensi)

nakvašenog sa bidestilovanom vodom. Veličina čestica praha je 5 μm . Nakon glačanja elektroda je detaljno isprana sa bidestilovanom vodom. Za određivanje 3-DH-DHK primenjena je GCE površinski modifikovana sa *ex situ* pripremljenim bizmut-filmom. Bizmut-film je izdvajan na površini elektrode tako što je prvo snimljen ciklični voltamogram u rastvoru za elektrodepoziciju, 0,02 mol L⁻¹ rastvor Bi(NO₃)₃ u HCl-u, u opsegu potencijala od 0,20 do -0,50 V. Na osnovu CV na kojem se uočava maksimum redukcionog pika Bi(III), bizmut-film je izdvajan na površini elektrode primenom hronoamperometrije na potencijalu -0,24 V u toku 60 s u mirnom rastvoru. Nakon izdvajanja bizmut-filma elektroda je oprana u 1,0 mol L⁻¹ rastvoru HCl-a. Ceo postupak *ex situ* izdvajanja bizmut-filma i pranja BiF-GCE je u skladu sa ranije opisanim postupkom [128].

3.3.2. Tečna hromatografija visoke efikasnosti

Prilikom određivanja EES-a u model rastvoru i komercijalnoj formulaciji primenom HPLC-DAD metode, optimizovani uslovi merenja su bili sledeći: mobilna faza - fosfatni pufer pH 8,0 i acetonitril u odnosu 45%:55% (V/V), protok - 0,2 mL min⁻¹, injektovana zapremina uzorka - 20,0 μL , temperatura kolone - 25 °C i radna talasna dužina detektora - 205 nm sa referentnom talasnom dužinom 500 nm. Uzorci su pre merenja filtrirani kroz hidrofilni filter (Millex, 0,22 μm). GD i GO vrednosti su računane kao tri puta odnosno deset puta odnos EES signala - šum bazne linije u neposrednoj blizini pika EES.

3.3.3. ¹H NMR spektroskopija

¹H NMR merenja su vršena uz potiskivanje signala vode (presaturacija) [159]. U slučaju EES-a uzorci su pripremljeni u Briton-Robinsonovom puferu (pH 6,4; 6,8; 7,0; 7,5 i 8,0) uz dodatak odgovarajuće količine D₂O sa 1% w/w DSS i metanola. DSS je korišćen kao interni standard za kalibraciju. U svim pripremljenim uzorcima koncentracija EES-a je bila 24,0 mg mL⁻¹. Uzorci azitromicina su pripremljeni na istovetan način s tim da su pH vrednosti 6,8; 7,0; 7,2; 7,4; 8,0; 8,2; 8,4; 8,6 i 8,8 i koncentracija azitromicina u svim uzorcima je bila 23,5 mg mL⁻¹. U slučaju klaritromicina i roksitromicina postupak pripreme uzoraka je analogan pripremi azitromicina ali pri sledećim pH vrednostima za pripremu uzoraka klaritromicina: pH 6,0; 7,2; 7,4; 8,0; 8,4; 8,7; 8,9; 9,2 i 10,0 a za roksitromicin: 6,0; 7,0; 7,4; 8,0; 8,2; 8,4; 9,0; 10,5 i 11,0. U

slučaju azitromicina, klaritromicina i roksitromicina vršena je eksterna kalibracija odnosno uzorci su pripremljeni sa D₂O bez DSS-a. Uzorci sva četiri makrolidna antibiotika pripremljeni su iz njihovih komercijalnih formulacija i profiltrirani su kroz hidrofilni filter (Millex, 0,22 μm). Parametri ¹H NMR merenja u slučaju EES-a su sledeći: standardni Bruker pulsni program (zgpr) je korišćen za potiskivanje pika vode, širina spektralnog prozora = 4800 Hz, dužina 90° pulsa = 11,75 μs, broj ponavljanja: 128, temperatura merenja 298 K – za EES dok su parametri prilikom snimanja ¹H NMR spektara komercijalnih formulacija azitromicina, klaritromicina i roksitromicina merni parametri su bili sledeći: standardni Bruker pulsni program (zgpr) je korišćen za potiskivanje pika vode, širina spektralnog prozora = 6000 Hz, dužina 90° pulsa = 15,00 μs, broj ponavljanja: 32, temperatura merenja 298 K.

Za praćenje toka elektrolize 3-DH-DHK korišćena je ¹H NMR tehnika i merenja su vršena uz potiskivanje pika vode (presaturacija). Rastvor koji se elektrolizira uzorkovan je na početku elektrolize $t = 0$ i nakon $t = 1,0; 2,5; 4,5$ i $6,5$ h elektrolize. Parametri ¹H NMR merenja su sledeći: standardni Bruker pulsni program (zgpr) je korišćen za potiskivanje pika vode, širina spektralnog prozora = 4800 Hz, dužina 90° pulsa = 11,75 μs, broj ponavljanja: 32, temperatura merenja 298 K.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Voltametrijsko određivanje analita od farmakološkog značaja primenom obnovljive srebro-amalgam film elektrode

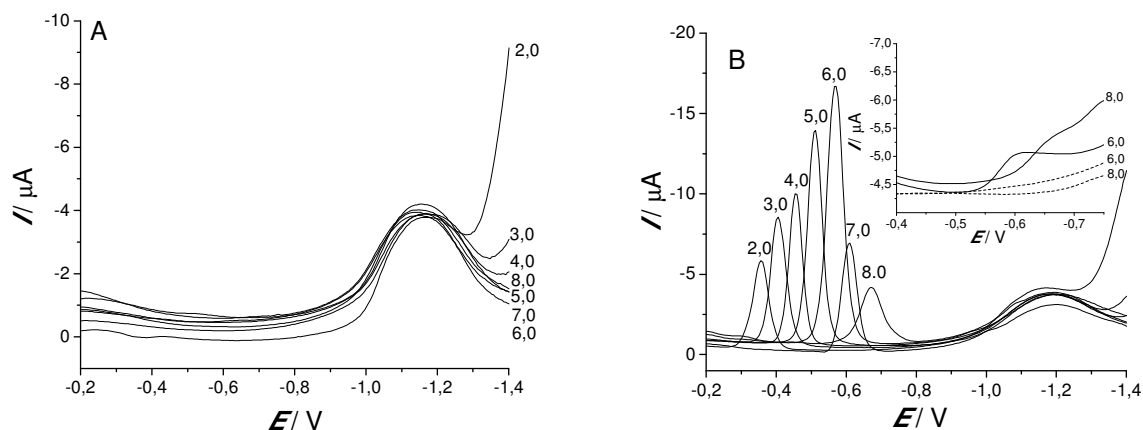
Na osnovu prethodnih istraživanja utvrđeno je da DOX i EES daju redukzione signale na živinim elektrodama [10-12,62], stoga je ispitivano voltametrijsko ponašanje DOX-a, EES-a i drugih makrolidnih antibiotika (azitromicina, klaritromicina i roksitromicina) primenom Hg(Ag)FE koja poseduje slične elektrohemijske osobine sa živinim elektrodama [94].

4.1.1. Voltametrijsko ponašanje doksorubicina i njegovo određivanje u model rastvoru i obogaćenom uzorku humanog urina [160]

Uzimajući u obzir činjenicu da DOX u svojoj strukturi sadrži hinonsku funkcionalnu grupu koja se pokazala elektroaktivnom na Hg elektrodi [10-12,161,162] može se očekivati da će se redukcija DOX na Hg(Ag)FE odigravati na sličan način, zbog sličnog elektrohemijskog ponašanja ove dve radne elektrode.

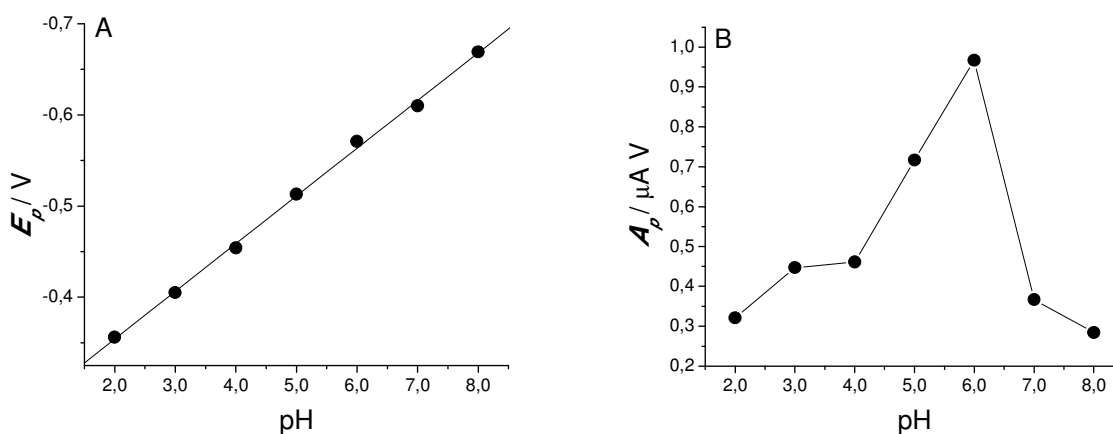
4.1.1.1. Voltametrijska karakterizacija

Na osnovu prethodnih istraživanja je uočeno i to da voltametrijsko ponašanje DOX-a primenom živinih elektroda u velikoj meri zavisi od pH vrednosti pomoćnog elektrolita [10,12,161,162]. Uzimajući ovo u obzir prvo je vršeno ispitivanje voltametrijskog ponašanja DOX-a primenom Hg(Ag)FE i SWV u prisustvu Briton-Robinsonovog pufera od pH 2,0 do pH 8,0. Na slici 26 prikazani su SW voltamogrami DOX-a snimljeni pri različitim pH vrednostima (slika 26B), kao i odgovarajuće bazne linije (slika 26A). U umetku slike 26B predstavljeni su linearno skenirajući voltamogrami (LSV) slepe probe i LSV odzivi DOX-a pri pH 6,0 i pH 8,0.



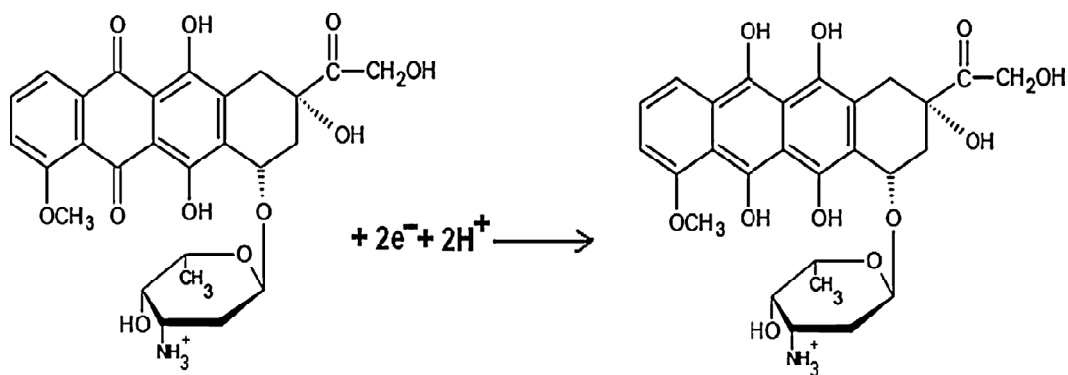
Slika 26. Uticaj pH vrednosti sredine na oblik i intenzitet signala DOX. SW voltamogrami slepih proba/bazne linije (A) i SW voltamogrami DOX pri koncentraciji $1,19 \mu\text{g mL}^{-1}$ (B). pH vrednosti sredine su naznačene pored krivi. Umetak: LSV odzivi slepe probe i LSV odzivi DOX-a ($c=20,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) pri pH 6,0 i pH 8,0

Na voltamogramu DOX-a, javlja se jedan jasno definisan redukcionni signal u ispitivanoj oblasti potencijala, čiji oblik i intenzitet u velikoj meri zavisi od pH vrednosti sredine. Najintenzivniji signali javljaju se pri pH 5,0 i pH 6,0 dok pri pH 7,0 i pH 8,0 intenzitet signala naglo opada. Na slici 27 prikazane su odgovarajuće zavisnosti potencijala pika u vidu E_p (slika 27A) i površine pika u vidu A_p (slika 27B) od pH vrednosti sredine.



Slika 27. Zavisnosti položaja tj. E_p (A) i površine tj. A_p (B) signala DOX-a od pH vrednosti sredine pri koncentraciji $1,19 \mu\text{g mL}^{-1}$

Pri porastu pH vrednosti sredine pomoćnog elektrolita dolazi do pomeranja signala ka negativnijim vrednostima potencijala i položaj pika u odnosu na pH vrednost jeste linearna zavisnost koja se može opisati sledećom jednačinom $E_p = -0,249 \text{ [V]} - 0,052 \text{ [V/pH]} \times \text{pH}$ ($r = 0,999$). Na osnovu nagiba dobijene jednačine može se zaključiti da je broj izmenjenih elektrona i protona isti. **Rao i dr.** su u svom radu [162] okarakterisali mehanizam redukcije doksorubicin-hidrohlorida primenom Hg elektrode, kao reverzibilni dvoelektronski proces zasnovan na redukciji hinona do hidrohina. Hronokulonometrijska merenja od strane **Guin i dr.** pokazuju da su dva elektrona uključena u redukciju 1,4-dihidroksi-9,10-antrahinon-2-sulfonata primenom Hg elektrode [15]. Pored toga, **He i dr.** su intenzivno proučavali reakciju para-benzohinona, koji sadrži sličan elektroaktivni centar i došli su do zaključka da se proces redukcije odvija u dva elektron-transfer koraka u kojem su uključeni i protoni [163]. Na osnovu svega navedenog redukcija DOX-a na Hg(Ag)FE elektrodi, pri pH 6,0 može se opisati reakcijom prikazanom na slici 28.



Slika 28. Mehanizam redukcije DOX-a na Hg(Ag)FE pri pH 6,0

Na osnovu intenziteta i oblika signala DOX-a kao optimalna pH vrednost za dalja određivanja ciljnog analita primenom SWV i SW-AdSV odabrana je pH 6,0. Optimalni operativni parametri SWV metode za dalje eksperimente jesu: amplituda $E_a = 20 \text{ mV}$, potencijalski korak $E = 5 \text{ mV}$ i frekvencija $f = 50 \text{ Hz}$.

Treba napomenuti da se primenom optimizovane SWV metode i Hg(Ag)FE kao radne elektrode, na baznim linijama snimljenim pri različitim pH vrednostima sredine (slika 26A), uočava redukcionni pik na potencijalu oko $-1,2 \text{ V}$ [93,101,102], ali kao što se sa slike 26B može

videti, ovaj pik se nalazi daleko od redukcionog signala koji potiče od DOX-a tako da ne ometa njegovo određivanje.

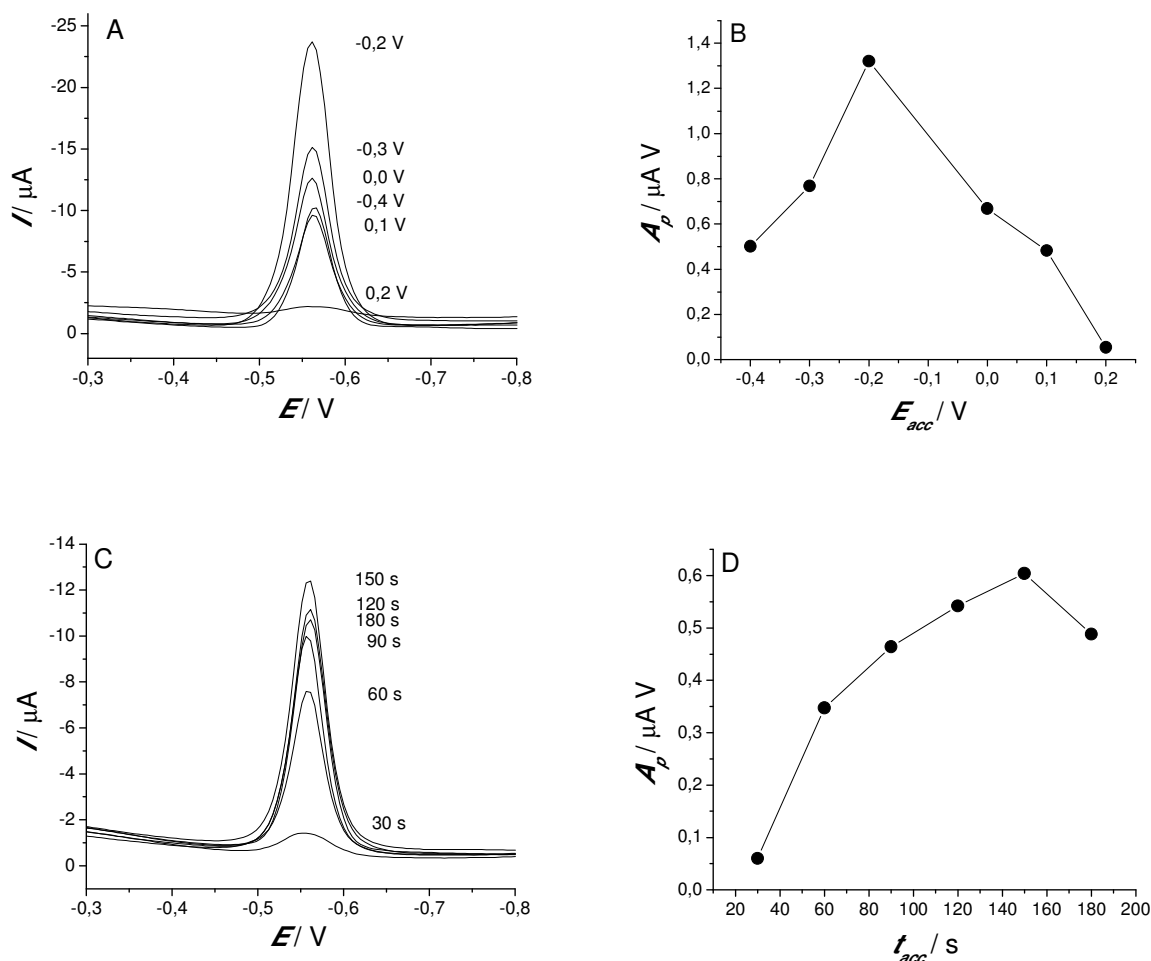
4.1.1.2. Voltametrijsko određivanje u model rastvoru

Imajući u vidu da se DOX adsorbuje na Hg elektrodi [11,12], isti proces je proučavan primenom Hg(Ag)FE elektrode, u cilju povećanja osetljivosti direktne SWV metode, razvijanjem SW-AdSV metode za određivanje DOX-a. Za tu svrhu optimizovani su potencijal i vreme akumulacije/adsorpcije (E_{acc} i t_{acc}), kao ključni parametri adsorptivnih metoda.

SW-AdSV voltamogrami dobijeni pri koncentraciji DOX-a od $74,9 \text{ ng mL}^{-1}$ pri različitim potencijalima akumulacije u opsegu od $-0,40$ do $0,20 \text{ V}$, kao i odgovarajuća zavisnost A_p - E_{acc} prikazani su na slici 29A i B. Značajan porast intenziteta/površine signala uočen je pri $E_{acc} = -0,20 \text{ V}$.

Uočava se da je adsorpcija DOX-a na površini Hg(Ag)FE više izražena na $-0,20 \text{ V}$ nego na $-0,40 \text{ V}$. Radi objašnjenja ove pojave neophodno je razmotriti raspodelu elektronske gustine molekula DOX, kao i njegovu orijentaciju u odnosu na elektrodnu površinu uzimajući u obzir prirodu ciljnog analita, koji u svojoj strukturi sadrži kisele fenolne grupe i baznu amino grupu, zatim lipofilnost i hidrofilitnost molekula, kao i prirodu polarizacije Hg(Ag)FE. S obzirom na činjenicu da je DOX pri pH 6,0 u svom protonovanom obliku, $pK_{k1} = 8,22$ [164] u interakciji sa površinom elektrode preovlađuje pozitivno naelektrisanje molekula, a prisutan je hidrofilni karakter antraciklinskog prstena. Ipak zapaža se da je proces adsorpcije više izražen na $-0,20 \text{ V}$ nego na $-0,40 \text{ V}$ što se može učiniti kontradiktornim. Ovo se može objasniti time da repulzivni efekat elektronskog oblaka sa parcijalnim negativnim naelektrisanjem, koji se prostire preko tri prstena, dolazi sve više do izražaja kada je elektrodna površina negativnije polarizovana.

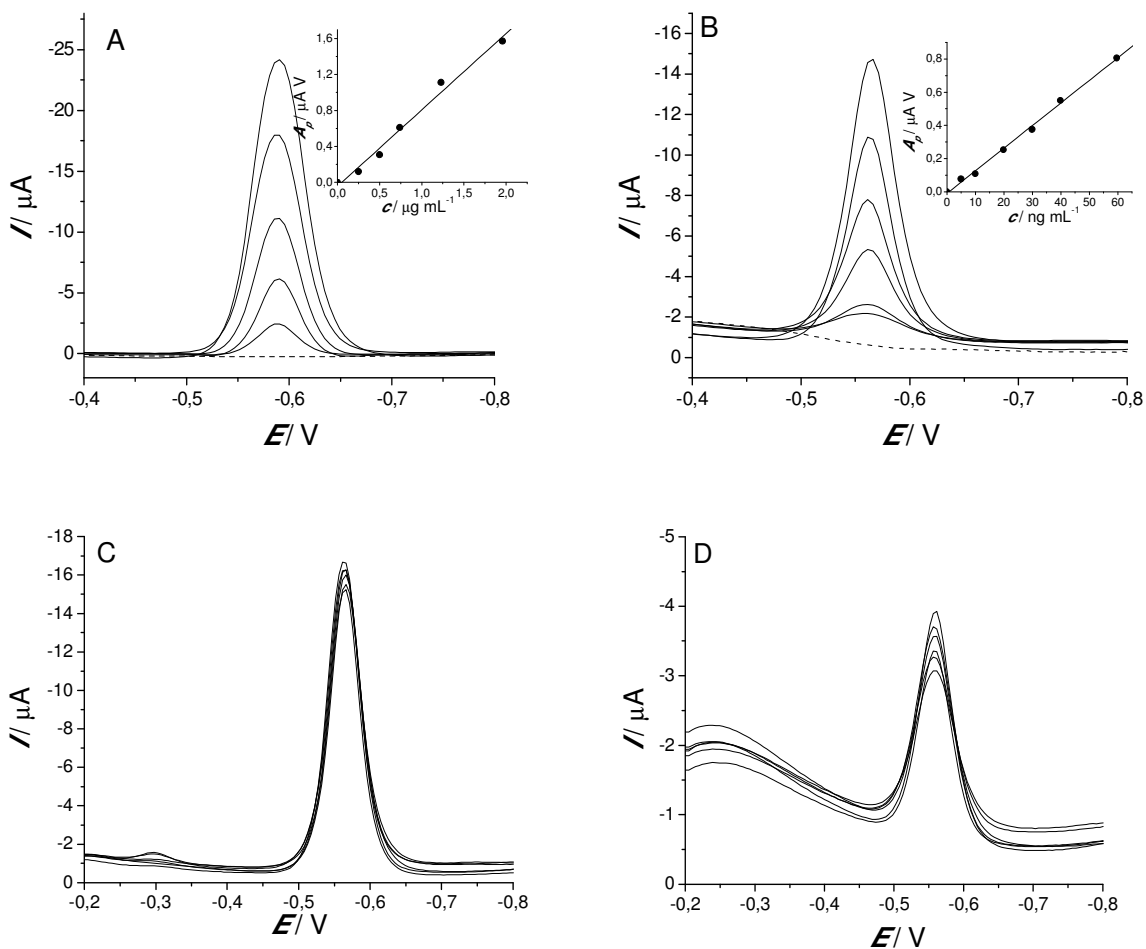
Na osnovu već ranije opisanog redukcionog mehanizma adsorbovanog ciljnog analita na površini Hg elektrode [11] koji je u saglasnosti sa redukcionim mehanizmom DOX-a na Hg(Ag)FE predstavljenog na slici 28, može se očekivati analogni mehanizam u slučaju adsorbovanog molekula DOX-a na površini Hg(Ag)FE.



Slika 29. Optimizacija parametara za SW-AdSV određivanje DOX-a pri koncentraciji $74,9 \text{ ng mL}^{-1}$ (A i B) i $44,5 \text{ ng mL}^{-1}$ (C i D) u prisustvu Briton-Robinsonovog pufera pH 6,0. Krive snimljene pri $t_{acc} = 60 \text{ s}$ i različitim vrednostima za E_{acc} (A) i pri $E_{acc} = -0,20 \text{ V}$ i različitim vrednostima za t_{acc} (C). Odgovarajuća zavisnost A_p od E_{acc} pri $t_{acc} = 60 \text{ s}$ (B) i A_p od t_{acc} pri $E_{acc} = -0,20 \text{ V}$ (D)

Optimizacija vremena akumulacije vršeno je pri koncentraciji DOX-a od $44,5 \text{ ng mL}^{-1}$. Kao što se sa slika 29C i D može videti, intenzitet/površina signala raste sa produženjem vremena akumulacije sve do $t_{acc} = 150 \text{ s}$, dok sa daljim porastom vremena akumulacije ne dolazi do porasta intenziteta signala što prati tipičan oblik krive zasićenja čime se potvrđuje adsorpcija DOX-a na površini Hg(Ag)FE. Kao optimalno vreme akumulacije odabrano je 140 s, pri kojem se postiže određivanje DOX-a u niskom koncentracionom nivou (ng mL^{-1}).

Analitička metoda određivanja DOX-a primenom SWV i SW-AdSV zasniva se na linearnoj korelaciji površine pika redukcije na potencijalu $-0,57$ V u odnosu na ZKE i koncentracije ispitivanog analita (slika 30A i B, umetci).



Slika 30. SWV (A i C) i SW-AdSV (B i D, $E_{acc} = -0,20$ V, $t_{acc} = 140$ s) krive snimljene primenom Hg(Ag)FE pri različitim koncentracijama DOX-a (A i B) u prisustvu Briton-Robinsonovog pufera pH 6,0. Umetci (A i B) predstavljaju zavisnost A_p od koncentracije DOX-a. Reproductivnost analitičkog signala primenom SWV pri koncentraciji $0,85 \mu\text{g mL}^{-1}$ (C) i primenom SW-AdSV pri koncentraciji $13,4 \text{ ng mL}^{-1}$ (D)

Važniji parametri razvijenih metoda određivanja DOX-a primenom SWV i SW-AdSV prikazani su u tabeli 3. Granica detekcije i granica određivanja primenom optimizovane SW-AdSV metode su približno 50 puta niže u odnosu na primenu optimizovane SWV metode. Reproductivnost analitičkog signala ispitana je na osnovu šest uzastopnih merenja primenom

SWV (slika 30C) i SW-AdSV (slika 30D) pri koncentraciji DOX-a $0,85 \mu\text{g mL}^{-1}$ odnosno $13,4 \text{ ng mL}^{-1}$. RSD u slučaju primene SWV iznosi 3,7% dok u slučaju primene SW-AdSV 4,1%.

Tabela 3. Analitički parametri određivanja DOX-a primenom SWV i SW-AdSV, $n=6$ (n - broj merenja), r - koeficijent korelacije

Parametar	Hg(Ag)FE/SWV	Hg(Ag)FE/SW-AdSV
Linearni opseg	0,25-1,96 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	4,99-59,6 (ng mL^{-1})
Odsečak	-0,044 ($\mu\text{A}\cdot\text{V}$)	-9,392 ($\text{nA}\cdot\text{V}$)
Nagib	0,850 ($\mu\text{A}\cdot\text{V}/(\mu\text{g mL}^{-1})$)	13,609 ($\text{nA}\cdot\text{V}/(\text{ng mL}^{-1})$)
r	0,993	0,998
GD	0,08 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,50 (ng mL^{-1})
GO	0,25 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	4,99 (ng mL^{-1})
RSD (%)	3,7	4,1

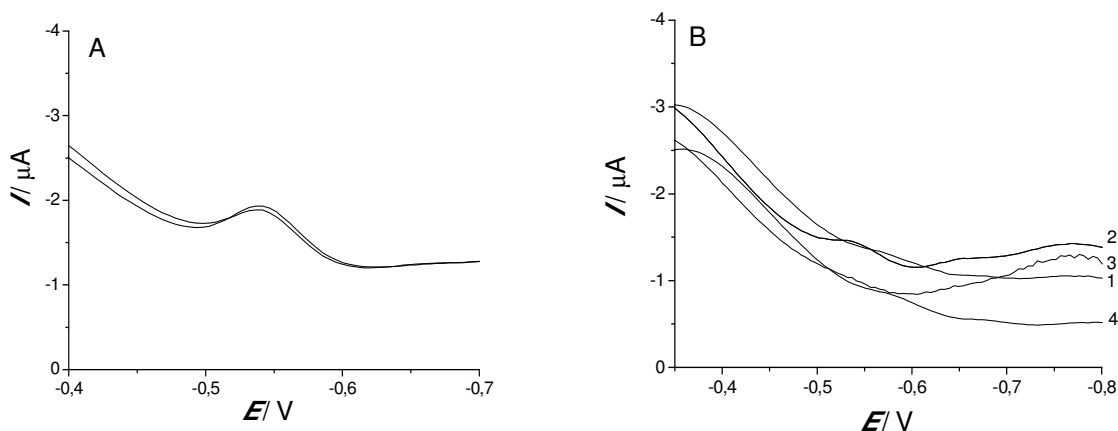
Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su Hg(Ag)FE i SW-AdSV metoda pogodna za određivanje DOX-a u ng mL^{-1} koncentracionoj oblasti.

Zahvaljujući adsorpciji DOX-a na površini Hg(Ag)FE, postiže se slična osetljivost određivanja kao i primenom Hg elektrode, s tim da se Hg(Ag)FE smatra primenljivijom u praksi zato što umesto visoko toksične žive sadrži amalgam. U poređenju sa ugljeničnim elektrodama, koje takođe pokazuju visoku osetljivost prilikom određivanja DOX-a, Hg(Ag)FE se pokazala pogodnijom zato što se obnavljanje površine ove elektrode odvija znatno brže i jednostavnije nego u slučaju kod ugljeničnih elektroda. Sve ove činjenice ukazuju na to da je razvijena metoda jednostavna, visoko osetljiva i ekonomski isplativija za određivanje DOX-a.

4.1.1.3. Voltametrijsko određivanje u obogaćenom uzorku humanog urina

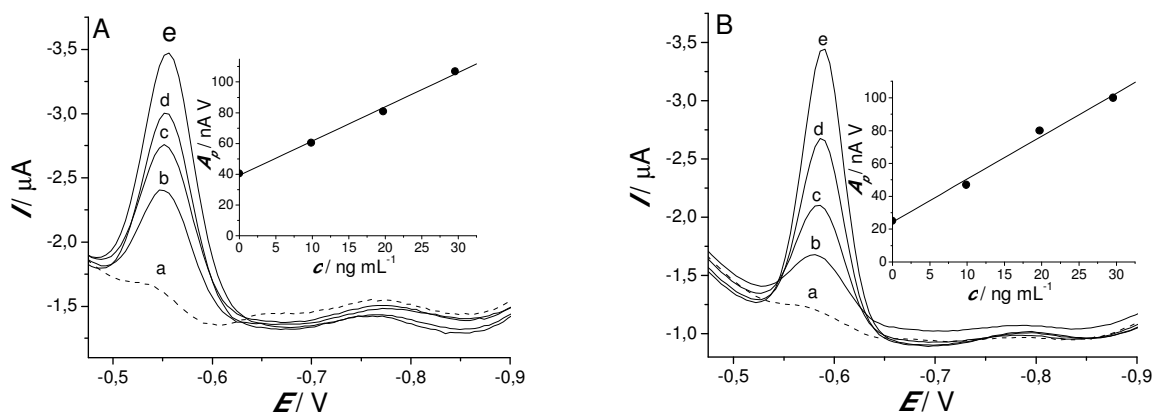
Prvo je ispitivano voltametrijsko ponašanje uzorka urina u ospegu potencijala od -0,20 do -0,80 V pri pH 6,0 primenom optimizovane SW-AdSV metode. Različiti alikvoti uzorka urina su dodavani u pomoćni elektrolit, počevši od $100,0 \mu\text{L}$ do $1,0 \text{ mL}$. Kao što se sa slike može videti (slika 31A) na SW-AdS voltamogramima snimljenih nakon dodatka $200,0 \mu\text{L}$ uzorka urina u pomoćni elektrolit (što predstavlja baznu liniju) uočava se pik na potencijalu -0,55 V. Ovaj pik

se javlja pri dodacima uzorka urina počevši od 150,0 μL pa sve do 1,0 mL. U slučaju dodatka 100,0 μL uzorka urina, dobijeni različitih dana, (slika 31B) bazne linije (krive 1, 3 i 4) ne uočava se prisustvo pomenutog pika u signifikantnoj meri u kojoj bi eventualno mogao da ometa određivanje DOX-a. Treba napomenuti da je npr. u slučaju krive 2 uočen pik na potencijalu na kojem se javlja i analitički signal DOX-a, ali zbog intenziteta i oblika pik na baznoj liniji ne utiče značajno na određivanje ispitivanog analita.



Slika 31. SW-AdS voltamogrami snimljeni pri dva različita dodatka uzorka ljudskog urina u 10,0 mL Briton-Robinsonovog pufera pH 6,0: 200,0 μL (A) i 100,0 μL (B). Krive 1-4 dobijene su prilikom dnevnog praćenja uzorka urina

Ispitivanje primenljivost i Hg(Ag)FE i optimizovane SW-AdSV metode za određivanje DOX-a u uzorku urina vršeno je metodom standardnog dodatka, kako bi se eliminisao uticaj matriksa na smanjenje intenziteta signala, koje se uočava i pri dodatku 100,0 μL netretiranog uzorka urina. Prilikom određivanja DOX-a u uzorku urina, korišćeni su uzorci urina uzorkovani tokom različitih dana. Takvi uzorci obogaćeni su sa dve različite koncentracije DOX-a 9,89 (uzorci dobijeni u toku tri dana) ili 19,8 ng mL^{-1} i u slučaju obe ispitane koncentracije, merenja su vršena u triplikatu. Nakon obogaćivanja uzorka urina i snimanja SW-AdSV voltamograma, dodavana su tri standardna dodatka DOX-a (10,0 μL) tako da su krajnje koncentracije DOX-a u voltometrijskoj ćeliji bile u opsegu 9,88-29,6 ng mL^{-1} . SW-AdS voltamogrami određivanja DOX-a u uzorku urina prikazani su na slici 32, zajedno sa odgovarajućim zavisnostima A_p od koncentracije DOX-a prikazanih kao umetci slika.



Slika 32. SW-AdS voltamogrami obogaćenog uzorka urina (kriva b) sa različitim koncentracijama DOX-a ($19,8 \text{ ng mL}^{-1}$ (A) i $9,89 \text{ ng mL}^{-1}$ (B)) i sukcesivnih standardnih dodataka DOX-a (krive c, d i e: $9,88$; $19,7$ i $29,6 \text{ ng mL}^{-1}$). Krive a predstavljaju čist uzorak urina. Odgovarajuće analitičke prave prikazane su kao umetak slika

Analitičke prave prikazane kao umetak slika mogu se opisati sledećim jednačinama: $A_p = 39,14 \text{ [nA V]} + 2,23 \text{ [nA V/ng mL}^{-1}] \times c$, $r = 0,998$ i $A_p = 24,28 \text{ [nA V]} + 2,62 \text{ [nA V/ng mL}^{-1}] \times c$, $r = 0,996$ u slučaju više (slika 32A) i niže koncentracije (slika 32B) dodatog DOX-a u uzorak urina.

Dobijene vrednosti određivanja DOX-a u uzorku urina su između $9,51$ i $9,76 \text{ ng mL}^{-1}$, u slučaju niže koncentracije dodatog DOX-a, što je veoma blisko dodatnoj koncentraciji, a isto tako dobro slaganje se dobija i u slučaju više koncentracije dodatog DOX-a.

Izračunata RSD za određivanje DOX-a u uzorcima urina je između $4,7\%$ i $5,8\%$. Prinos je u rasponu između $98,7\%$ i $96,2\%$ u slučaju nižeg dodatka i $89,0\%$ u slučaju veće dodatke koncentracije DOX-a.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se Hg(Ag)FE kao radna elektroda i optimizovana SW-AdSV metoda mogu primeniti za određivanje DOX-a u obogaćenim uzorcima urina. Optimizacijom količine uzorka ljudskog urina i primenom metode standardnog dodatka uspešno se smanjuje efekat matriksa i postignuta je visoka osetljivost razvijene metode za određivanje DOX-a. Dalja optimizacija ekstrakcije može da dovede do dodatnog poboljšanja osetljivosti metode.

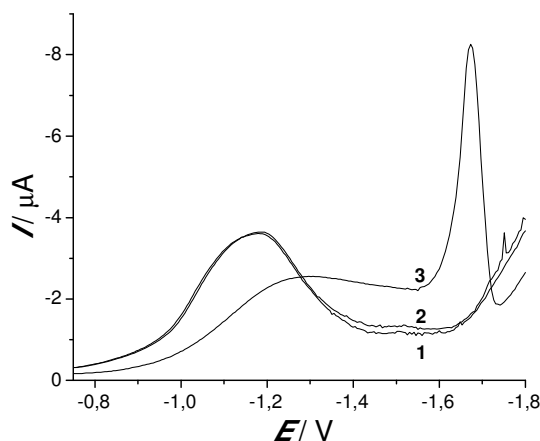
4.1.2. Voltametrijsko ponašanje eritromicin-etilsukcinata i njegovo određivanje u model rastvoru i odabranim uzorcima [165]

4.1.2.1. Voltametrijska karakterizacija

Vršena je voltametrijska karakterizacija EES primenom SWV i CV uz primenu Hg(Ag)FE kao radne elektrode u prisustvu Briton-Robinsonovog pufera u svojstvu pomoćnog elektrolita (pH 4,0-9,0).

U ispitivanoj veoma negativnoj oblasti potencijala od -0,75 V do -1,80 V u odnosu na ZKE, uočava se prisustvo redukcionog signala pri pH vrednostima od pH 5,0 do pH 9,0. Redukcioni signal se ne prepoznaje pri pH 4,0 verovatno zbog preklapanja signala sa izdvajanjem vodonika pri pomenutoj pH vrednosti sredine.

Uzimajući u obzir da je eritromicin u esterifikovanom obliku, kao eritromicin-etilsukcinat, vršena je karakterizacija ćilibarne kiseline primenom SWV, pri pH 7,0, u obliku sukcinata, pri istim eksperimentalnim uslovima kao što je to slučaj pri karakterizaciji EES, što je prikazano na slici 33.

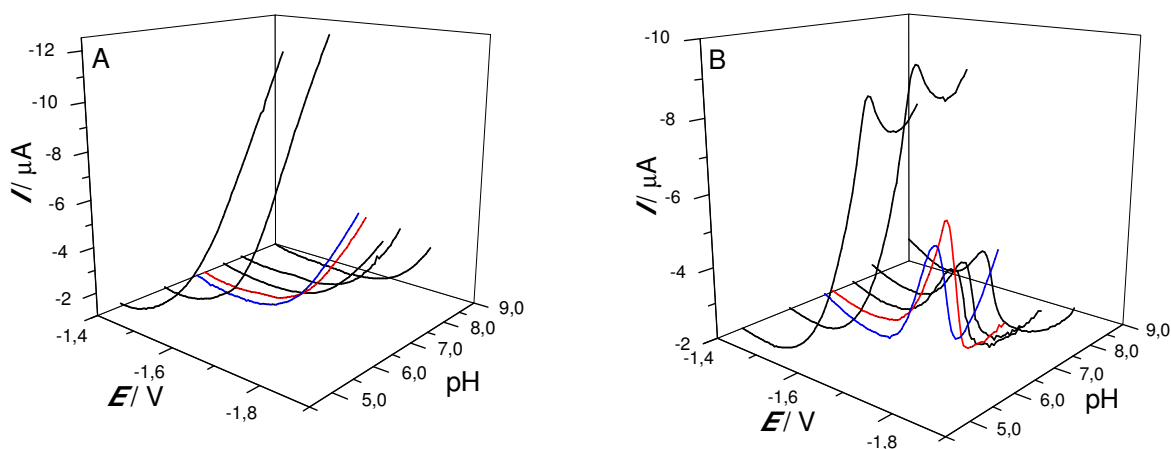


Slika 33. SW voltamogrami: 1) Briton-Robinson pomoćni elektrolit, pH 7,0; 2) kao 1 + 30,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ sukcinata (dodatog u formi sukcinatne kiseline); 3) kao 1 + 28,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ EES

Kao što se slike 33 može videti, dodatkom 30,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ćilibarne kiseline (kriva 2) u pomoćni elektrolit, nije došlo do promena na baznoj liniji (kriva 1). Takođe, uočava se prisustvo

redukcionog pika na oba voltamograma sa maksimumom pika na oko $-1,2$ V. Sličan pik se uočavao i ranije u acetatnom puferu pri pH 4,5 i fosfatnom puferu pri pH 7,5 i prisustvo ovog pika je karakteristično za Hg(Ag)FE elektrodu u ovim pomoćnim elektrolitima [101]. Nakon dodatka EES u pomoćni elektrolit uočava se redukциони pik na potencijalu $-1,67$ V i ovaj pik je razdvojen od pika koji se inače uočava na baznoj liniji.

Na slici 34 prikazan je uticaj pH vrednosti sredine na SWV odziv Hg(Ag)FE u odsustvu (slika 34A) i prisustvu EES-a (slika 34B) kao ciljnog analita. pH vrednost pomoćnog elektrolita u velikoj meri utiče na oblik i intenzitet redukcionog signala EES primenom SWV. Redukcioni pik se javlja tek pri pH 5,0 i višim pH vrednostima i može se pretpostaviti da se pri nižim pH vrednostima redukциони pik ispitivanog analita preklapa sa strujom redukcije hidronijumovih jona iz osnovnog elektrolita.

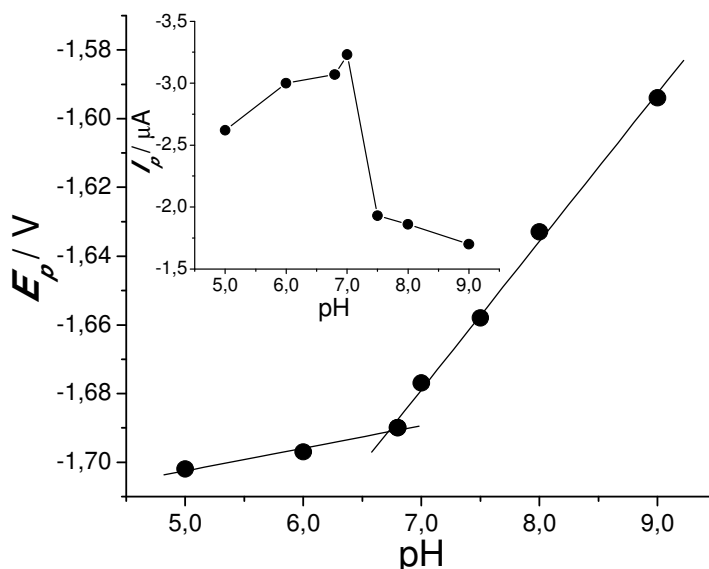


Slika 34. SW voltamogrami snimljeni primenom Hg(Ag)FE: A) Britton-Robinson pomoćni elektrolit od pH 5,0 do pH 9,0 i B) isti rastvor pufera u prisustvu $15,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ EES

Kao što je prikazano na slici 34, redukциони pik EES-a ($E_p \approx -1,7$ V) pri pH 5,0 i 6,0 je slabo izražen zbog prisutnog preklapanja sa signalom izdvajanja vodonika. Pri višim pH vrednostima pomoćnog elektrolita, između pH 6,8 i 9,0, širi se potencijalski prozor do $-1,75$ V što omogućava zapažanje jasno definisanog redukcionog pika ispitivanog analita u prilično negativnoj oblasti potencijala. Povećanjem pH vrednosti sredine od neutralne ka baznoj dolazi do smanjenja intenziteta stuje pika, tako da je intenzitet redukcionog pika EES-a pri pH 7,5 upola manji u odnosu na intenzitet pri pH 7,0. U pogledu oblika i intenziteta redukcionog pika

pri pH 6,8 i 7,0 pik je u neutralnoj sredini pomeren za 20 mV pozitivnije u odnosu na položaj pika pri pH 6,8 i potencijalski prozor je pri pH 7,0 širi za otprilike 20 mV. To je rezultiralo pogodnijem obliku redukcionog pika EES pri pH 7,0, za analitičke svrhe.

Pri povećanju pH vrednosti dolazi do pomeranja položaja pika EES ka pozitivnijim vrednostima potencijala od -1,70 do -1,59 V što se može videti sa slike 35, a što je u skladu sa ranije opisanim ponašanjem EES primenom Hg elektrode [166].

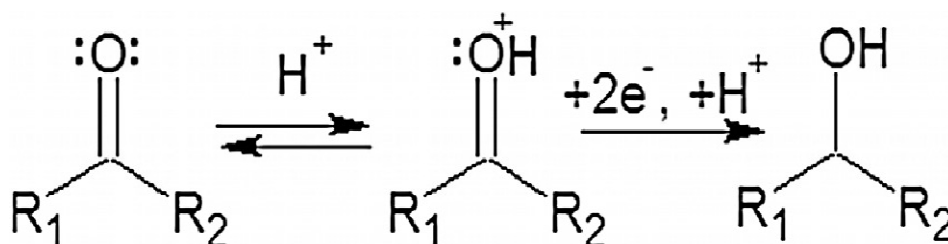


Slika 35. E_p -pH i I_p -pH (umetak) zavisnosti za EES ($c = 15,6 \mu\text{g mL}^{-1}$) u Briton-Robinson pomoćnom elektrolitu od pH 5,0 do 9,0

Pri pH vrednosti blizu 7,0 dolazi do promene nagiba zavisnosti E_p -pH i stoga se ova zavisnost može opisati na osnovu dve jednačine: $E_p = -1,735 \text{ [V]} + 0,0066 \text{ [V/pH]} \times \text{pH}$ ($r = 0,987$) između pH 5,0 i 6,8 i $E_p = -1,981 \text{ [V]} + 0,043 \text{ [V/pH]} \times \text{pH}$ ($r = 0,998$) između pH 6,8 i 9,0. Analogni rezultati su dobijeni i primenom KŽE u fosfatnom puferu između pH 6,83 i 9,34 [166] gde je nagib zavisnosti E_p -pH 0,04246 koji je u punoj saglasnosti sa analognom korelacijom između pH 6,8 i 9,0 primenom Hg(Ag)FE. Kako se može videti iz I_p -pH zavisnosti (umetak slike 35) intenzitet redukcionog pika EES-a značajno opada sa porastom pH vrednosti pomoćnog elektrolita između pH 7,0 i 9,0. Zbog preklapanja redukcionog signala ispitivanog

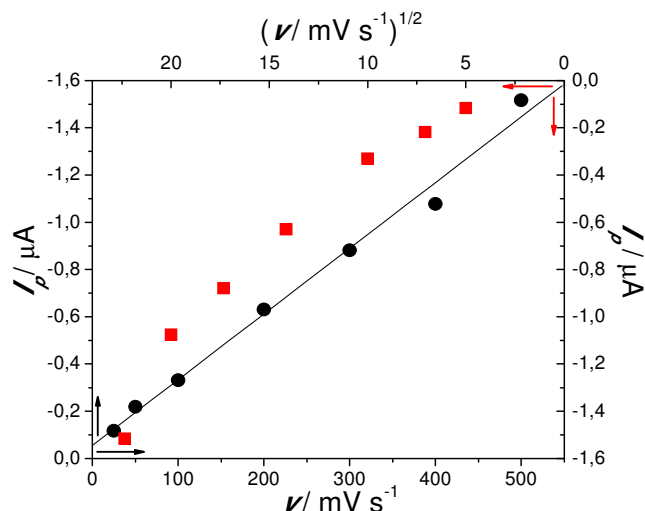
analita sa izdvajanjem vodonika u kiseljoj sredini, obrazuje se asimetričan redukcionni signal EES-a između pH 5,0 i 6,0 zbog čega nije lako odrediti intenzitet struje maksimuma. Na osnovu svega gore navedenog može se zaključiti da protoni učestvuju u redukcionom mehanizmu. Kao optimalna pH vrednost odabrana je pH 7,0 (E_p analitičkog signala je -1,67 V u odnosu na ZKE) uzimajući u obzir simetriju voltametrijske krive i intenzitet analitičkog signala.

Na osnovu literaturnog podataka o opštoj šemi redukcije keto grupe [167] i uzimajući u obzir da je broj izmenjenih protona i elektrona isti na osnovu vrednosti nagiba zavisnosti E_p -pH između pH 6,8 i 9,0 koji je blizu očekivane teorijske vrednosti od 59 mV/pH [168], može se predložiti elektrohemijski mehanizam redukcije ispitivanog analita pri pH 7,0 kako je prikazano na slici 36.



Slika 36. Mogući mehanizam redukcije EES-a pri pH 7,0

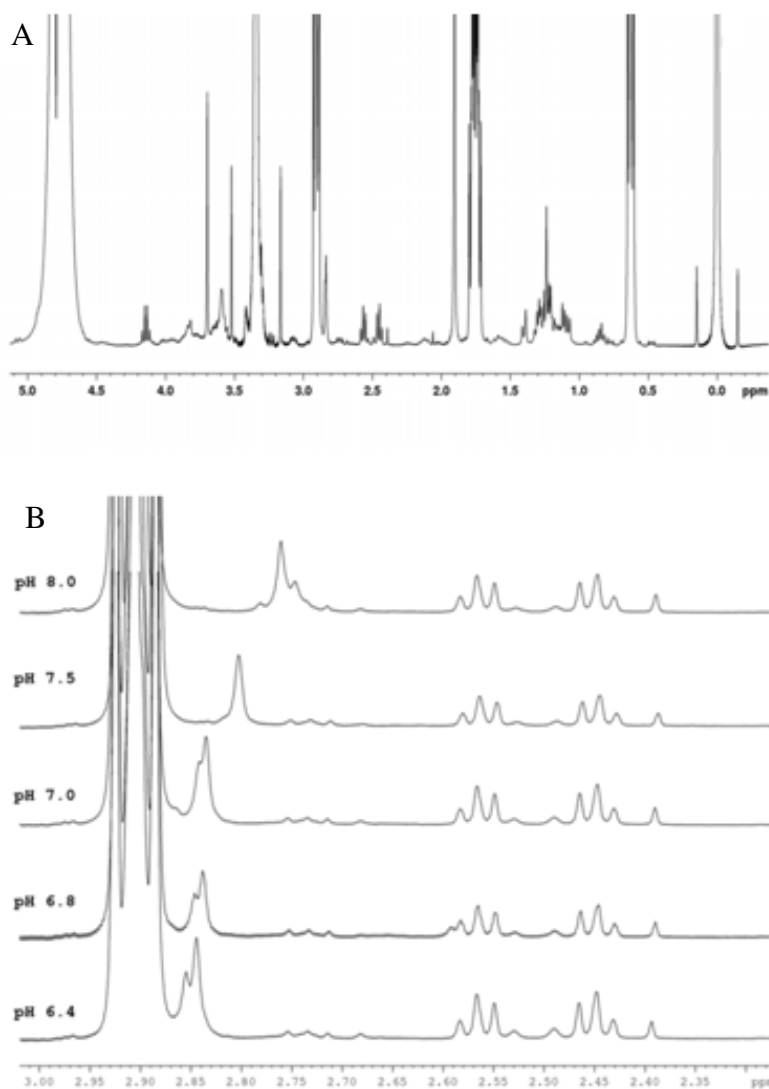
Ciklični voltamogrami snimani su u cilju ispitivanja moguće adsorpcije EES-a na površinu Hg(Ag)FE. Voltamogrami su snimani u opsegu potencijala od -0,75 do -1,80 V pri brzini skeniranja od 0,025 do 0,50 V s⁻¹. Na cikličnim voltamogramima uočava se samo jedan ireverzibilan redukcionni pik EES-a pri svim brzinama skeniranja. Zbog linearne zavisnosti intenziteta struje pika ispitivanog analita od brzine skeniranja potencijala (v) može se reći da je proces kontrolisan adsorpcijom. Dobijena linearna zavisnost se može opisati sledećom jednačinom $I_p = -0,0558 [\mu\text{A}] - 0,00278 [\mu\text{A}/(\text{mV s}^{-1})] \times v$ ($r = -0,995$), i prikazana je na slici 37 zajedno sa dobijenim rezultatima zavisnosti I_p -kvadratni koren brzine skeniranja potencijala ($v^{1/2}$).



Slika 37. Linearna zavisnost intenziteta struje redukcionog pika (I_p) EES od v i ilustrativni prikaz dobijenih rezultata u slučaju zavisnosti $I_p-v^{1/2}$. Eksperimentalni uslovi: pH 7,0; v od 0,025 V s^{-1} do 0,50 V s^{-1}

Na osnovu svega navedenog može se pretpostaviti da se pri pH 7,0 molekul EES adsorbuje na površinu Hg(Ag)FE. Pri pH vrednostima bliskim 7,0 verovatno je EES molekul u svom protonovanom obliku preko tercijarne amino grupe ($pK_k = 7,1$ [169]) i adsorpcija ispitivanog analita može biti podržana od strane pozitivno naelektrisanog molekula i negativno polarizovane radne elektrode. U blago alkalnoj sredini pri pH 7,5 i pri višim pH vrednostima EES se uglavno nalazi u neutralnoj formi, što dovodi do značajno manjeg afiniteta molekula prema negativno polarizovanoj elektrodi.

Da bi se dobio bolji uvid u uticaj pH vrednosti sredine na proces adsorpcije EES-a na Hg(Ag)FE rađena su i ^1H NMR merenja kako bi se ispitala moguća protonacija tercijarne amino grupe EES molekula pri pomenutim pH vrednostima, pri čemu je praćeno hemijsko pomeranje protona metil-grupa na pomenutoj amino grupi. ^1H NMR spektar EES-a iz njegove farmaceutske formulacije pri pH 7,0, prikazan je na slici 38A, a uvećani deo spektra sa signalima pomenutih metil-grupa pri različitim pH vrednostima od pH 6,4 do pH 8,0 prikazani su na slici 38B. Prilikom pripreme uzoraka za ^1H NMR merenja optimizovan je sadržaj metanola u osnovnom rastvoru, jer je uočeno da veći sadržaj metanola prekriva signale protona iz metil-grupe na tercijernom azotu.



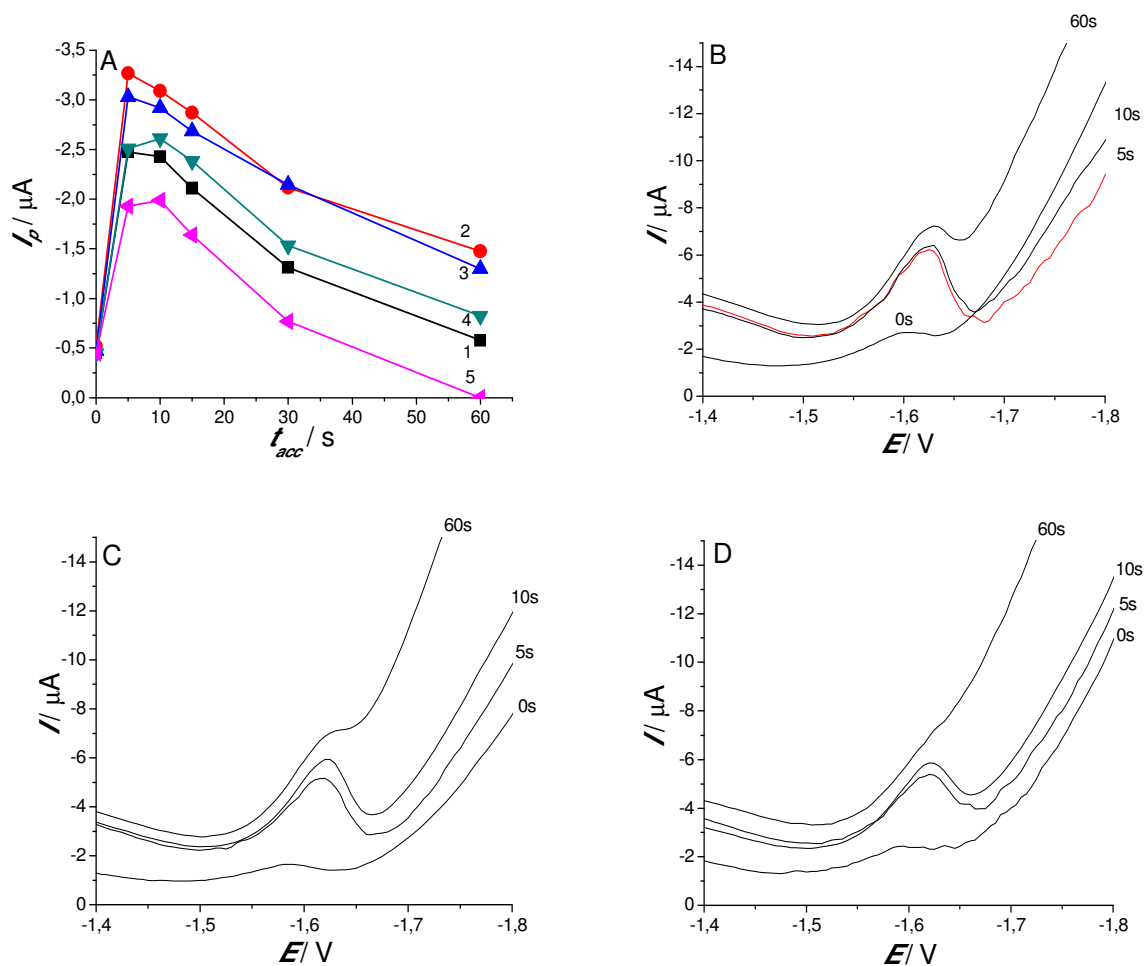
Slika 38. ^1H NMR spektri EES-a pri različitim pH vrednostima Briton-Robinsonovog pufera sa D_2O : A) ^1H NMR spektar EES-a sa D_2O (koji sadrži MeOH i DSS) pri pH 7,0; B) izdvojeni signali za N,N-dimetil protone pri pH 6,4, 6,8, 7,0, 7,5 i 8,0

U slučaju tercijarne amino grupe protoni od dve metil-grupe imaju kompleksnu i u nekim slučajevima preklapajuću formu signala i imaju signifikantno različita hemijska pomeranja kada je u pitanju protonovana/pozitivno naelektrisana i deprotonovana/nenaelektrisana forma atoma azota. U slučaju pH 6,4, 6,8 i 7,0 hemijska pomeranja za najizraženiji maksimum signala su sledeća: 2,84, 2,83 i 2,83 ppm (slika 38B). Različite vrednosti hemijskog pomeranja 2,80 i 2,76 ppm su uočena u slučaju pH 7,5 odnosno pH 8,0 što može biti objašnjeno činjenicom da je pri

ovakvim uslovima azot iz dimetil amino grupe pretežno u svojoj deprotonovanoj formi. U takvim slučajevima negativni induktivni efekat azota nije toliko izražen kao što je to slučaj sa protonovanom tj. pozitivno naelektrisanom formom EES-a, i shodno tome protoni metil-grupa su više "zaštićeni" što je u skladu sa pomeranjem ka nižim ppm vrednostima.

Pored odgovarajuće pH vrednosti pomoćnog elektrolita, koji uzrokuje protonaciju ispitivanog molekula, potencijal adsorpcije/akumulacije (E_{acc}) i vreme adsorpcije/akumulacije (t_{acc}) su parametri koji izrazito utiču na intenzitet analitičkog signala u slučaju SW-AdSV eksperimenata. Može se pretpostaviti da na odgovarajućoj vrednosti potencijala, karbonilna grupa velikog laktonskog prstena može biti prvi elektroaktivni centar.

Adsorptivno ponašanje ciljnog analita ispitivano je pri E_{acc} između -0,50 V i -1,50 V i pri t_{acc} od 0 do 60 s. Prilikom optimizacije E_{acc} uočeno je da je pri vrednostima između -0,50 V i -1,00 V intenzitet signala uglavnom nepromenjen, ali pri potencijalima nižim od -1,00 V intenzitet redukcionog signala se menja, naročito kada je odabrano optimalno vreme akumulacije (slika 39A). Naime, u slučaju svih ispitivanih vrednosti t_{acc} zavisno od primenjenih potencijala 5 s ili 10 s predstavljaju odgovarajuće uslove merenja. U slučaju E_{acc} od -1,00 V do -1,10 V favorizovano je kraće t_{acc} . Iako pozitivno naelektrisan EES ima veći afinitet prema negativno polarizovanoj površini elektrode, dobijeni signali ukazuju da se na takvim potencijalima, između ostalih mogućih efekata, može očekivati kompetitivno izdvajanje vodonika što uzrokuje opadanje intenziteta signala. Sa povećanjem t_{acc} , isti efekat može da rezultira u smanjenju redukcionog signala, čak i u slučaju favorizovanog E_{acc} . Odabrane voltametrijske krive dobijene primenom SWV (krive označene kao 0 s) i SW-AdSV (krive označene kao 5, 10 i 60 s) pri različitim vrednostima E_{acc} prikazane su na slici 39B-D. Crvena kriva na slici 39B predstavlja krivu dobijenu pri optimizovanim uslovima. Prikazane krive služe kao ilustracija kvalitativnog ponašanja sistema, naročito u slučaju direktne SWV jer pri ovakvim uslovima ispitivanja koncentracija EES se nalazi između GD i GO vrednosti direktne SWV metode.



Slika 39. Uticaj potencijala i vremena akumulacije na redukcioni signal EES ($c = 1,96 \mu\text{g mL}^{-1}$) u Briton-Robinsonovom pomoćnom elektrolitu pH 7,0: A) poređenje vrednosti I_p dobijene pri različitim vrednostima t_{acc} i pri odabranim vrednostima E_{acc} (1) -1,00 V, 2) -1,05 V, 3) -1,10 V, 4) -1,15 V i 5) -1,20 V) i B-D) neki ilustrativni voltametrijski signali dobijeni pri odabranom potencijalu akumulacije (odgovarajuća vremena akumulacije su označena na krivama u s) na: B) -1,05 V, C) -1,15 V i D) -1,20 V

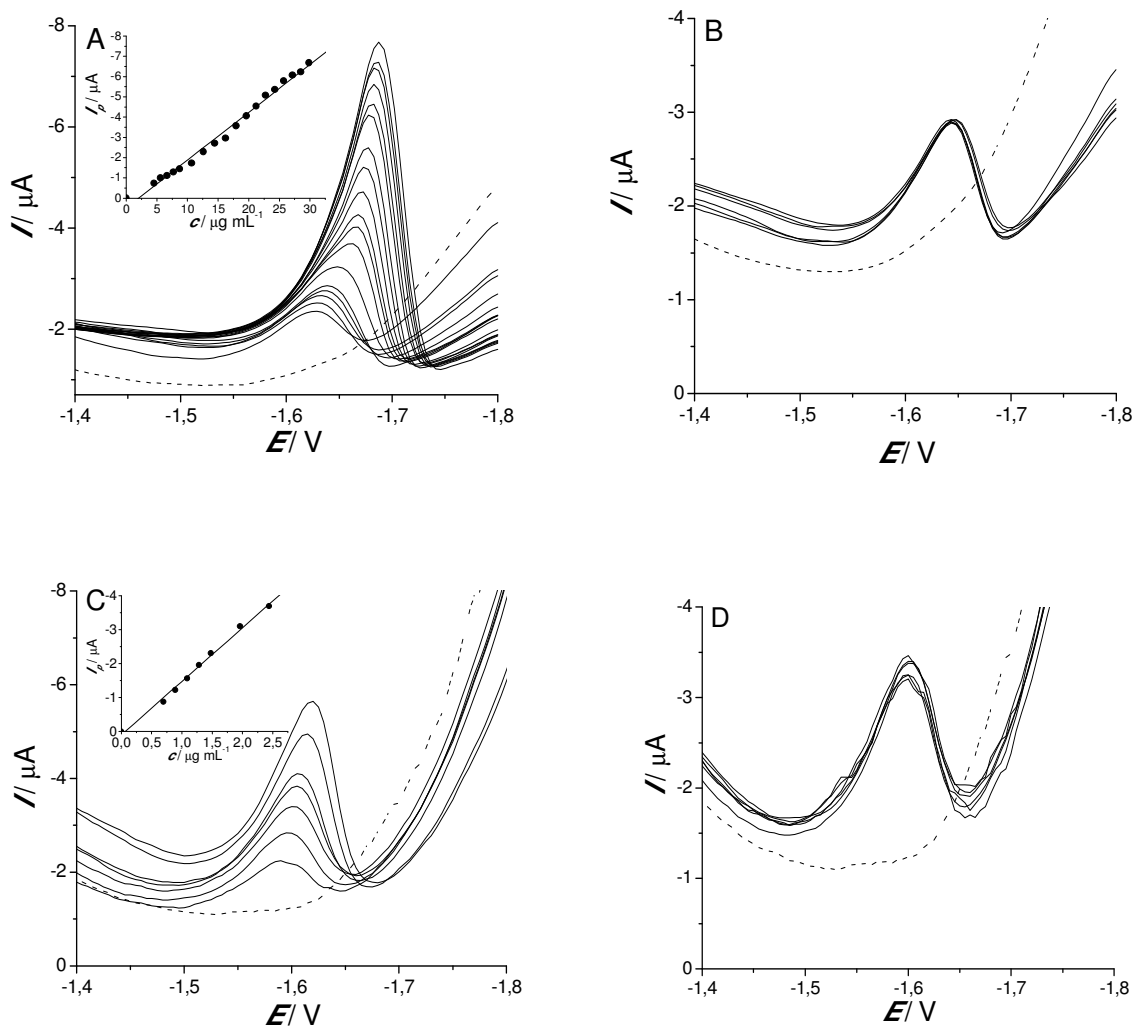
Dobijeni rezultati za adsorpciju EES-a na površini Hg(Ag)FE u skladu su sa ranije objavljenim eksperimentalnim rezultatima elektrokapilarne krive, kao i rezultatima ispitivanja uticaja katjenskog, neutralnog i anjonskog surfaktanta na redukcioni signal EES-a, pri čemu su oba seta istraživanja objavljena od strane **Zhang-a i Tuo-a** na Hg elektrodi [166] gde je obrazloženo da EES značajno smanjuje površinski napon kapi, što ukazuje na njegovu

adsorpciju, a uticaj katjonske površinske aktivne supstance na smanjenje redukcionog pika EES sugeriše da je EES molekul adsorbovan u njegovoj protonovanoj formi.

4.1.2.2. Određivanje u model rastvoru primenom voltametrijskih metoda i metode tečne hromatografije visoke efikasnosti

Nakon iznalaženja optimalne pH vrednosti pomoćnog elektrolita, pH 7,0, koja je jedan od ključnih parametara u pogledu osetljivosti metode i osnovne optimizacije SWV parametara razvijena je direktna katodna SWV analitička metoda. Pod optimalnim uslovima SWV određivanje EES-a je zasnovano na linearnoj zavisnosti između intenziteta struje pika i koncentracije ispitivanog analita od 4,53 do 29,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (slika 40A, kao umetak je prikazana linearna oblast kalibracione krive). Analitički parametri određivanja EES-a primenom SWV dati su u tabeli 4. Reproductivnost metode je procenjena na osnovu šest uzastopnih merenja pri koncentraciji EES-a 10,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (slika 40B) i RSD iznosi 0,8%.

U slučaju SW-AdSV merenja zasnovana pri optimizovanim t_{acc} i E_{acc} parametrima 5 s na potencijalu -1,05 V, analitička metoda je razvijena sa istim parametrima kao u slučaju direktne katodne SWV. Dobijeni adsorptivni stripping voltamogrami (slika 40C) pokazuju da je linearna zavisnost između koncentracije EES-a i I_p postignuta od 0,69 do 2,44 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (umetak), a pri višim koncentracijama kalibraciona kriva pokazuje zasićenje. RSD metode na osnovu šest uzastopno ponovljenih SW-AdSV merenja pri koncentraciji EES-a 1,09 $\mu\text{g mL}^{-1}$ je 1,2% (slika 40D). Zahvaljujući adsorptivnim merenjima GD metode je za oko šest puta manja u odnosu na vrednost za GD koja je dobijena direktnom SWV metodom. Odgovarajući analitički parametri dobijeni primenom SW-AdSV metode dati su u tabeli 4.



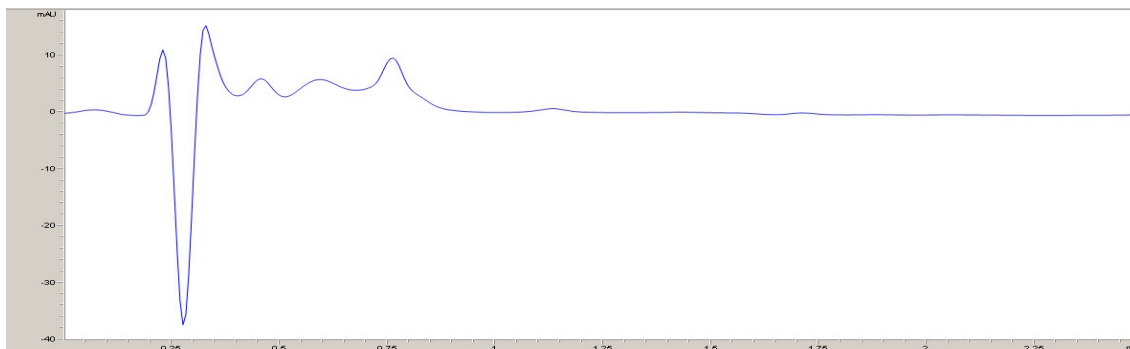
Slika 40. Karakteristike razvijenih analitičkih metoda na Hg(Ag)FE u Britton-Robinsonovom puferu pH 7,0: A) SWV signali snimljeni u koncentracionom opsegu EES-a $4,53-29,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ (umetak: odgovarajuća kalibraciona kriva), B) reproduktivnost direktnog SWV analitičkog signala za $10,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ EES-a (6 ponavljanja), C) SW-AdSV signali u koncentracionom opsegu EES-a $0,69-2,44 \mu\text{g mL}^{-1}$ (umetak: odgovarajuća kalibraciona kriva), D) reproduktivnost SW-AdSV analitičkog signala (6 ponavljanja) pri koncentraciji EES-a $1,09 \mu\text{g mL}^{-1}$. Isprekidane linije prikazuju odgovarajuće voltamograme bazne linije pri pH 7,0

Razrađena je komparativna analitička metoda zasnovana na HPLC-DAD merenjima. Neophodno je bilo prvo sprovesti optimizaciju HPLC-DAD metode, odnosno optimizovati sastav mobilne faze kao i odnos komponenata mobilne faze. Optimizacija je rađena pri protoku mobilne faze od $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ i $0,3 \text{ mL min}^{-1}$, pri čemu je injekciona petlja bila $20,0 \mu\text{L}$, a EES je

određivan pri radnim talasnim dužinama od 205 nm, 210 nm i 215 nm. Prilikom optimizacije HPLC-DAD metode korišćena je bidestilovana voda u svojstvu slepe probe i dva uzoraka standardnog rastvora EES-a koncentracije 11,8 i 58,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Prilikom optimizacije sastava mobilne faze korišćene su smeša voda : acetonitril i smeša fosfatni pufer pH 6,5 : acetonitril u odnosu komponenata 45%:55% pri protoku mobilne faze od 0,5 mL min^{-1} odnosno 0,3 mL min^{-1} . Hromatogrami dobijeni u prisustvu 11,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ EES-a nisu se signifikantno razlikovali od hromatograma slepe probe što ukazuje na to da ove dve ispitivane mobilne faze nisu pogodne za određivanje EES-a. Postoje dva moguća objašnjenja zbog kojih ne dolazi do pojave signala EES-a. Prvo je da se EES brzo eluira sa kolone pa da se njegovi signali preklapaju sa signalima koji potiču od mobilne faze, a drugo moguće objašnjenje jeste da mobilna faza ne pogoduje eluiranju EES-a, stoga on zaostaje na koloni.

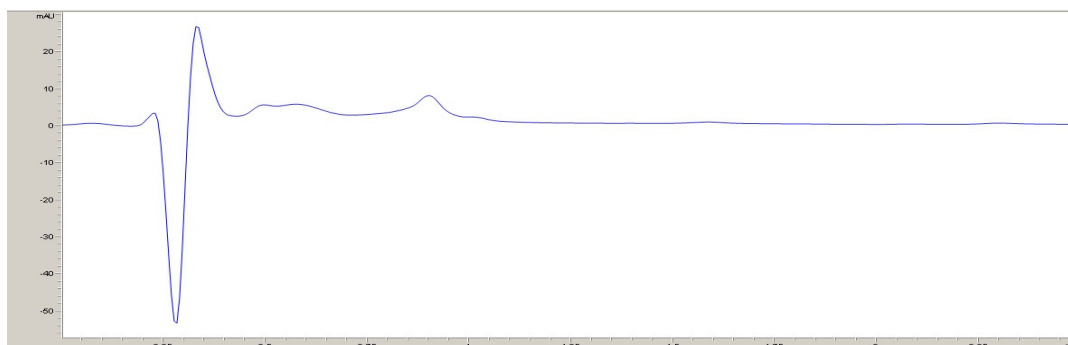
Naredna ispitivana mobilna faza sastojala se od fosfatnog pufera pH 7,5 i acetonitrila i ispitivan je uticaj odnosa komponenata mobilne faze. Protok mobilne faze je bio 0,5 mL min^{-1} , a prilikom optimizacije odnosa komponenata korišćeni su slepa proba i rastvor EES-a koncentracije 11,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Na slici 41 prikazan je hromatogram EES-a pri odnosu komponenata mobilne faze 35%:65%.



Slika 41. HPLC-DAD hromatogram standardnog rastvora EES-a koncentracije 11,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Sastav mobilne faze fosfatni pufer pH 7,5 : acetonitril (35%:65%); protok je 0,5 mL min^{-1}

Sa slike se može uočiti prisustvo EES signala na $t_r = 0,76$ min, pri čemu je površina ispod pika 30,4 mAU. Potom je povećan udeo fosfatnog pufera pH 7,5 tako da je odnos komponenata

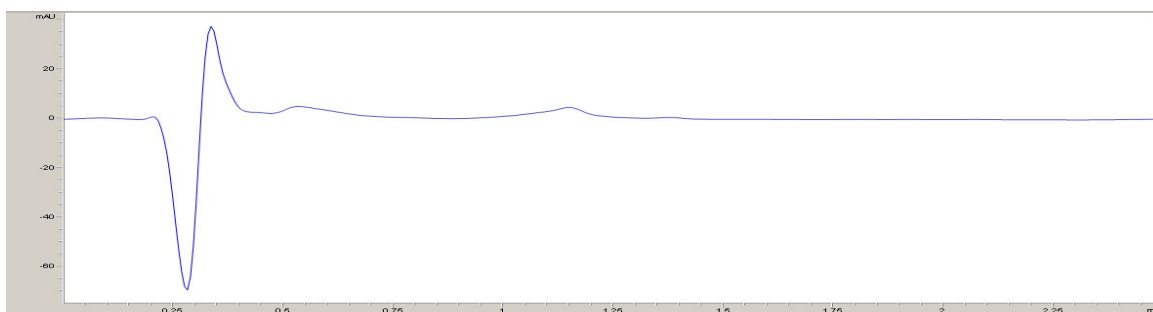
mobilne faze bio 40%:60% i hromatogram snimljen pri istoj koncentraciji EES-a prikazan je na slici 42.



Slika 42. HPLC-DAD hromatogram standardnog rastvora EES-a koncentracije $11,8 \mu\text{g mL}^{-1}$. Sastav mobilne faze fosfatni pufer pH 7,5 : acetonitril (40%:60%); protok je $0,5 \text{ mL min}^{-1}$

Može se uočiti prisustvo pika na $t_r = 0,90 \text{ min}$ čija je površina 29,8 mAUs. Da bi se potvrdilo da pomenuti signal potiče od EES, snimljen je pri istim uslovima hromatogram slepe probe. Pošto se na hromatogramu slepe probe ne uočava pik pri $t_r = 0,90 \text{ min}$ možemo sa sigurnošću tvrditi da pomenuti pik potiče od EES-a.

Zatim je snimljen hromatogram EES-a pri koncentraciji $11,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ kada je odnos komponenata mobilne faze 45%:55% (fosfatni pufer pH 7,5 : acetonitril). Dobijen hromatogram prikazan je na slici 43.



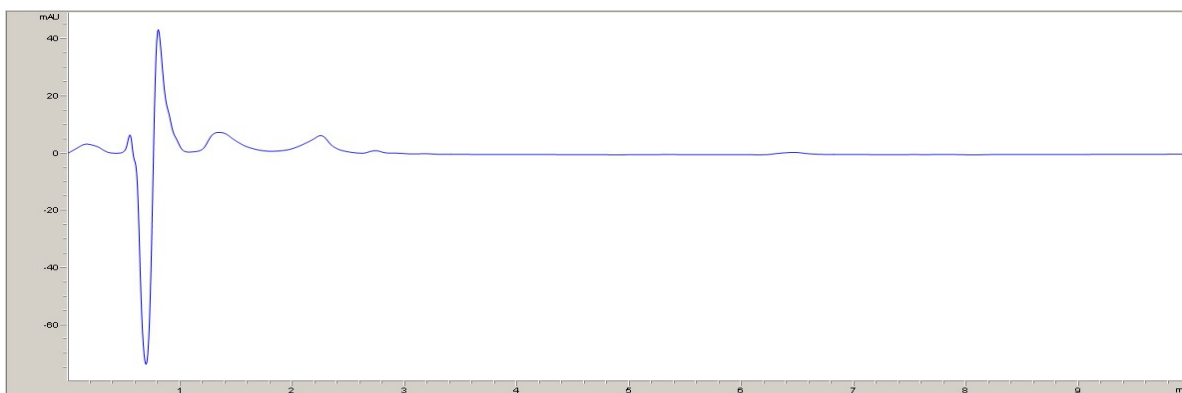
Slika 43. HPLC-DAD hromatogram standardnog rastvora EES-a koncentracije $11,8 \mu\text{g mL}^{-1}$. Sastav mobilne faze fosfatni pufer pH 7,5 : acetonitril (45%:55%); protok je $0,5 \text{ mL min}^{-1}$

Signal EES-a se sada javlja na $t_r = 1,15 \text{ min}$ i površina dobijenog pika je 45,4 mAUs. Pri ovom odnosu komponenata mobilne faze dobija se signal sa najvećom površinom u poređenju sa

prethodno dobijenim signalima EES-a, odnosno u ovom slučaju pik je širi ali niži, što je razumljivo. Na osnovu gore prikazanih hromatograma može se zaključiti da sa povećanjem udela fosfatnog pufera pH 7,5 u mobilnoj fazi, dolazi do usporavanja izlaska EES-a sa kolone odnosno da se signal ispitivanog analita javlja na većim retencionim vremenima.

Potom je prilikom optimizacije sastava mobilne faze, kao druga komponenta korišćen metanol umesto acetonitrila i ceo postupak optimizacije je ponovljen, tj. ispitano je kako sastav mobilne faze voda:metanol, fosfatni pufer pH 6,5 : metanol i fosfatni pufer pH 7,5 : metanol, pri različitim odnosima komponenta mobilne faze utiče na eluiranje EES-a sa kolone. Međutim ni jedna od pomenutih mobilnih faza čija je jedna od komponenta metanol nije dala zadovoljavajuće rezultate određivanja EES-a jer se nije javljao signal od ciljnog analita na snimljenim hromatogramima.

Kao moguć izbor mobilne faze za određivanje EES-a do sada se pokazao fosfatni pufer pH 7,5 : acetonitril u odnosu 45%:55%. Kao što je već gore pomenuto sa smanjenjem protoka mobilne faze dolazi do sporijeg eluiranja EES-a sa kolone pri čemu je signal udaljeniji od signala koji potiču od mobilne faze. Zbog toga su snimljeni hromatogrami uz primenu navedene mobilne faze ali pri protoku od $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ (slika 44).

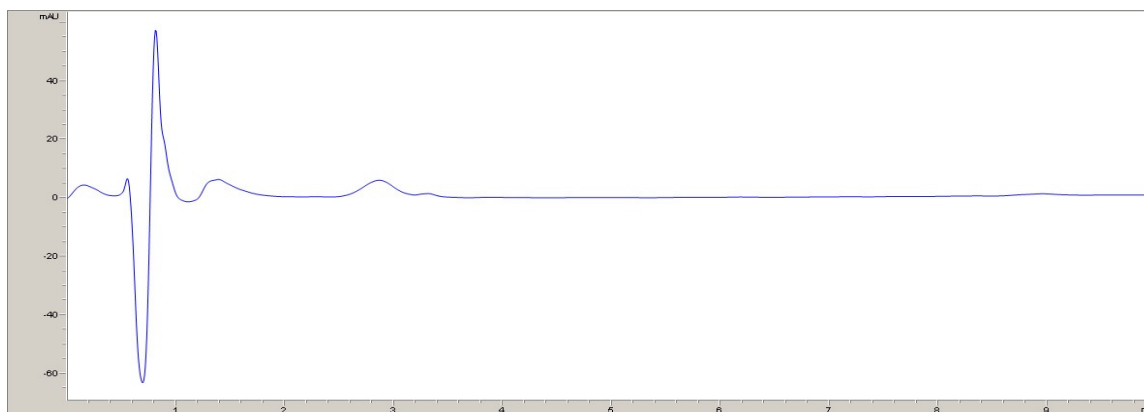


Slika 44. HPLC-DAD hromatogram standardnog rastvora EES-a koncentracije $11,8 \mu\text{g mL}^{-1}$. Sastav mobilne faze fosfatni pufer pH 7,5 : acetonitril (45%:55%); protok je $0,2 \text{ mL min}^{-1}$

Na slici se uočava prisustvo signala pri $t_r = 2,25 \text{ min}$ čija je površina 92,3 mAU. Ovaj signal se ne javlja na hromatogramu slepe probe. Takođe, kada je snimljen hromatogram pri

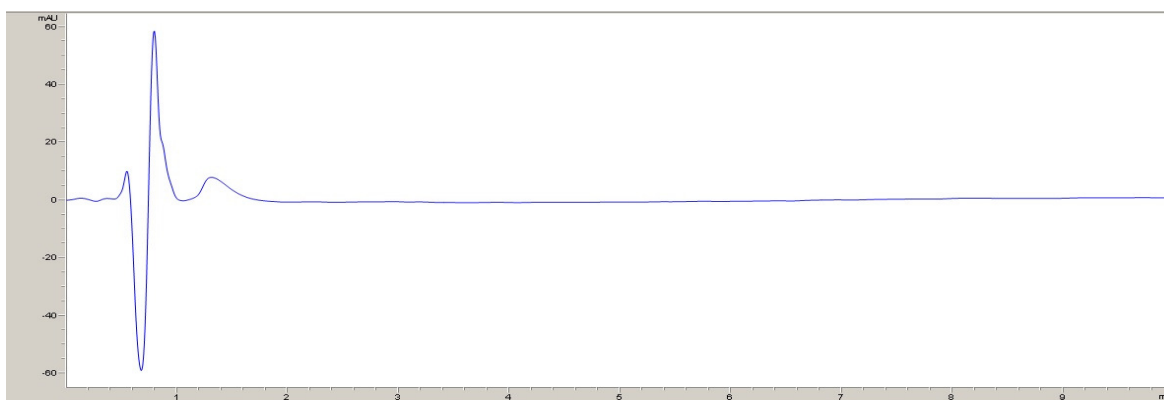
istim uslovima za EES pri koncentraciji $58,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ dobija se signal koji je oko pet puta veći od signala dobijenog pri koncentraciji $11,8 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Daljom optimizacijom sastava mobilne faze korišćena je smeša fosfatni pufer pH 8,0 : acetonitril u odnosu 45%:55%. Protok mobilne faze je bio $0,2 \text{ mL min}^{-1}$. Na slici 45 prikazan je hromatogram EES-a koncentracije $11,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ pri navedenim uslovima.



Slika 45. HPLC-DAD hromatogram standardnog rastvora EES-a koncentracije $11,8 \mu\text{g mL}^{-1}$. Sastav mobilne faze fosfatni pufer pH 8,0 : acetonitril (45%:55%); protok je $0,2 \text{ mL min}^{-1}$

Na $t_r = 2,90 \text{ min}$ javlja se signal površine 112,3 mAU. Da bi sa sigurnošću tvrdili da navedeni signal potiče od EES-a snimljen je pri istim uslovima i hromatogram slepe probe (slika 46).

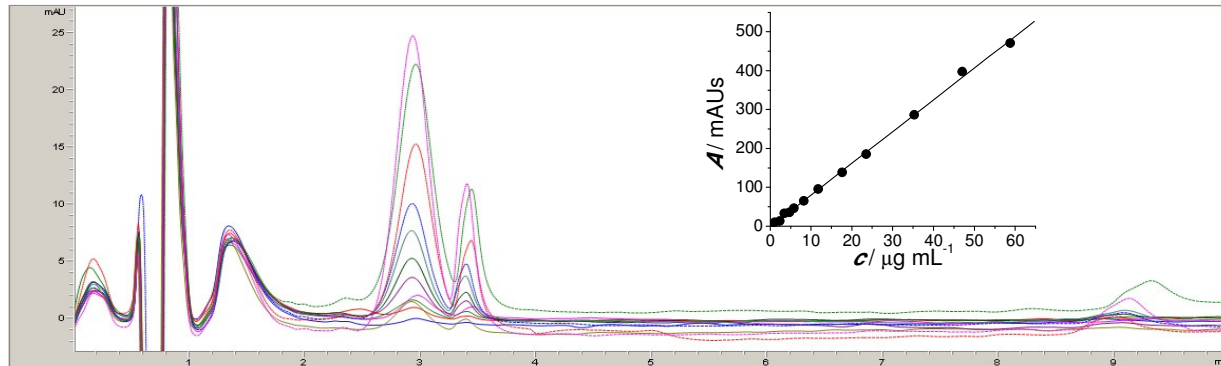


Slika 46. HPLC-DAD hromatogram slepe probe. Sastav mobilne faze fosfatni pufer pH 8,0 : acetonitril (45%:55%); protok je $0,2 \text{ mL min}^{-1}$

Kako se na hromatogramu slepe probe ne javlja signal pri $t_r = 2,90$ min, može se pretpostaviti da signal na pomenutom retencionom vremenu potiče od EES-a. Takođe, intenzitet signala se povećao oko pet puta kada je ispitivana koncentracija EES-a bila $58,8 \mu\text{g mL}^{-1}$, što je dodatna potvrda da signal potiče od ispitivanog analita.

Primenom fosfatnog pufera pH 8,0 kao komponente mobilne faze, dobija se intenzivniji signal EES-a ($A = 112,3$ mAUs) nego u slučaju kada je komponenta mobilne faze fosfatni pufer pH 7,5 ($A = 92,3$ mAUs), pri protoku mobilne faze od $0,2 \text{ mL min}^{-1}$. Takođe, na osnovu položaja pika može se zaključiti da sa porastom pH vrednosti komponente mobilne faze usporava se eluiranje EES-a sa kolone.

Kao optimalni/najprihvatljiviji uslovi određivanja EES-a kako u model rastvorima, tako i u realnom uzorku korišćena je mobilna faza fosfatni pufer pH 8,0 : acetonitril u odnosu 45%:55%. Protok mobilne faze je bio $0,2 \text{ mL min}^{-1}$, a zapremina injekcione petlje je bila $20,0 \mu\text{L}$. Na slici 47 prikazani su HPLC-DAD hromatogrami pri koncentracijama EES-a od $1,18 \mu\text{g mL}^{-1}$ do $58,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ i odgovarajuća kalibraciona kriva.



Slika 47. HPLC-DAD hromatogrami EES-a pri koncentraciji od $1,18$ do $58,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ i odgovarajuća kalibraciona kriva. Sastav mobilne faze fosfatni pufer pH 8,0 : acetonitril (45%:55%); protok je $0,2 \text{ mL min}^{-1}$

Kao što se može videti optimizovana HPLC-DAD metoda je primenljiva u koncentracionom opsegu EES-a, koji je dva puta širi u poređenju sa primenom direktne katodne SWV metode, tj. od $1,18$ do $58,8 \mu\text{g mL}^{-1}$. Analitički parametri dobijeni primenom ove metode su takođe prikazani u tabeli 4. RSD metode pri koncentraciji EES-a od $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ je 1,1%.

Tabela 4. Analitički parametri za direktnu katodnu SWV i SW-AdSV metodu dobijeni primenom Hg(Ag)FE za određivanje EES zajedno sa komparativnim podacima HPLC-DAD metode

Parametri	Hg(Ag)FE/SWV	Hg(Ag)FE/SW-AdSV	HPLC-DAD
Linearni opseg ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	4,53-29,8	0,69-2,44	1,18-58,8
Odsečak	0,473 (μA)	0,100 (μA)	-1,583 (mAUs)
Nagib	-0,235 ($\mu\text{A mL } \mu\text{g}^{-1}$)	-1,577 ($\mu\text{A mL } \mu\text{g}^{-1}$)	8,163 (mAUs mL μg^{-1})
Koeficijent korelacije	-0,995	-0,997	0,999
GD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,36	0,21	0,35
GO ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	4,53	0,69	1,18

Iako, HPLC-DAD metode često imaju niže granice detekcije i određivanja, u ovom slučaju, zbog nedostatka osetljivih hromofora, pri odabranoj DAD radnoj talasnoj dužini od 205 nm određivanje ispitivanog analita je sa samo četiri puta manjom GO nego u slučaju primene razvijene direktne SWV metode i sa skoro dva puta većom u poređenju sa GO dobijenom primenom SW-AdSV metode. Dodatna analiza snimljenih UV spektara pokazuje da se 210 i 215 nm mogu koristiti kao naredne radne talasne dužine, ali nakon optimizacije metode, ove radne talasne dužine su se pokazale kao mogući izbor sa nešto većim vrednostima za GO metode.

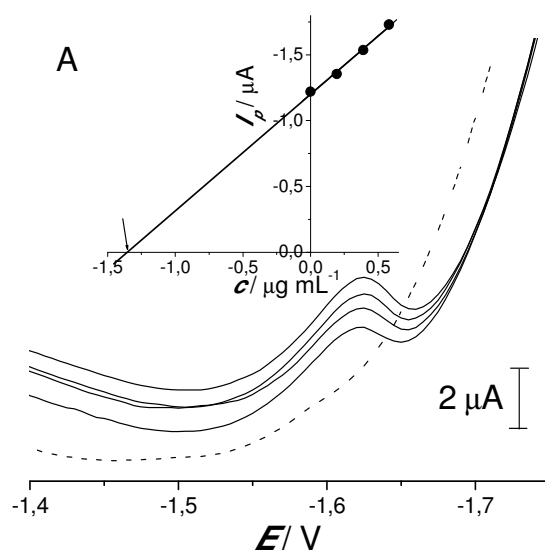
Iako je HPLC-DAD metoda primenljivija u širem koncentracionom opsegu, razvijene voltametrijske metode imaju određene prednosti kao što je pogodnost analize *in-situ*, zahtevaju vrlo jednostavne procedure pripreme uzorka, niska cena, brzo vreme odziva i u slučaju SW-AdSV niža GO.

4.1.2.3. Određivanje u odabranim uzorcima

Razrađene voltametrijske metode su testirane za određivanje EES-a u obogaćenom uzorku urina (SW-AdSV) i u tabletama Eritromicin[®]-a (SWV). U slučaju oba uzorka primenjena je metoda standardnog dodatka za određivanje koncentracije/sadržaja aktivne komponente.

Određivanje eritromicin-etilsukcinata u obogaćenom uzorku urina

Razvijena SW-AdSV metoda je primenjena za određivanje EES-a primenom Hg(Ag)FE u 10,0 mL dva puta razblaženom Briton-Robinsonovom puferu (pH 7,0) koji je obogaćen sa 100,0 μL humanog urina i poznatom koncentracijom EES-a $1,37 \mu\text{g mL}^{-1}$ (konačna koncentracija u voltometrijskoj ćeliji). Uzorci su analizirani primenom metode standardnog dodatka jer efekat matriksa smanjuje intenzitet signala EES-a. Dobijena analitička prava i SW-AdSV voltamogrami dobijeni nakon standardnih dodataka prikazani su na slici 48.

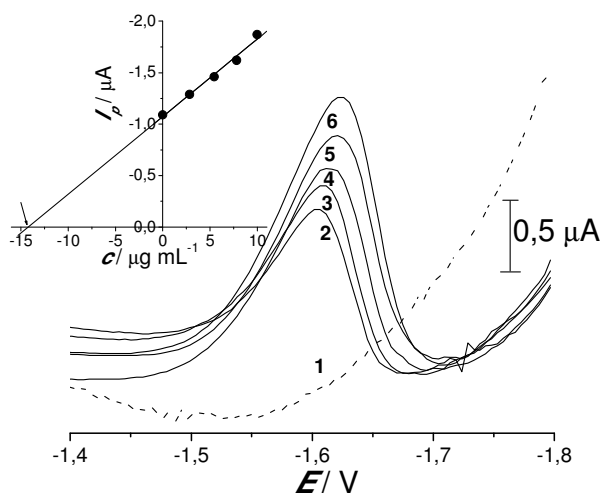


Slika 48. Primer određivanja EES u obogaćenom uzorku urina primenom SW-AdSV i Hg(Ag)FE. Od dole nagore: Briton-Robinson pomoćni elektrolit sa uzorkom urina (isprekidana linija), kao isprekidana linija + $1,37 \mu\text{g mL}^{-1}$ EES i tri standardna dodatka sa konačnim koncentracijama u voltometrijskoj ćeliji EES-a $0,195$, $0,389$ i $0,583 \mu\text{g mL}^{-1}$. Umetak: analitička prava

Sadržaj EES-a dobijen prilikom tri ponovljena merenja ($1,33$; $1,36$ i $1,47 \mu\text{g mL}^{-1}$, srednja vrednost sadržaja EES: $1,39 \mu\text{g mL}^{-1}$, RSD $5,3\%$) je veoma bliska vrednosti dodate koncentracije EES-a, $1,37 \mu\text{g mL}^{-1}$. Pored optimizacije parametara E_{acc} i t_{acc} , dodatni jednostavni koraci pripreme uzorka kao što su tečno-tečna ekstrakcija ili ekstrakcija na čvrstoj fazi mogu dovesti do poboljšanja osetljivosti metode.

Određivanje sadržaja eritromicin-etilsukcinata u farmaceutskom proizvodu Eritromicin[®]-a

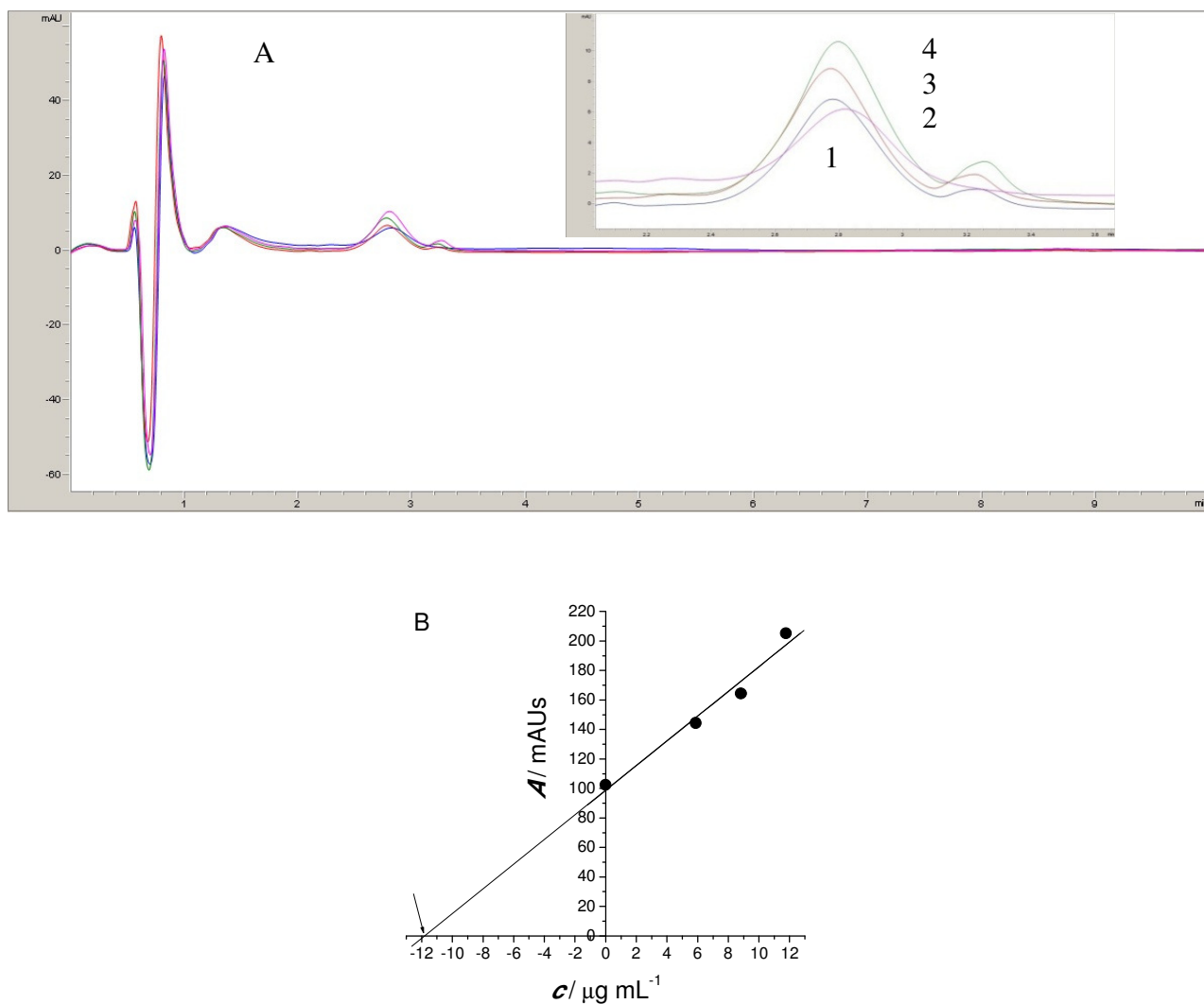
Nakon adekvatne pripreme rastvora iz tablete, EES je određivan u komercijalnom farmaceutskom proizvodu Eritromicin[®]-a pri pH 7,0 primenom optimizovane SWV metode i Hg(Ag)FE. Prilikom određivanja EES-a u njegovoj farmaceutskoj formulaciji (slika 49) nominalna koncentracija (na osnovu deklaracije proizvođača) je $14,3 \mu\text{g mL}^{-1}$. Nakon snimanja bazne linije (kriva 1) i voltamograma uzorka farmaceutskog proizvoda (kriva 2) uzastopno su dodata četiri standardna dodatka (krive 3-6) tako da su konačne koncentracije EES-a u voltometrijskoj ćeliji u opsegu od $2,85$ do $9,99 \mu\text{g mL}^{-1}$. Nađen sadržaj ispitivanog analita je $14,3 \mu\text{g mL}^{-1}$. Primenjena je metoda standardnog dodatka jer je uočeno smanjenje intenziteta signala u poređenju sa signalima dobijeni u adekvatnom model sistemu, što se može objasniti efektom matriksa.



Slika 49. *Određivanje koncentracije EES-a u farmaceutskoj formulaciji Eritromicin[®]-a primenom metode standardnog dodatka. SW voltamogrami bazne linije (1), uzorka komercijalne formulacije (2) i četiri standardna dodatka EES-a (3-6, konačne koncentracije standardnih dodataka u voltometrijskoj ćeliji: $2,85$, $5,43$, $7,81$ i $9,99 \mu\text{g mL}^{-1}$) i odgovarajuća analitička prava prikazana kao umetak*

Srednja vrednost sadržaja eritromicina u tabletama Eritromicin[®]-a dobijena određivanjem EES-a, a potom preračunavanjem na eritromicin, primenom razvijene SWV metode iznosi $251,2 \text{ mg}$ (izraženo kao eritromicin) što je u dobroj saglasnosti sa deklarisanim sadržajem (250 mg izraženo kao eritromicin). Takođe su rađena i komparativna HPLC-DAD merenja i dobijeni

hromatogrami su prikazani na slici 50A. Kriva 1 predstavlja hromatogram komercijalne formulacije, a krive 2-4 predstavljaju hromatograme standardnih dodataka EES-a pri čemu su koncentracije 5,88; 8,82 i 11,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Odgovarajuća analitička prava prikazana je na slici 50B na osnovu koje je pronađena koncentracija EES-a u iznosu od 11,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ što kada se preračuna u mg/tableti iznosi 250,5 mg/tableti što je u dobroj saglasnosti sa deklarisanim sadržajem eritromicina u formi EES-a.



Slika 50. Određivanje koncentracije EES-a u farmaceutskoj formulaciji Eritromicin[®]-a primenom metode standardnog dodatka. A) hromatogrami uzorka komercijalne formulacije (1) i tri standardna dodatka EES-a (2-4, konačne koncentracije standardnih dodataka EES-a: 5,88, 8,82 i 11,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$). B) odgovarajuća analitička prava

Dobijeni rezultati primenom Hg(Ag)FE-SWV i HPLC-DAD metode dati su u tabeli 5.

Tabela 5. *Određivanje eritromicina u formi EES i izraženo kao eritromicin u Eritromicin[®] tabletama. Deklarisan sadržaj aktivne komponente je 250 mg izraženo kao eritromicin/tableti*

Parametri	Nađeno (mg/tableti) primenom Hg(Ag)FE/SWV	Nađeno (mg/tableti) primenom HPLC-DAD
Uzorak broj 1	248,5	252,2
Uzorak broj 2	253,0	246,9
Uzorak broj 3	252,1	250,5
Srednja vrednost	251,2	249,9
RSD (%)	0,95	1,1

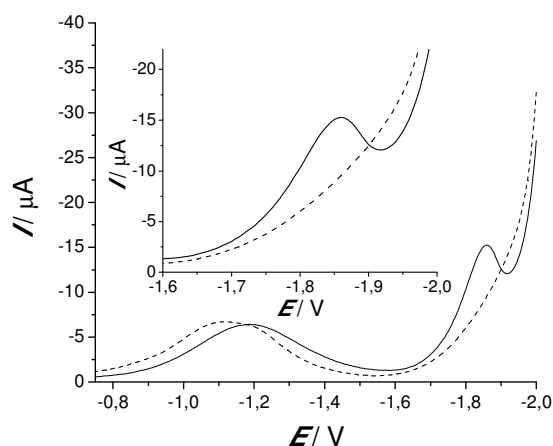
Reproduktivnost analitičkog signala, izražena preko RSD je manja od 1,2%. Imajući u vidu osnovni uslov Evropske farmakopeje 8 [170] u pogledu tačnosti merenja, obe prikazane analitičke metode u potpunosti zadovoljavaju ove kriterijume i potvrđuju da je u analiziranim tabletama pronađen sadržaj eritromicina u formi eritromicin-etilsukcinata koji je propisan po deklaraciji proizvođača.

4.1.3. Voltametrijsko ponašanje azitromicina i njegovo određivanje u model rastvoru

4.1.3.1. Voltametrijska karakterizacija

Primenom direktne katodne SWV i CV izvršena je karakterizacija azitromicina pomoću Hg(Ag)FE kao radne elektrode. Pomoćni elektrolit je Briton-Robinsonov pufer u opsegu pH vrednosti od pH 4,0 do pH 11,9.

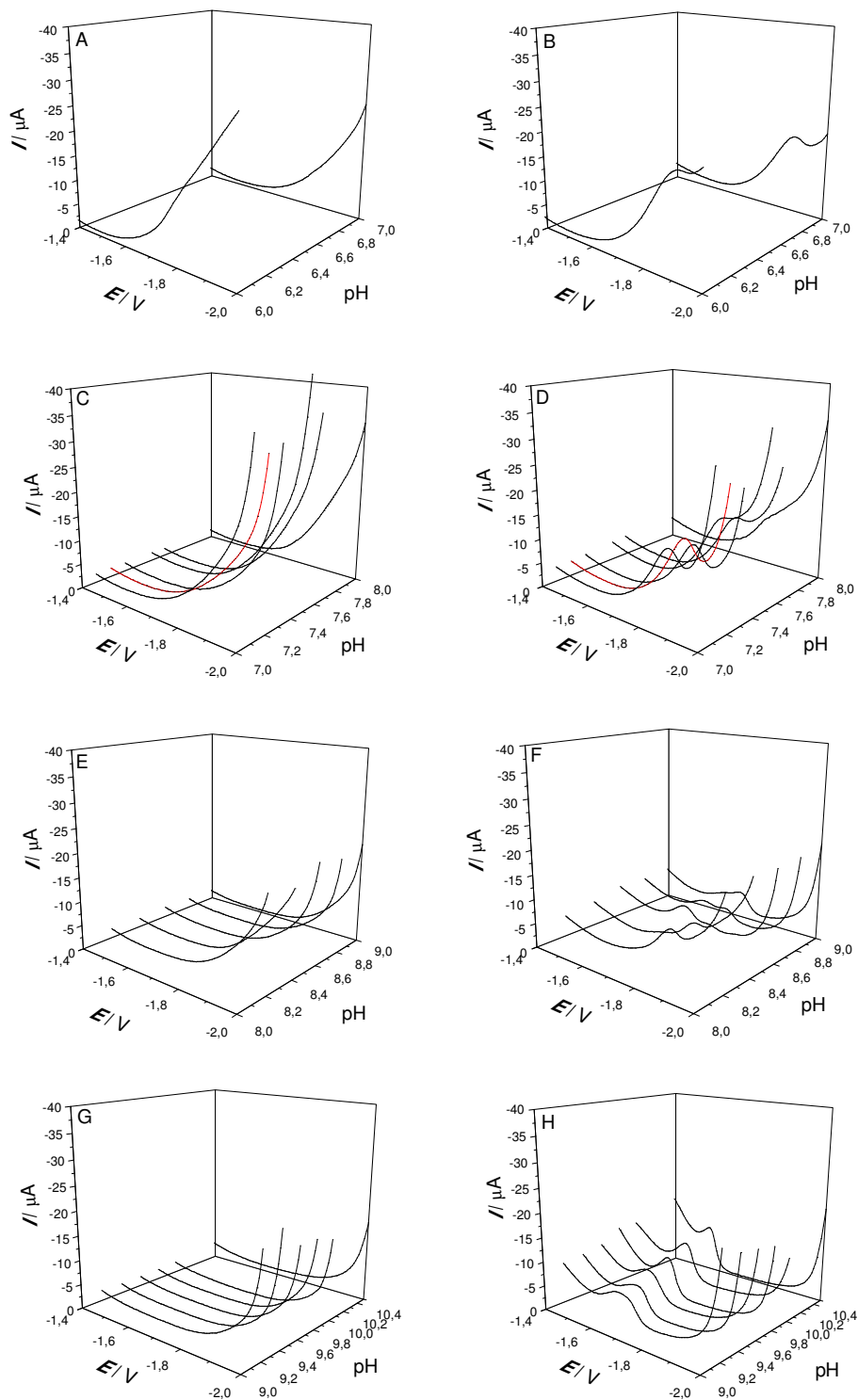
Ispitivanje uticaja pH vrednosti sredine na oblik i intenzitet signala AZI-a radeno je primenom direktne SWV u opsegu potencijala od -0,75 V do -2,00 V. Redukcioni signal se javlja tek pri pH 6,0. Pretpostavlja se da se signal ciljnog analita ne uočava pri nižim pH vrednostima jer se poklapa sa redukcijom hidronijumovih jona. Na slici 51 prikazani su SW voltamogrami slepe probe (isprekidana linija) i 16,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ azitromicin (puna linija) pri pH 7,2.



Slika 51. SW voltamogrami bazne linije (isprekidana linija) i azitromicina pri koncentraciji $16,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ (puna linija) u prisustvu Briton-Robinsonovog pufera pH 7,2. Umetak: uvećani prikaz redukcionog signala azitromicina

Na osnovu dobijenih voltamograma uočava se prisustvo pika na baznoj liniji (slepa proba) čiji je maksimum na potencijalu oko -1,2 V koji je karakterističan za Hg(Ag)FE i koji je ranije opisan, a pri dodatku ispitivanog analita uočava se i signal sa maksimumom pika na potencijalu -1,86 V (uvećan prikaz dobijenog pika predstavljen je kao umetak slike 51). Zbog dovoljne razdvojenosti pikova moguće je analizirati signale koji potiču od redukcije ciljnog analita.

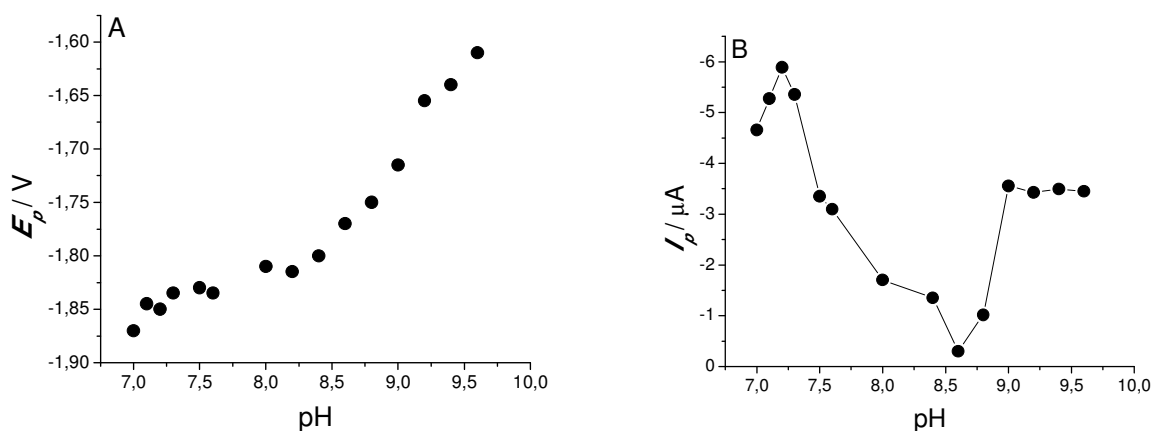
Na slikama 52B, D, F i H prikazani su SW voltamogrami azitromicina pri koncentraciji od $16,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ u prisustvu Briton-Robinsonovog pufera, kao pomoćnog elektrolita, odgovarajuće pH vrednosti, dok su na slikama 52A, C, E i G prikazani odgovarajući SW voltamogrami slepe probe (bazne linije). SW voltamogrami dobijeni pri različitim pH vrednostima pomoćnog elektrolita su predstavljeni u segmentima (slike 52A i B pH 6,0 i pH 7,0; slike 52C i D od pH 7,1 do pH 8,0; slike 52E i F od pH 8,2 do pH 9,0; slike 52G i H od pH 9,2 do pH 10,5) radi bolje preglednosti ponašanja ciljnog analita pri različitim pH vrednostima.



Slika 52. SW voltamogrami bazne linije snimljeni primenom $\text{Hg}(\text{Ag})\text{FE}$ u prisustvu Briton-Robinsonovog pufera: od pH 6,0 do pH 7,0 (A); od pH 7,1 do pH 8,0 (C); od pH 8,2 do pH 9,0 (E) i od pH 9,2 do pH 10,5 (G). Isti rastvori pufera u prisustvu $16,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ azitromicina (B, D, F i H)

Kao što se sa slika 52B, D, F i H može videti pH vrednost sredine u velikoj meri utiče kako na oblik tako i na intenzitet redukcionog pika ciljnog analita. Pri pH 6,0 signal AZI-a nije jasno definisan zbog njegovog preklapanja sa signalom izdvajanja vodonika. Sa porastom pH vrednosti sredine dolazi do pomeranja položaja pika azitromicina ka pozitivnijim potencijalima i pri pH vrednostima većim od pH 10,5 redukциони pik ispitivanog analita se spaja sa pikom na baznoj liniji, zbog čega se dobijaju pikovi koji nemaju jasno definisan oblik i teško ih je analizirati. Pri pH vrednostima od pH 8,2 do pH 9,0 pri ispitivanoj koncentraciji azitromicina javljaju se dva redukciona pika ciljnog analita. Za analitičke svrhe korišćen je pik koji se javlja pri negativnijim potencijalima jer se intenzitet signala menja sa promenom koncentracije ciljnog analita za razliku od pika koji se uočava na pozitivnijim potencijalima. SW voltamogrami azitromicina pri pH 6,0 i pH vrednostima većim od pH 9,6 su prikazani, ali zbog oblika dobijenih redukcionih signala nisu analizirani u daljem radu. Stoga je zavisnost položaja, u vidu E_p (slika 53A), i intenziteta, u vidu I_p (slika 53B), pika od pH vrednosti sredine prikazana od pH 7,0 do pH 9,6.

Sa povećanjem pH vrednosti sredine dolazi do pomeranja položaja redukcionog pika ispitivanog analita ka pozitivnijim vrednostima potencijala od -1,87 V do -1,61 V.



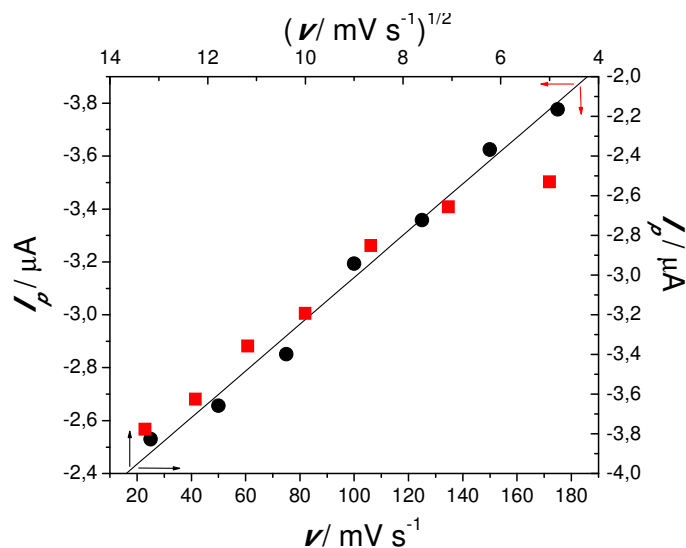
Slika 53. E_p -pH (A) i I_p -pH (B) zavisnost signala azitromicina ($c = 16,2 \mu\text{g mL}^{-1}$) u Briton-Robinson pomoćnom elektrolitu od pH 7,0 do 9,6

Sa slike zavisnosti E_p -pH, može se uočiti da dva puta dolazi do promene nagiba krive, jedna je pri pH 8,4 a druga je između pH 9,0 i pH 9,2. Kako azitromicin u svojoj strukturi sadrži

dva atoma azota, jedan u laktonskom prstenu, a drugi na dezozaminu, koja su u svojoj protonovanoj formi u kiseljoj sredini, može se pretpostaviti da promene nagiba zavisnosti E_p -pH nastaju usled deprotonacije prvo jednog atoma azota a potom i drugog. Prema literaturnim podacima vrednosti za logaritamsku vrednost konstante disocijacije su $pK_{k1} \sim 8,7$ i $pK_{k2} \sim 9,3$ [171], $pK_{k1} = 8,7$ i $pK_{k2} = 9,5$ [172], $pK_{k1} = 8,6$ i $pK_{k2} = 9,5$ [173] odnosno $pK_{k1} = 8,1$ i $pK_{k2} = 8,9$ [174]. Kriva zavisnosti E_p -pH u opsegu pH vrednosti od pH 7,0 do pH 9,0 može se opisati na osnovu dve jednačine s obzirom na promenu nagiba krive: $E_p = -2,138 \text{ [V]} + 0,040 \text{ [V/pH]} \times \text{pH}$ ($r = 0,937$) između pH 7,0 i 8,4 i $E_p = -2,955 \text{ [V]} + 0,137 \text{ [V/pH]} \times \text{pH}$ ($r = 0,995$) između pH 8,4 i 9,0.

Na osnovu slike zavisnosti I_p -pH (slika 53B) najintenzivniji pik AZI-a javlja se pri pH 7,2. U alkalnijoj sredini od pH 7,2 intenzitet struje pika značajno opada sve do pH 8,6, nakon čega ponovo dolazi do porasta. Kao optimalna pH vrednost za dalja određivanja ciljnog analita odabrana je pH 7,2 na osnovu dobijenog intenziteta i oblika pika na $E_p = -1,85 \text{ V}$ u odnosu na ZKE (pri datoj pH vrednosti SW voltamogrami slepe probe i u prisustvu ciljnog analita označeni su crvenom bojom na slikama 52C i D).

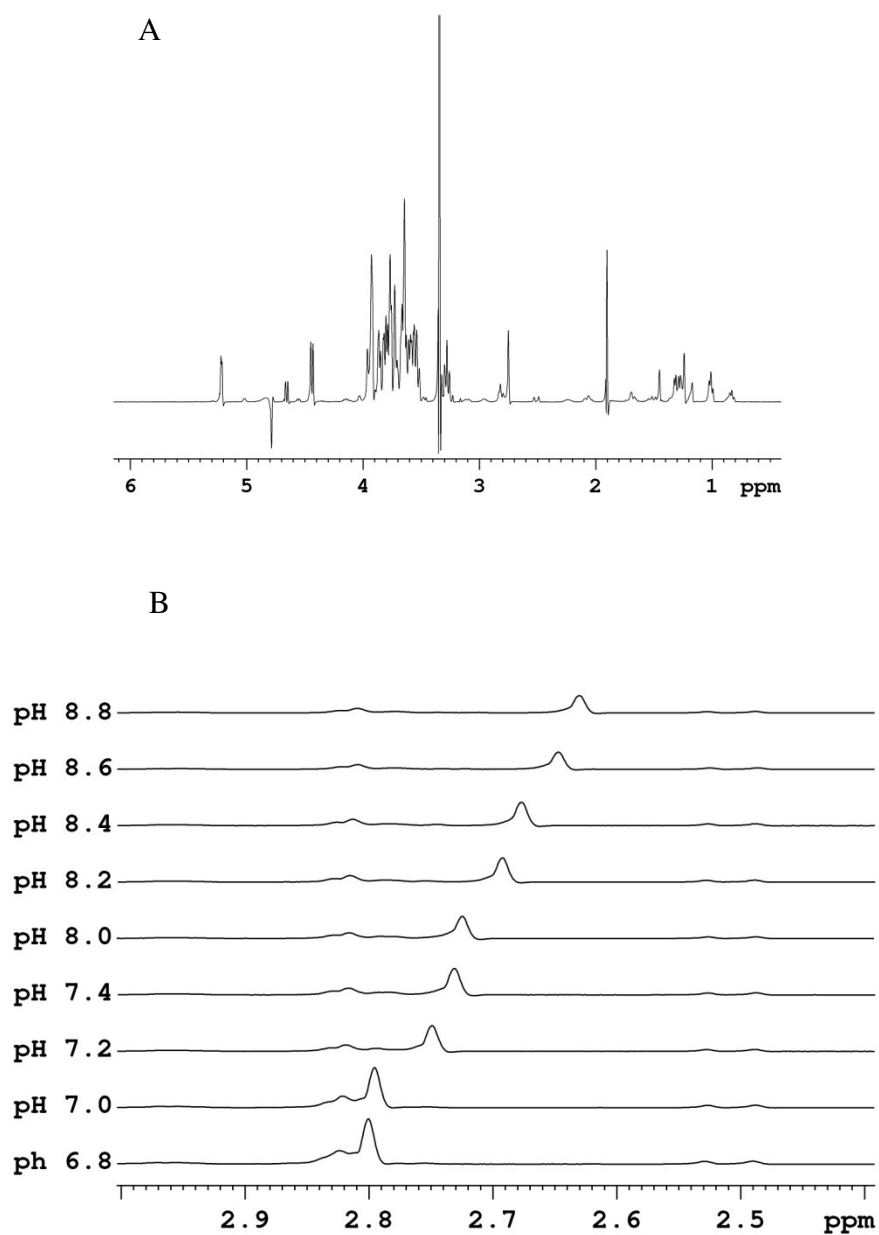
Kako bi se ispitala moguća adsorpcija azitromicina na površini Hg(Ag)FE snimani su ciklični voltamogrami u opsegu potencijala od $-0,75 \text{ V}$ do $-2,00 \text{ V}$ pri brzini skeniranja od $0,025 \text{ V s}^{-1}$ do $0,175 \text{ V s}^{-1}$. Na cikličnim voltamogramima javlja se jedan ireverzibilni redukcionni pik koji potiče od ispitivanog analita. Na slici 54 prikazane su odgovarajuće zavisnosti intenziteta struje pika od v odnosno od $v^{1/2}$.



Slika 54. Linearna zavisnost intenziteta struje pika azitromicina (I_p) od v i ilustrativni prikaz dobijenih rezultata u slučaju zavisnosti I_p od $v^{1/2}$. Eksperimentalni uslovi: pH 7,2; v od 0,025 V s^{-1} do 0,175 V s^{-1}

Sa slike se može videti da je dobijena linearna zavisnost intenziteta struje pika ispitivanog analita od brzine skeniranja što ukazuje na to da je proces kontrolisan adsorpcijom. Linearna zavisnost se može opisati jednačinom $I_p = -2,258 [\mu\text{A}] - 0,009 [\mu\text{A}/(\text{mV s}^{-1})] \times v$ ($r = -0,995$).

Kako bi se potvrdila pretpostavka da se molekul azitromicina pri pH 7,2 nalazi u protonovanom obliku, što olakšava adsorpciju molekula na površini Hg(Ag)FE koja je negativno polarizovana, snimani su ^1H NMR spektri komercijalne formulacije ciljnog analita pri različitim pH vrednostima pri čemu je praćeno hemijsko pomeranje metilskih protona tercijarne amino grupe. Na slici 55A prikazan je ^1H NMR spektar komercijalne formulacije azitromicina pri pH 7,2, a na slici 55B prikazani je uvećani deo ^1H NMR spektara sa signalima metil grupa pri pH vrednostima: pH 6,8; 7,0; 7,2; 7,4; 8,0; 8,2; 8,4; 8,6 i 8,8.



Slika 55. ^1H NMR spektri azitromicina pri različitim pH vrednostima Briton-Robinsonovog pufera sa D_2O : A) ^1H NMR spektar azitromicina pri pH 7,2; B) izdvojeni signali za N,N -dimetil protone pri pH 6,8; 7,0; 7,2; 7,4; 8,0; 8,2; 8,4; 8,6 i 8,8

Prilikom ispitivanja uticaja pH vrednosti sredine na hemijsko pomeranje metilskih protona tercijarne amino grupe kao dobro definisan signal od interesa praćen je signal sa hemijskim pomeranjem $\delta_{(\text{H})}$ između 2,80 ppm i 2,63 ppm (tabela 6). **Brennan i Barber** su izvršili

asignaciju ^1H NMR spektra azitromicina pri čemu su uzorci ispitivanog antibiotika pripremljeni u $50,0 \text{ mmol L}^{-1}$ natrijum fosfatu u D_2O (pH 7,4) i hemijsko pomeranje signala za N,N-dimetil protone je bilo 2,85 ppm [139], što je slično sa hemijskim pomeranjem signala od interesa u našem slučaju pri datoj pH vrednosti s tim da su uzorci u slučaju naših eksperimenata pripremljeni u Briton-Robinsonov puferu i da je korišćena komercijalna formulacija ispitivanog antibiotika uz filtriranje uzoraka pomoću hidrofilnog filtera $0,22 \mu\text{m}$.

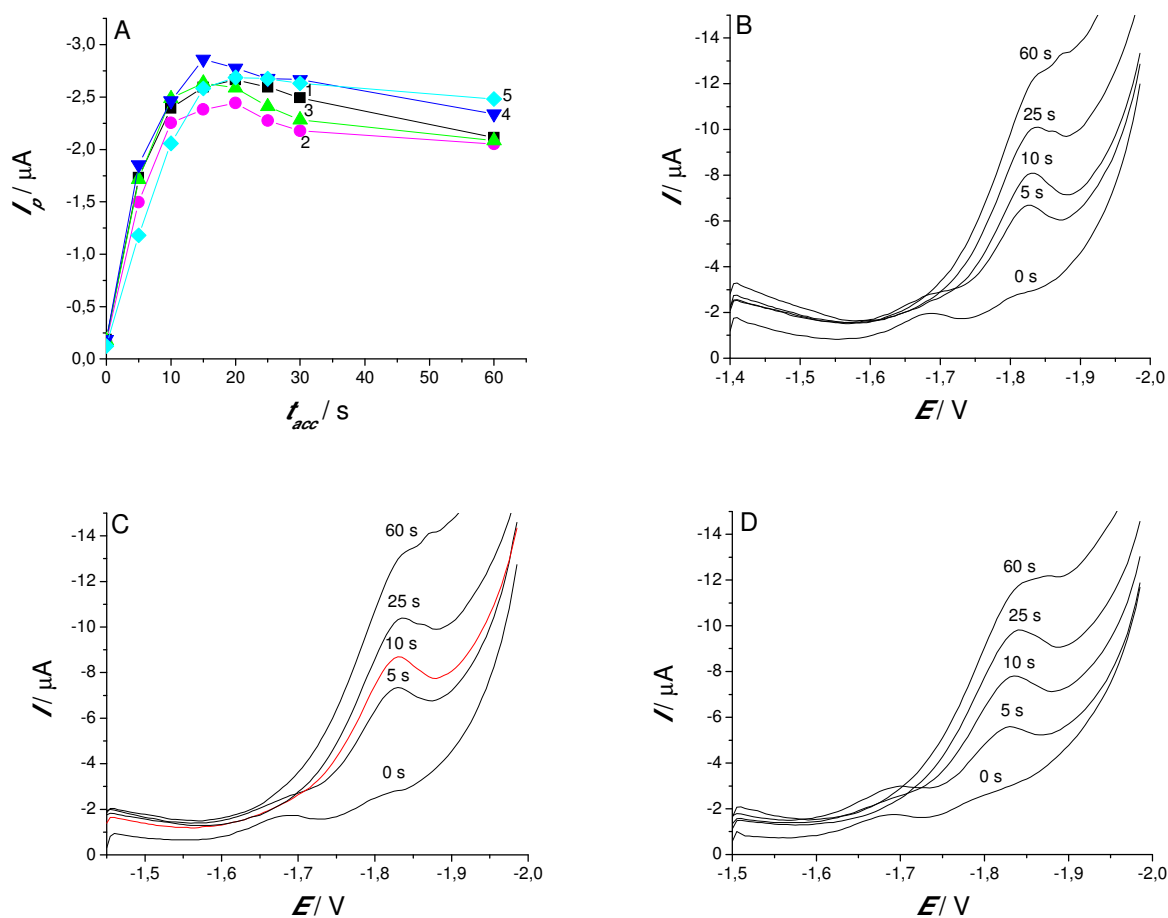
Tabela 6. Vrednosti za hemijska pomeranja signala za N,N-dimetil protone azitromicina pri odabranim pH vrednostima

pH	$\delta_{\text{(H)}}$ [ppm]
6,8	2,80
7,0	2,80
7,2	2,75
7,4	2,73
8,0	2,72
8,2	2,69
8,4	2,68
8,6	2,65
8,8	2,63

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je ciljani analit pri pH 7,2 u protonovanom obliku i da se najverovatnije adsorbuje na negativno polarizovanoj površini Hg(Ag)FE.

Nakon utvrđivanja da je proces koji se odigrava na površini elektrode kontrolisan adsorpcijom optimizovani su ključni parametri potencijal i vreme akumulacije. Optimizacija je vršena pri koncentraciji azitromicina $1,98 \mu\text{g mL}^{-1}$. Radi pronalaženja optimalnih uslova potencijala akumulacije je ispitivan u opsegu potencijala od $-0,50 \text{ V}$ do $-1,60 \text{ V}$ pri $t_{acc} = 10 \text{ s}$. Potom je optimizovan t_{acc} od 0 s do 60 s pri odabranim vrednostima E_{acc} . Na slici 56A prikazana je zavisnost intenziteta redukcionog signala ciljnog analita od vremena akumulacije pri odabranim vrednostima potencijala akumulacije, a na slikama 56B, C i D prikazane su odabrane voltametrijske krive dobijene primenom SWV (krive označene kao 0 s) i SW-AdSV (krive

označene kao 5 s, 10 s, 25 s i 60 s) pri različitim vrednostima E_{acc} . Crvena kriva na slici 56C predstavlja krivu dobijenu pri optimizovanim uslovima. Prikazani voltamogrami služe kao ilustracija kvalitativnog ponašanja sistema, pre svega u slučaju direktne SWV jer pri ovakvim uslovima ispitivanja koncentracija azitromicina se nalazi između GD i GO vrednosti direktne SWV metode.



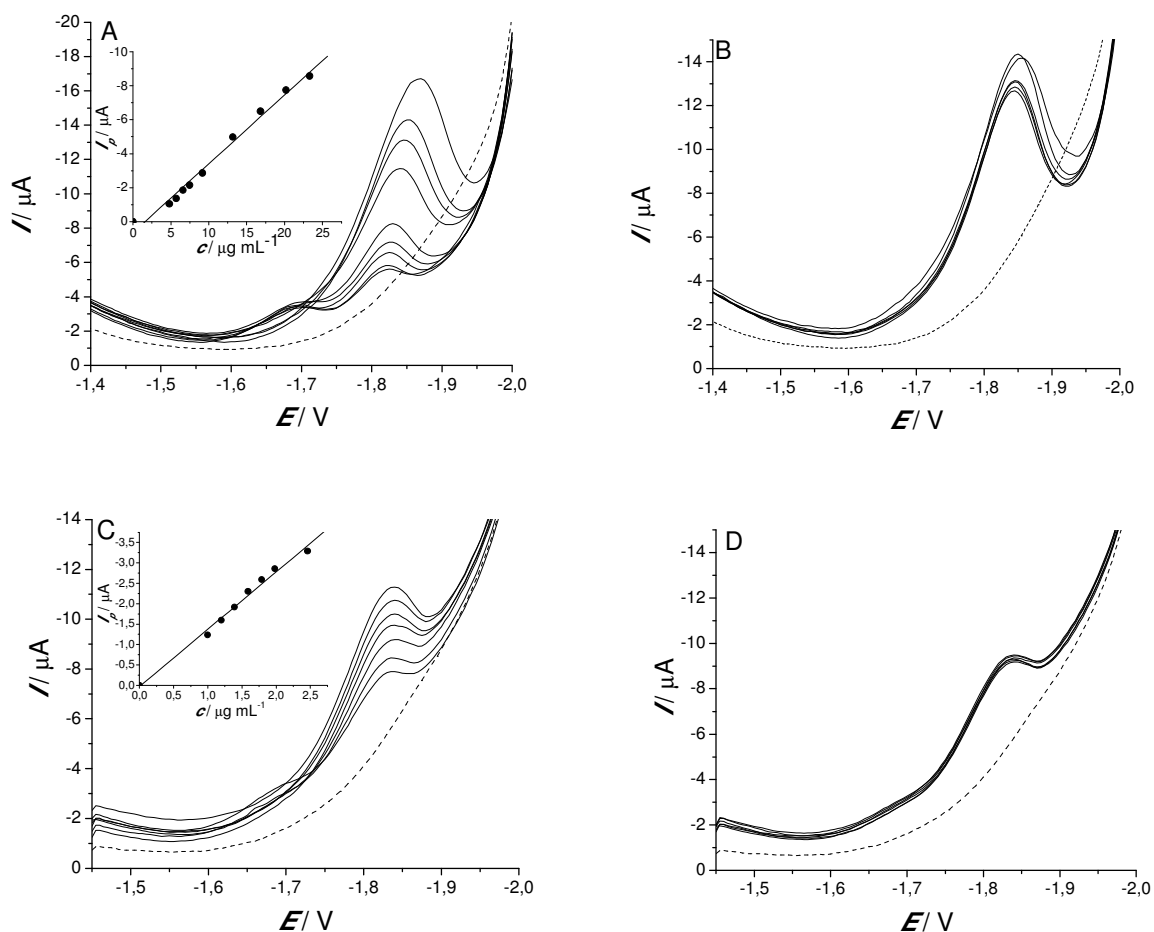
Slika 56. Uticaj potencijala i vremena akumulacije na redukциони pik azitromicina ($c = 1,98 \mu\text{g mL}^{-1}$) u Briton-Robinsonovom pomoćnom elektrolitu pH 7,2: A) vrednosti I_p dobijene pri različitim vrednostima t_{acc} : 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 i 60 s pri odabranim vrednostima E_{acc} (1) - 1,30 V, 2) -1,35 V, 3) -1,40 V, 4) -1,45 V i 5) -1,50 V) i B-D) ilustrativni voltamogrami dobijeni pri odabranom potencijalu akumulacije (odgovarajuća vremena akumulacije su označena na krivama u s) na: B) -1,40 V, C) -1,45 V i D) -1,50 V

Zbog zadovoljavajućeg oblika i intenziteta pika kao optimalni parametri za dalja određivanja ciljnog analita primenom SW-AdSV metode odabrani su $E_{acc} = -1,45 \text{ V}$ i $t_{acc} = 10 \text{ s}$ (SW-AdS voltamogram označen crvenom bojom).

4.1.3.2. Voltametrijsko određivanje u model rastvoru

Nakon odabira optimalne pH vrednosti za određivanje azitromicina primenom direktne katodne SWV i SW-AdSV definisani su osnovni parametri analitičkih metoda u model sistemu primenom obe razvijene metode. Na slici 57A prikazani su SW voltamogrami AZI-a u opsegu koncentracija od $4,81 \mu\text{g mL}^{-1}$ do $23,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ sa odgovarajućom kalibracionom krivom (umetak), a na slici 57C prikazani su SW-AdS voltamogrami u opsegu koncentracija AZI-a od $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ do $2,46 \mu\text{g mL}^{-1}$, a na osnovu intenziteta struje redukcionog pika ciljnog analita konstruisana je i odgovarajuća kalibraciona kriva koja je predstavljena kao umetak pomenute slike.

Takođe, ispitana je i reproduktivnost analitičkog signala ciljnog analita primenom optimizovane SWV i SW-AdSV metode. U slučaju direktne katodne SWV reproduktivnost je ispitana pri koncentraciji ciljnog analita $16,83 \mu\text{g mL}^{-1}$ a dobijeni SW voltamogrami prikazani su na slici 57B. RSD na osnovu šest uzastopnih merenja iznosi 4,7%. Primenom SW-AdSV metode reproduktivnost analitičkog signala je ispitana pri koncentraciji azitromicina $1,39 \mu\text{g mL}^{-1}$ (slika 57D) i na osnovu šest uzastopnih merenja RSD iznosi 0,1%.



Slika 57. Karakteristike razvijenih analitičkih metoda na Hg(Ag)FE u Briton-Robinsonovom puferu pH 7,2: A) SWV signali snimljeni u koncentracionom opsegu azitromicina 4,81-23,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (umetak: odgovarajuća kalibraciona kriva), B) reproduktivnost direktnog SWV analitičkog signala za 16,83 $\mu\text{g mL}^{-1}$ azitromicina (6 ponavljanja), C) SW-AdSV signali u koncentracionom opsegu azitromicina 1,0-2,46 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (umetak: odgovarajuća kalibraciona kriva), D) reproduktivnost SW-AdSV analitičkog signala (6 ponavljanja) pri koncentraciji azitromicina 1,39 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Isprekidane linije prikazuju odgovarajuće voltamograme bazne linije/slepe probe pri pH 7,2

Odgovarajući analitički parametri dobijeni primenom optimizovane SWV i SW-AdSV metode i Hg(Ag)FE za određivanje ciljnog analita dati su u tabeli 7.

Tabela 7. Analitički parametri za direktnu katodnu SWV i SW-AdSV metode dobijeni primenom Hg(Ag)FE za određivanje azitromicina

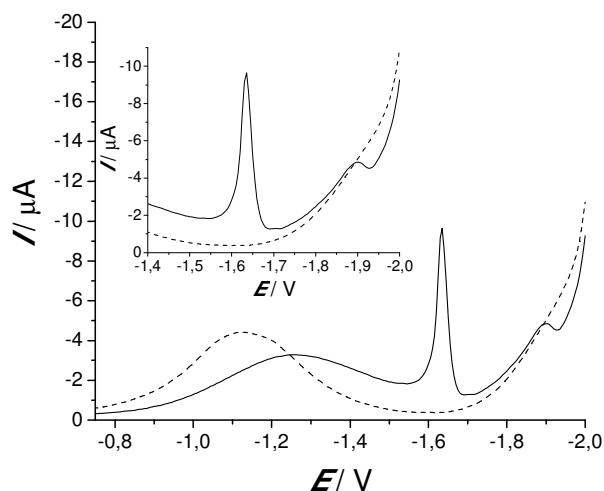
Parametri	Hg(Ag)FE/SWV	Hg(Ag)FE/SW-AdSV
Linearni opseg ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	4,81-23,3	1,0-2,46
Odsečak (μA)	0,637	0,030
Nagib ($\mu\text{A mL } \mu\text{g}^{-1}$)	-0,405	-1,404
Koeficijent korelacije	-0,994	-0,995
GD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,60	0,3
GO ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	4,81	1,0

Na osnovu dobijenih analitičkih parametara može se reći da je primenom adsorptivne metode granica detekcije smanjena oko 5 puta. Na osnovu snimljenih SW voltamograma pri nižim koncentracijama azitromicina uočava se prisustvo dva redukciona pika ciljnog analita. Za analitičke svrhe korišćen je redukcioni pik koji se javlja na negativnijim potencijalima i čiji intenzitet se proporcionalno menja sa promenom koncentracije ciljnog analita.

4.1.4. Voltametrijsko ponašanje klaritromicina i njegovo određivanje u model rastvoru

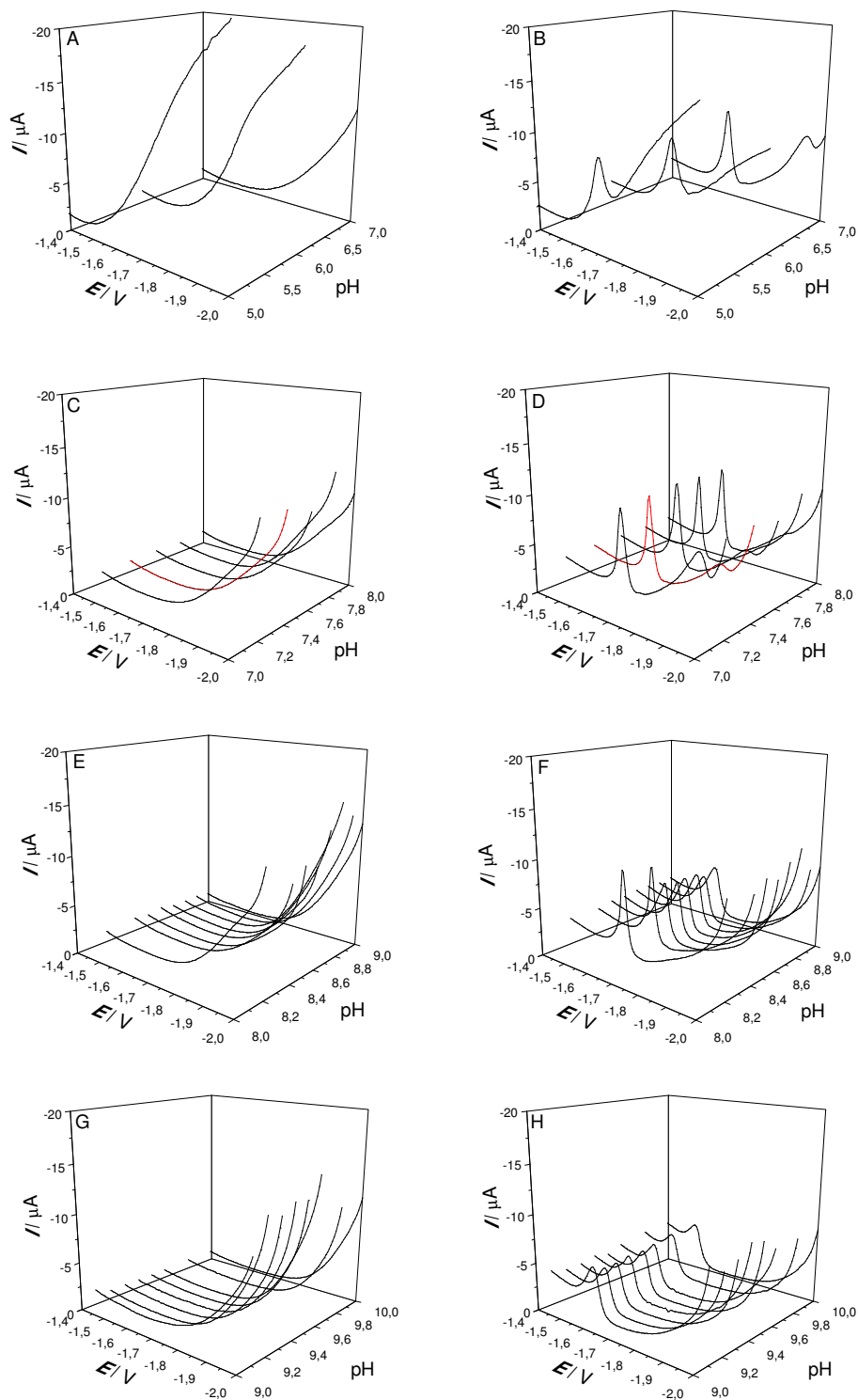
4.1.4.1. Voltametrijska karakterizacija

Prilikom voltametrijske karakterizacije klaritromicina prvo je vršeno ispitivanje uticaja pH vrednosti sredine (od pH 4,0 do pH 11,9) na oblik i intenzitet redukcionog pika ciljnog analita primenom direktne katodne SW voltametrije i Hg(Ag)FE kao radne elektrode. Voltametrijska karakterizacija primenom SWV vršena je u opsegu potencijala od -0,75 V do -2,00 V. Dodatkom CLA u rastvor pomoćnog elektrolita dolazi do formiranja redukcionog pika sa maksimumom na potencijalu između -1,70 V i -1,52 V u zavisnosti od pH vrednosti sredine. Na slici 58 prikazani su SW voltamogrami slepe probe/bazna linija i u prisustvu klaritromicina koncentracije $23,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ pri pH 7,4. Na osnovu dobijenih voltamograma može se uočiti da dodatkom klaritromicina dolazi do obrazovanja redukcionog pika sa maksimumom pika na potencijalu -1,63 V (uvećan prikaz dobijenog signala predstavljen je kao umetak slike 58).



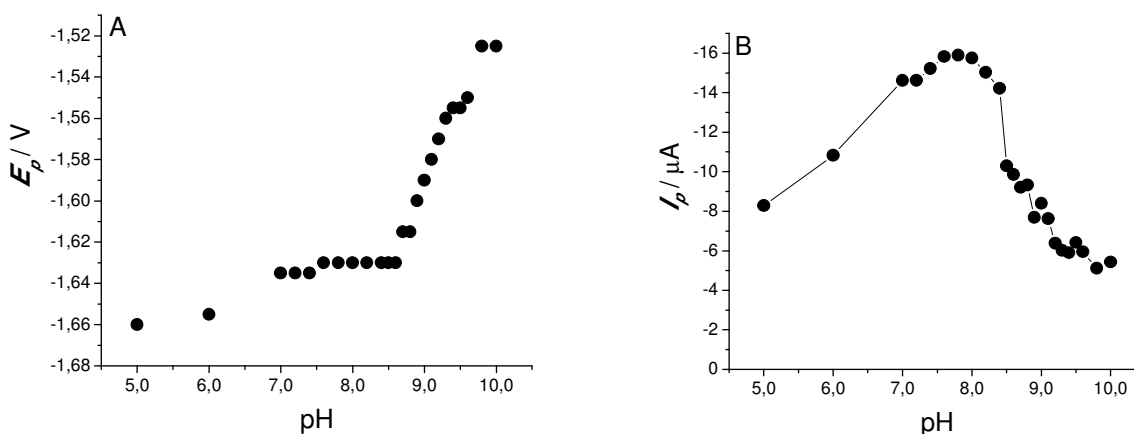
Slika 58. SW voltamogrami bazne linije (isprekidana linija) i klaritromicina pri koncentraciji $23,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (puna linija) u prisustvu Briton-Robinsonovog pufera pH 7,4. Umetak: uvećan prikaz redukcionog signala klaritromicina

Na slikama 59A, C, E i G prikazani su SW voltamogrami slepe probe/bazne linije pri ispitivanim pH vrednostima od pH 5,0 do pH 10,0, a na slikama 59B, D, F i H prikazani su SW voltamogrami pri istim pH vrednostima ali u prisustvu $23,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ klaritromicina. SW voltamogrami su prikazani u segmentima radi bolje preglednosti datih krivi (slika 59A i B: od pH 5,0 do pH 7,0; slika 59C i D: od pH 7,2 do pH 8,0; slika 59E i F: od pH 8,2 do pH 9,0; slika 59G i H: od pH 9,1 do pH 10,0). Pri pH vrednostima između pH 7,0 i pH 8,0 uočavaju se dva redukciona signala. Za analitičke svrhe korišćen je signal koji se javlja na pozitivnijim vrednostima potencijala jer je pri ispitivanoj koncentraciji klaritromicina signal znatno većeg intenziteta u poređenju sa redukcionim signalom čiji je maksimum na oko -1,8 V. SW voltamogrami dobijeni pri pH 4,0 i pri pH vrednostima većim od 10,0 nisu prikazani jer se pri ovim pH vrednostima ne obrazuju jasno definisani signali ciljnog analita.



Slika 59. SW voltamogrami bazne linije snimljeni primenom Hg(Ag)FE u prisustvu Briton-Robinsonovog pufera: od pH 5,0 do pH 7,0 (A); od pH 7,2 do pH 8,0 (C); od pH 8,2 do pH 9,0 (E); od pH 9,1 do pH 10,0 (G). Isti rastvori pufera u prisustvu $23,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ klaritromicina (B, D, F i H)

Za razliku od EES-a i AZI-a, pri pH 4,0 formira se pik CLA-a, ali pik nije dobro definisan verovatno zbog preklapanja sa strujom redukcije hidronijumovih jona. Pri pH vrednostima 5,0 i 6,0 formira se relativno simetričan pik klaritromicina, što nije slučaj kod EES-a (pri ovim pH vrednostima javlja se asimetričan pik, koji je slabo izražen) a kod azitromicina se čak pri pH 5,0 ni ne javlja redukcionni pik. Moguće objašnjenje da se kod klaritromicina bolje obrazuju redukcionni pikovi pri ovim pH vrednostima jeste da se pikovi javljaju na pozitivnijim vrednostima potencijala nego što je to slučaj kod EES i azitromicina (pri pH 5,0: -1,66 V (klaritromicin); -1,70 V (EES). Pri pH 6,0: -1,65 V (klaritromicin); -1,70 V (EES) i -1,89 V (azitromicin)), te se pik klaritromicina ne poklapa sa signalom izdvajanja vodonika u istoj meri kao što je to slučaj kod ranije pomenutih antibiotika. Pri pH vrednostima većim od 10,0 pik klaritromicina je spojen sa signalom koji se javlja na baznoj liniji sa maksimumom pika na oko -1,2 V i koji je karakterističan za Hg(Ag)FE (pomenuto u poglavlju 4.1.2.1. i 4.1.3.1) i teško je pouzdano analizirati pikove ciljnog analita. Kao i kod prethodnih makrolidnih antibiotika i kod klaritromicina uočeno je pomeranje maksimuma pika ka pozitivnijim vrednostima potencijala sa porastom pH vrednosti sredine (slika 60A).

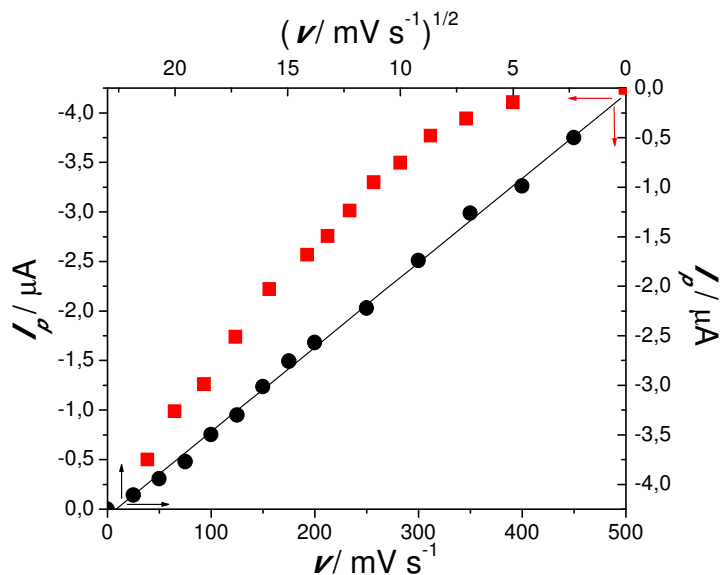


Slika 60. E_p -pH (A) i I_p -pH (B) zavisnost signala klaritromicina ($c = 23,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) u Briton-Robinson pomoćnom elektrolitu od pH 5,0 do pH 10,0

Kod krive zavisnosti E_p -pH dolazi do promene nagiba krive pri pH 8,6. U opsegu pH vrednosti od pH 7,0 do pH 9,0 kriva zavisnosti E_p -pH može se opisati na osnovu dve jednačine, s obzirom na promenu nagiba krive: $E_p = -1,71 \text{ [V]} + 0,010 \text{ [V/pH]} \times \text{pH}$ ($r = 0,955$) od pH 5,0 do

pH 8,4 i $E_p = -2,446 \text{ [V]} + 0,095 \text{ [V/pH]} \times \text{pH}$ ($r = 0,975$) od pH 8,6 do pH 9,0. Na osnovu literaturnih podataka vrednost za pK_k klaritromicina su $pK_k = 8,9$ [171], $pK_k = 8,76$ [175] odnosno $pK_k = 8,99$ [176,177] što je približno jednako sa pH vrednosti na kojoj se menja nagib zavisnosti E_p -pH, pa se može zaključiti da se klaritromicin nalazi u protonovanoj formi pri pH vrednostima sredine manjim od pH 8,6. Na osnovu krive zavisnosti intenziteta redukcionog pika ispitivanog analita od pH vrednosti sredine (slika 60B), može se videti da se najintenzivniji pik javlja pri pH 7,8 ali da se približni intenziteti dobijaju i pri pH vrednostima 7,6 i 8,0. Na osnovu oblika/simetričnosti pika i na osnovu intenziteta pika, kao optimalna pH vrednost za dalja određivanja klaritromicina odabrana je pH 7,4 (SW voltamogrami slepe probe i u prisustvu klaritromicina označeni su crvenom bojom na slici 59C i D). Pri ovoj pH vrednosti dobija se po obliku najsimetričniji signal klaritromicina ($E_p = -1,64 \text{ V}$ u odnosu na ZKE), a i intenzitet signala je sličan onom koji je dobijen pri pH 7,8.

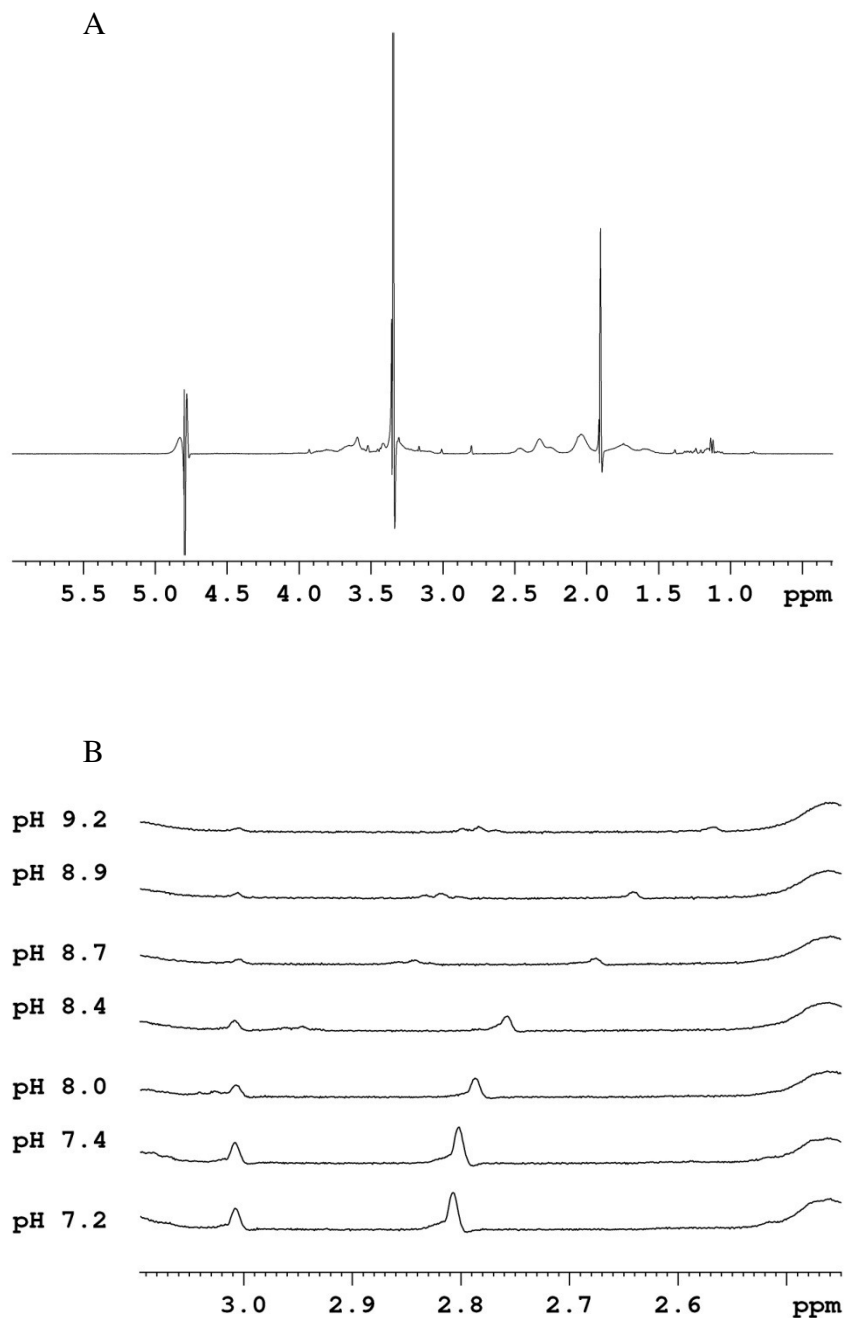
Tokom dalje voltametrijske karakterizacije ispitivanog analita snimani su ciklični voltamogrami pri pH 7,4 u opsegu potencijala od $-0,75 \text{ V}$ do $-2,00 \text{ V}$ pri brzinama skeniranja potencijala od $0,025 \text{ V s}^{-1}$ do $0,45 \text{ V s}^{-1}$ (slika 61). Na cikličnim voltamogramima uočava se prisustvo jednog ireverzibilnog redukcionog pika na potencijalima između $-1,65 \text{ V}$ i $-1,62 \text{ V}$ u zavisnosti od brzine skeniranja potencijala. Na osnovu zavisnosti intenziteta redukcionog pika ispitivanog analita od brzine skeniranja potencijala i kvadratnog korena iz brzine skeniranja potencijala, moguće je utvrditi da li je proces koji se odigrava na elektrodi kontrolisan difuzijom ili adsorpcijom.



Slika 61. Linearna zavisnost intenziteta redukcionog signala klaritromicina (I_p) od v i ilustrativni prikaz dobijenih rezultata u slučaju zavisnosti I_p od $v^{1/2}$. Eksperimentalni uslovi: pH 7,4; v od $0,025 \text{ V s}^{-1}$ do $0,45 \text{ V s}^{-1}$

Na osnovu dobijenih zavisnosti I_p - v i I_p - $v^{1/2}$ jasno se može videti sa slike da je linearna zavisnost postignuta između intenziteta pika i brzine skeniranja potencijala što dokazaju da je proces koji se odigrava na površini elektrode kontrolisan adsorpcijom. Postignuta linearna zavisnost može se opisati sledećom jednačinom: $I_p = 0,0714 [\mu\text{A}] - 0,008 [\mu\text{A}/(\text{mV s}^{-1})] \times v$ ($r = -0,999$).

Radi potvrde da se molekul klaritromicina pri pH 7,4 nalazi u svom protonovanom obliku preko tercijarne amino grupe, snimani su ^1H NMR spektri komercijalne formulacije klaritromicina pri odabranim pH vrednostima pri čemu je praćeno hemijsko pomeranje metilskih protona tercijarne amino grupe. Na slici 62A prikazan je ^1H NMR spektar pri pH 7,4, dok je na slici 62B prikazan uvećan prikaz spektra sa signalom od interesa pri odabranim pH vrednostima.



Slika 62. ^1H NMR spektri klaritromicina pri različitim pH vrednostima Briton-Robinsonovog pufera sa D_2O : A) ^1H NMR spektar klaritromicina pri pH 7,4; B) izdvojeni signali za N,N-dimetil protone pri pH 7,2; 7,4; 8,0; 8,4; 8,7; 8,9 i 9,2

Kao signal od interesa pratimo signal sa hemijskim pomeranjem $\delta_{(\text{H})}$ između 2,84 ppm i 2,57 ppm (tabela 8) u zavisnosti od pH vrednosti. *Awan i dr.* su izvršili asignaciju ^1H NMR

spektra klaritromicina u D₂O puferu (fosfatni pufer pH 7,4) pri čemu je hemijsko pomeranje signala za N,N-dimetil protone 2,84 ppm [140], što je veoma slično sa hemijskim pomeranjem signala od interesa u našem slučaju pri datoj pH vrednosti, ali u našem slučaju za pripremu uzorka korišćen je Briton-Robinsonov pufer.

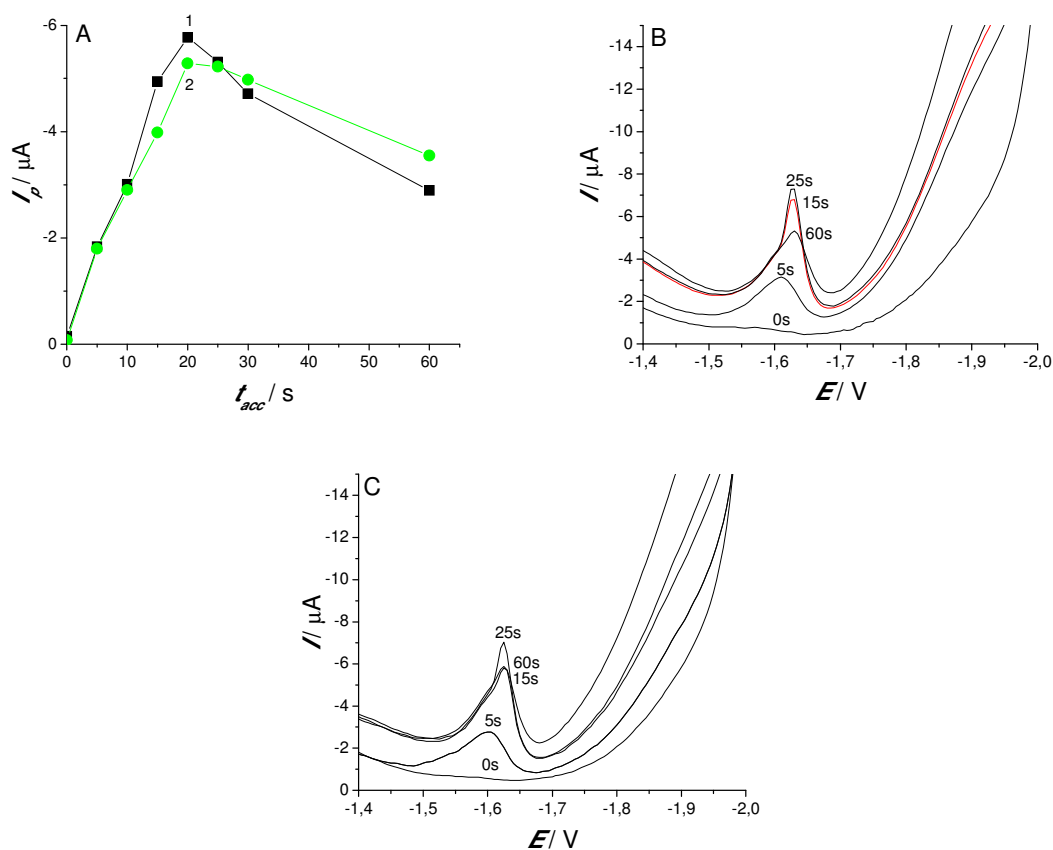
Tabela 8. Vrednosti za hemijska pomeranja signala za N,N-dimetil protone klaritromicina pri odabranim pH vrednostima

pH	$\delta_{(H)}$ [ppm]
6,0	2,84
7,2	2,81
7,4	2,80
8,0	2,79
8,4	2,76
8,7	2,68
8,9	2,64
9,2	2,57

Na osnovu dobijenih vrednosti za hemijska pomeranja signala N,N-dimetil protona pri odabranim pH vrednostima, može se uočiti da se značajnija promena u hemijskom pomeranju signala javlja između pH 8,4 i pH 8,7 što može biti potvrda da se između ovih pH vrednosti vrši deprotonacija klaritromicina i zbog toga se može tvrditi da se pri pH 7,4 molekul klaritromicina nalazi dominantno u njegovom protonovanom obliku.

Nakon odabira optimalne pH vrednosti i utvrđivanja da je proces na površini Hg(Ag)FE kontrolisan adsorpcijom, optimizovani su naredni parametri potencijal i vreme akumulacije koji u velikoj meri utiču na intenzitet signala prilikom primene SW-AdSV metode. Prilikom optimizacije E_{acc} ispitivani su potencijali od -0,50 V do -1,50 V, dok je ispitivano vreme akumulacije bilo od 0 s do 60 s. Optimizacija ovih parametara vršena je pri koncentraciji klaritromicina od 0,79 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Optimizacija E_{acc} vršena je pri $t_{acc} = 10$ s i na osnovu dobijenih rezultata optimizacije može se zaključiti da se najintenzivniji pikovi dobijaju pri -0,50 V; -0,60 V i -0,70 V nakon čega intenzitet signala opada. Međutim prilikom ponavljanja merenja pri istim

uslovima uočeno je da krive snimljene pri navedenim vrednostima E_{acc} ne pokazuju dobru reproduktivnost. Stoga je kao optimalna vrednost potencijala akumulacije odabrana $-1,05$ V pri kojoj se ne dobija tako intenzivan pik ali je reproduktivnost na zadovoljavajućem nivou. Prilikom optimizacije vremena akumulacije (slika 63A) najintenzivniji pik se dobijaju pri $t_{acc} = 20$ s. Mogući razlog zbog kojeg je u slučaju klaritromicina pogodnije duže vreme akumulacije u odnosu na EES jeste što je optimizacija parametara kod klaritromicina vršena pri nižoj koncentraciji pa je neophodno duže vreme da se elektrodna površina zasiti ciljnim analitom. Na slikama 63B i C prikazani su ilustrativni SW voltamogrami ($t_{acc} = 0$ s) i SW-AdS voltamogrami ($t_{acc} = 5$ s; 15 s; 25 s i 60 s) pri odabranim vrednostima E_{acc} ($-1,05$ V i $-1,25$ V). Kriva označena crvenom bojom predstavlja krivu dobijenu pri optimalnim parametrima SW-AdSV metode.



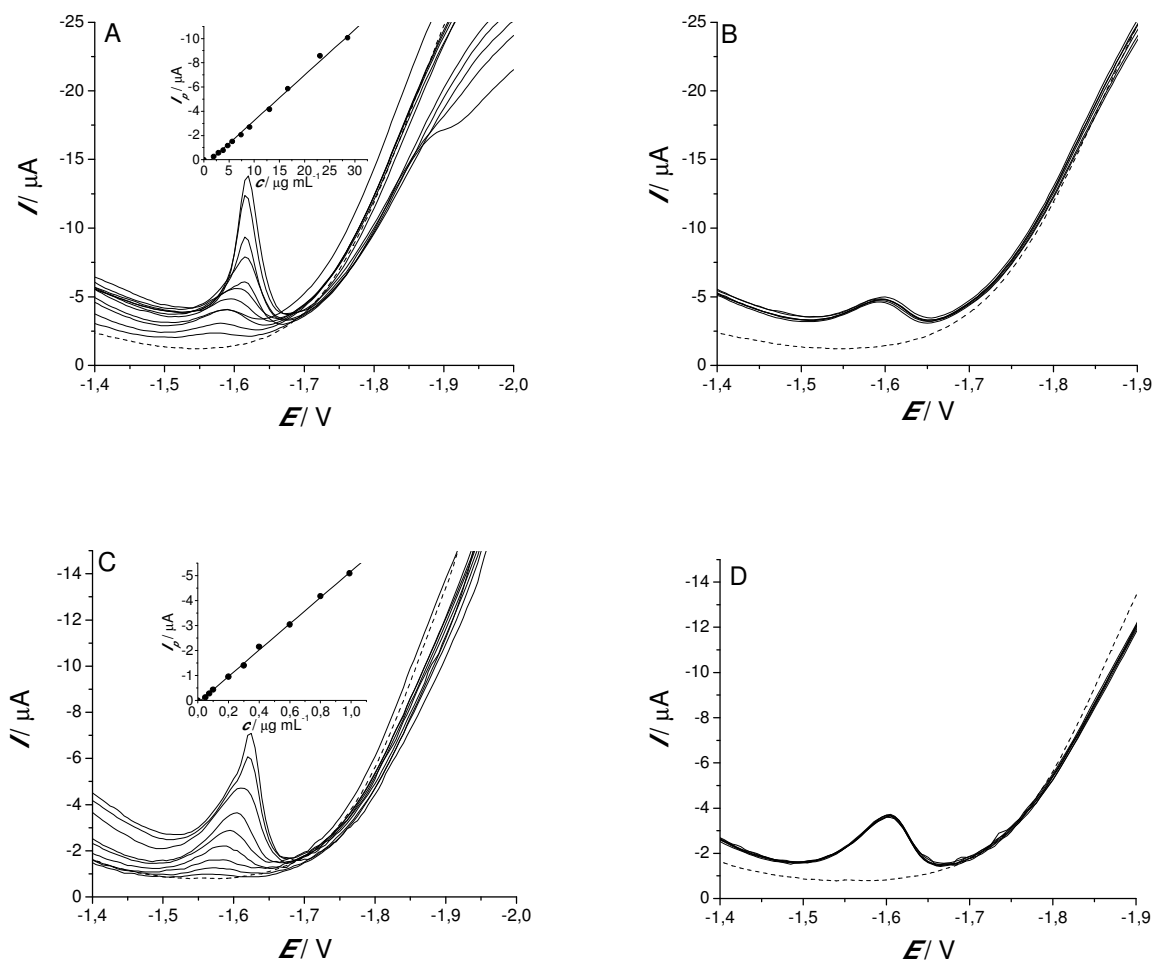
Slika 63. Uticaj potencijala i vremena akumulacije na redukcionni signal klaritromicina ($c = 0,79 \mu\text{g mL}^{-1}$) u Briton-Robinsonovom pomoćnom elektrolitu pH 7,4: A) poređenje vrednosti I_p dobijenih pri različitim vrednostima t_{acc} : 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 i 60 s pri odabranim vrednostima E_{acc} (1) $-1,05$ V i 2) $-1,25$ V). B i C) ilustrativni voltometrijski signali dobijeni pri odabranom potencijalu akumulacije (odgovarajuća vremena akumulacije su označena na krivama u s) na: B) $-1,05$ V i C) $-1,25$ V

Kao optimalni parametri za određivanje klaritromicina primenom SW-AdSV metode odabrani su $E_{acc} = -1,05$ V i $t_{acc} = 15$ s. Ovi parametri su odabrani na osnovu oblika, intenziteta i reproduktivnosti analitičkog signala.

4.1.4.2. Voltametrijsko određivanje u model rastvoru

Posle odabira optimalne pH vrednosti i optimizovanja osnovnih parametara SWV metode razvijena je direktna katodna SW voltametrijska analitička metoda za određivanje klaritromicina. Određivanje je zasnovano na linearnoj zavisnosti intenziteta struje redukcionog pika od koncentracije ispitivanog analita, a u slučaju klaritromicina to je postignuto u opsegu koncentracija od $1,96 \mu\text{g mL}^{-1}$ do $28,6 \mu\text{g mL}^{-1}$. Dobijeni SW voltamogrami u datom opsegu koncentracija prikazani su na slici 64A a kao umetak slike je predstavljena odgovarajuća kalibraciona kriva. Reproductivnost analitičkog signala, izražena preko RSD, ispitana je na osnovu šest uzastopnih merenja pri koncentraciji klaritromicina $5,66 \mu\text{g mL}^{-1}$ pri čemu RSD je 0,44% (slika 64B).

Adsorptivna merenja zasnovana na optimizovanim parametrima vremena i potencijala akumulacije ($E_{acc} = -1,05$ V i $t_{acc} = 15$ s) i ostalim osnovnim parametrima u skladu sa direktnom katodnom SWV metodom primenjena su za razvoj visoko osetljive analitičke metode određivanja klaritromicina u model sistemu. Analitička metoda se takođe zasniva na linearnoj zavisnosti intenziteta struje pika klaritromicina od njegove koncentracije, a to je postignuto u opsegu koncentracije ciljnog analita $0,05$ - $0,99 \mu\text{g mL}^{-1}$. Odgovarajući SW-AdS voltamogrami prikazani su na slici 64C uz pripadajuću kalibracionu krivu. RSD na osnovu šest uzastopnih merenja pri koncentraciji klaritromicina od $0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ je 0,34%. Na slici 64D prikazani su SW-AdS voltamogrami snimljeni prilikom ispitivanja reproduktivnosti analitičkog signala.



Slika 64. Karakteristike razvijenih analitičkih metoda na Hg(Ag)FE u Briton-Robinsonovom puferu pH 7,4: A) SWV signali snimljeni u koncentracionom opsegu klaritromicina $1,96\text{--}28,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ (umetak: odgovarajuća kalibraciona kriva), B) reproduktivnost direktnog SWV analitičkog signala za $5,66 \mu\text{g mL}^{-1}$ klaritromicina (6 ponavljanja), C) SW-AdSV signali u koncentracionom opsegu klaritromicina $0,05\text{--}0,99 \mu\text{g mL}^{-1}$ (umetak: odgovarajuća kalibraciona kriva), D) reproduktivnost SW-AdSV analitičkog signala (6 ponavljanja) pri koncentraciji klaritromicina $0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$. Isprekidane linije prikazuju odgovarajuće voltamograme bazne linije pri pH 7,4

Odgovarajući analitički parametri određivanja klaritromicina u model rastvorima primenom razvijene SWV i SW-AdSV metoda i Hg(Ag)FE dati su u tabeli 9.

Tabela 9. Analitički parametri za direktnu katodnu SWV i SW-AdSV metodu dobijeni primenom Hg(Ag)FE za određivanje klaritromicina

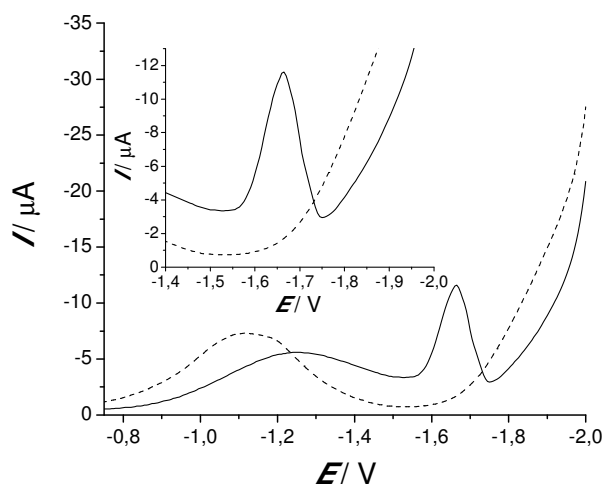
Parametri	Hg(Ag)FE/SWV	Hg(Ag)FE/SW-AdSV
Linearni opseg ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,96-28,6	0,05-0,99
Odsečak (μA)	0,523	0,0879
Nagib ($\mu\text{A mL } \mu\text{g}^{-1}$)	-0,375	-5,262
Koeficijent korelacije	-0,997	-0,999
GD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,59	0,015
GO ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,96	0,05

Na osnovu dobijenih rezultata može se videti da primenom adsorptivne metode granica detekcije je za oko 39 puta manja nego u slučaju direktne SWV metode, mada je direktna metoda primenljivija u širem koncentracionom opsegu klaritromicina.

4.1.5. Voltametrijsko ponašanje roksitromicina i njegovo određivanje u model rastvoru i odabranom farmaceutskom proizvodu

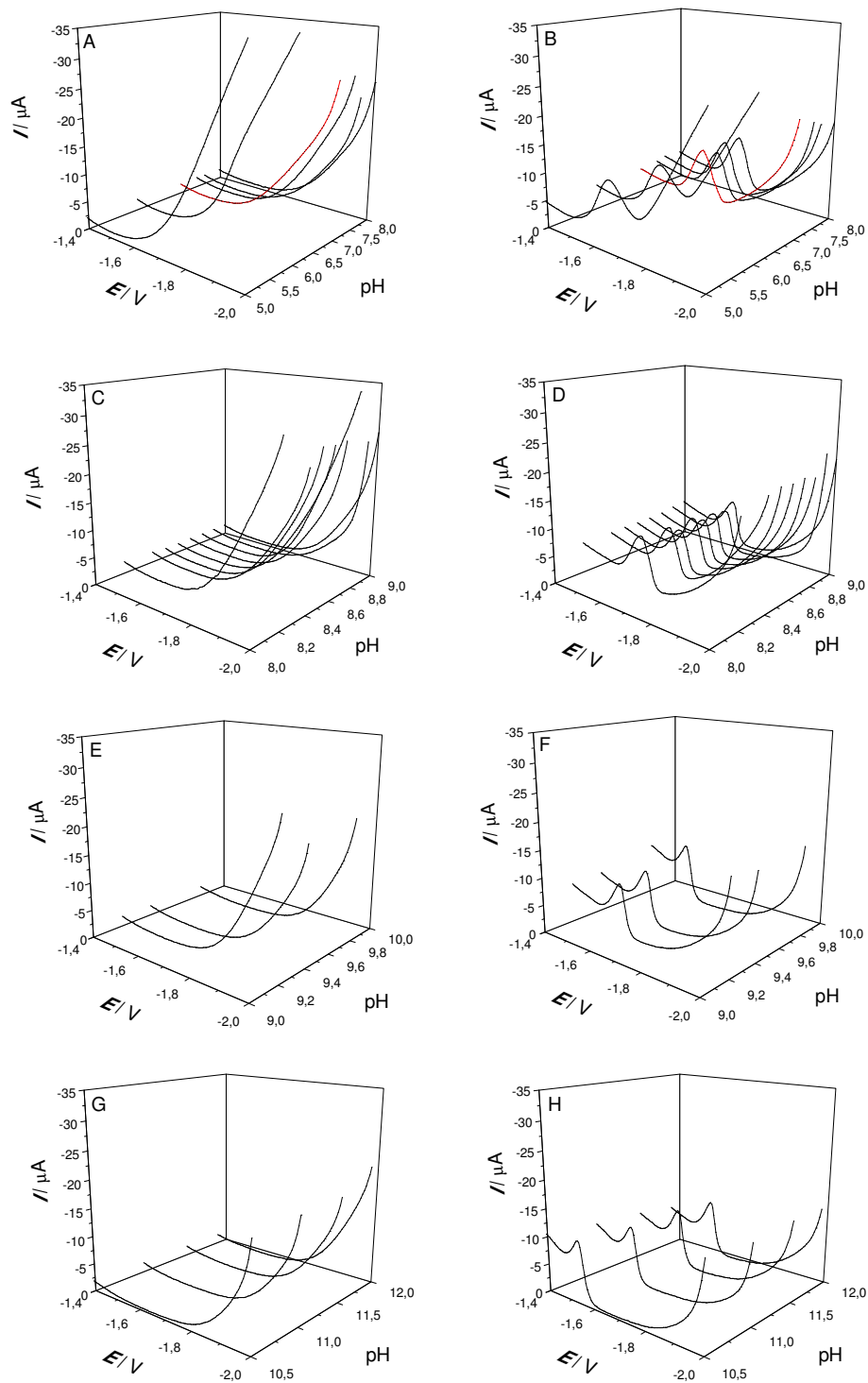
4.1.5.1. Voltametrijska karakterizacija

Kao prvi korak prilikom voltametrijske karakterizacije roksitromicina vršeno je ispitivanje uticaja pH vrednosti sredine na oblik i intenzitet signala roksitromicina u oblasti pH vrednosti sredine od pH 4,0 do pH 11,9. Voltametrijska karakterizacija ciljnog analita sprovedena je primenom SWV metode i Hg(Ag)FE kao radne elektrode. SW voltamogrami su snimani u opsegu potencijala od -0,75 V do -2,00 V. Na slici 65 prikazan je SW voltamogram bazne linije pri pH 7,0 (isprekidana linija) i nakon dodatka $23,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ roksitromicina. Na osnovu snimljenih voltamograma uočava se prisustvo redukcionog pika sa maksimumom na oko -1,2 V kako na baznoj liniji tako i u prisustvu roksitromicina koji je karakterističan za radnu elektrodu. Dodatkom ROX-a obrazuje se redukciono signal sa maksimumom pika na -1,66 V (uvećan prikaz dobijenog redukcionog signala roksitromicina prikazan je kao umetak slike 65).



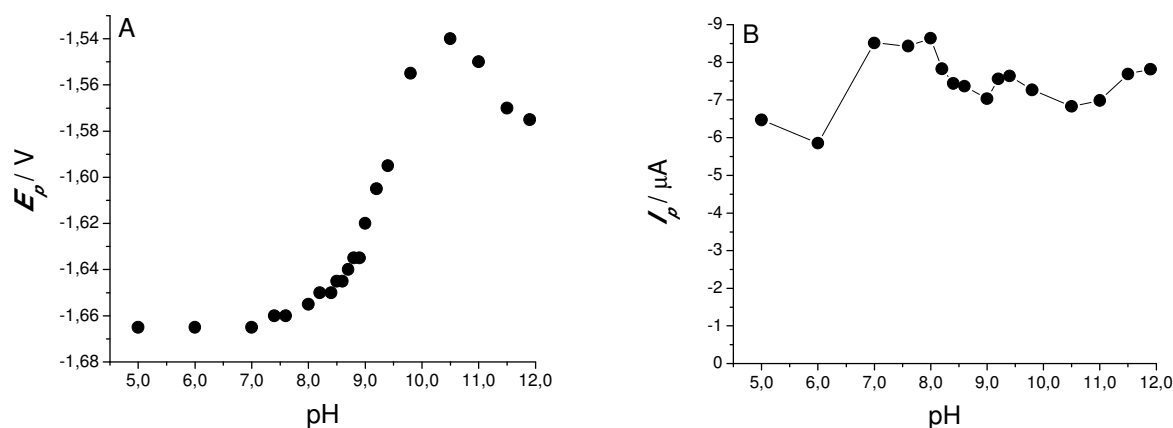
Slika 65. SW voltamogrami bazne linije (isprekidana linija) i roksitromicina pri koncentraciji $23,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (puna linija) u prisustvu Britton-Robinsonovog pufera pH 7,0. Umetak: uvećani prikaz redukcionog signala roksitromicina

Na slikama 66A, C, E i G prikazani su SW voltamogrami slepih proba od pH 5,0 do pH 11,9, a na slikama 66B, D, F i H SW voltamogrami u prisustvu roksitromicina koncentracije $23,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ pri istim pH vrednostima sredine. Na slikama 66A i B prikazani su SW voltamogrami od pH 5,0 do pH 8,0, na slikama 66C i D SW voltamogrami od pH 8,2 do pH 9,0, na slikama 66E i F od pH 9,2 do pH 9,8, i na slikama 66G i H od pH 10,5 do pH 11,9. Pri pH 4,0 uočava se pik koji potiče od redukcije ciljnog analita ali verovatno zbog preklapanja sa signalom redukcije hidronijumovih jona pik od interesa nije jasno definisan. Za razliku od prethodna dva opisana makrolidna antibiotika pri većim pH vrednostima od pH 10,0 ne dolazi do spajanja redukcionog signala koji potiče od roksitromicina sa signalom na baznoj liniji čiji je maksimum na oko -1,2 V i moguće je analizirati dobijene signale za ciljni analit pri ovim većim pH vrednostima sredine.



Slika 66. SW voltamogrami bazne linije snimljeni primenom Hg(Ag)FE u prisustvu Briton-Robinsonovog pufera: pH 5,0-pH 8,0 (A); pH 8,2-pH 9,0 (C); pH 9,2-pH 9,8 (E) i pH 10,5-pH 11,9 (G). Isti rastvori pufera u prisustvu $23,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ roksitromicina (B, D, F i H)

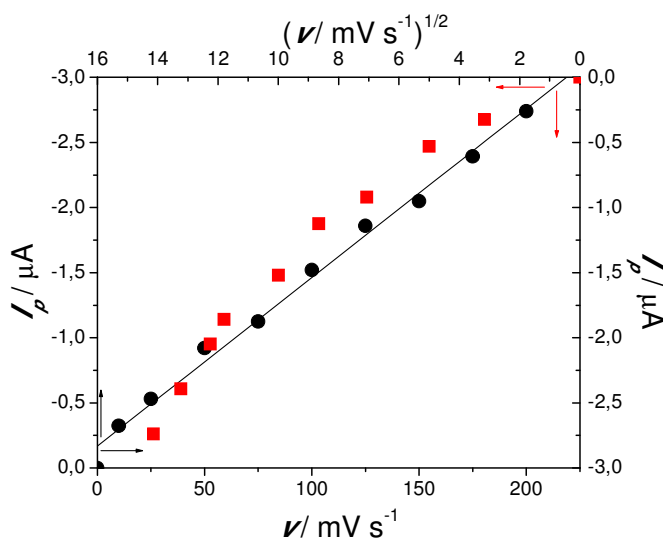
Sa porastom pH vrednosti sredine od pH 5,0 do pH 10,5 dolazi do pomeranja maksimuma pika roksitromicina ka pozitivnijim vrednostima potencijala od -1,66 V do -1,54 V, a pri pH vrednostima većim od pH 10,5 dolazi do blagog pomeranja maksimuma pika ka negativnijim vrednostima potencijala do -1,57 V, što se može videti sa slike 67A. Odgovarajuća E_p -pH zavisnost u opsegu pH vrednosti od pH 7,0 do pH 9,8 može se opisati sa dve jednačine jer dolazi do promene nagiba krive pri pH 8,4: $E_p = -1,744 \text{ [V]} + 0,011 \text{ [V/pH]} \times \text{pH}$ ($r = 0,980$) od pH 7,0 do pH 8,4 i $E_p = -2,222 \text{ [V]} + 0,067 \text{ [V/pH]} \times \text{pH}$ ($r = 0,979$) od pH 8,4 do pH 9,8. pH vrednost pri kojoj dolazi do promene nagiba krive zavisnosti E_p -pH relativno je bliza vrednostima $\text{p}K_k$ za roksitromicin koja po literaturnim podacima iznosi $\text{p}K_k = 8,82 \pm 0,04$ [178] odnosno $\text{p}K_k = 9,2$ [179-182]. Stoga, može se smatrati da se molekul roksitromicina pri pH vrednostima nižim od pH 8,4 nalazi u svom protonovanom obliku.



Slika 67. E_p -pH (A) i I_p -pH (B) zavisnost signala roksitromicina pri koncentraciji $23,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ u Briton-Robinson pomoćnom elektrolitu od pH 5,0 do pH 11,9

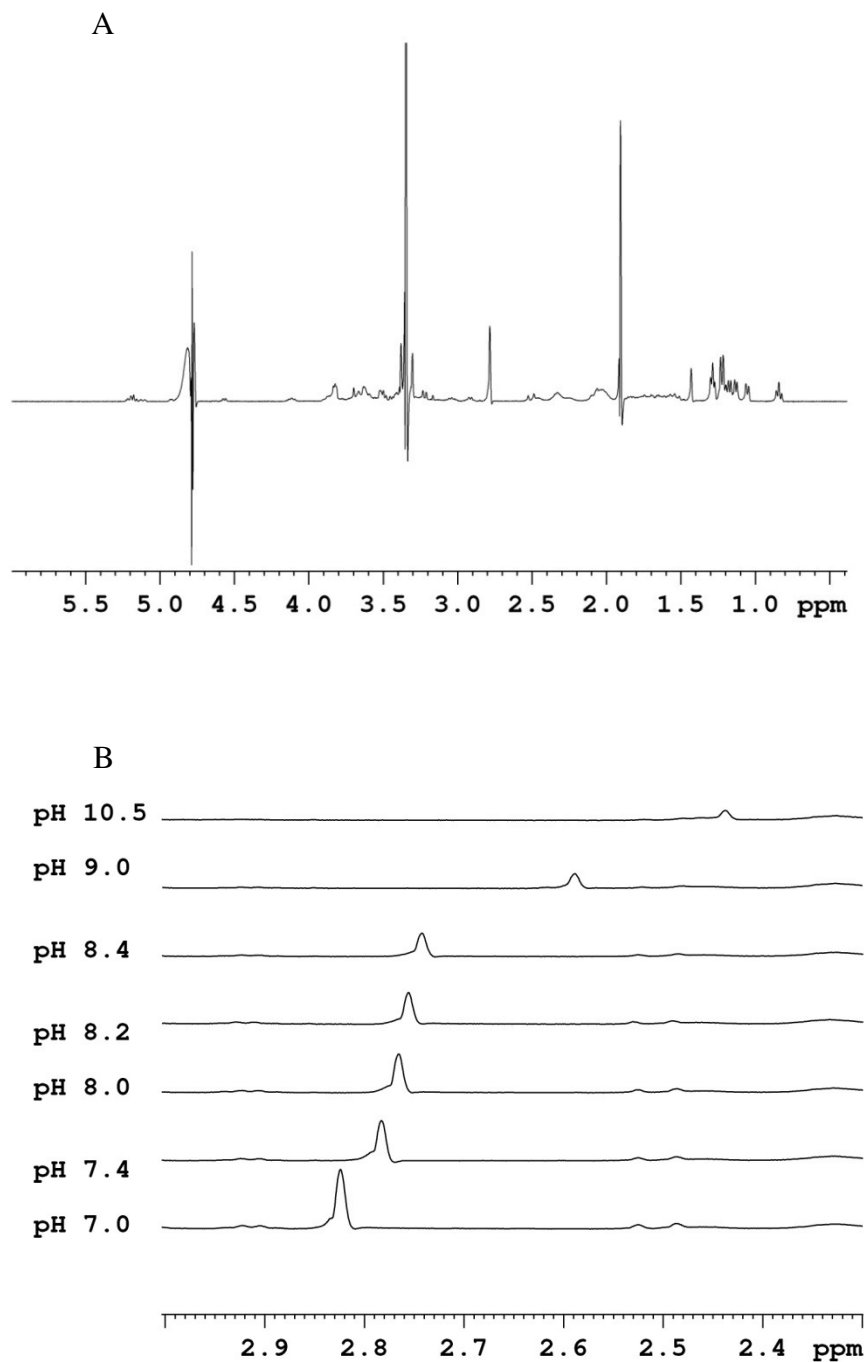
Na slici 67B prikazana je zavisnost intenziteta redukcionog pika ROX-a od pH vrednosti sredine (od pH 5,0 do pH 11,9). Na osnovu dobijenih rezultata može se uočiti da se najintenzivniji signali ciljnog analita javljaju u oblasti pH vrednosti od pH 7,0 do pH 8,0. Na osnovu oblika i intenziteta pika roksitromicina, za dalja određivanja ciljnog analita kao optimalna pH vrednost odabrana je pH 7,0 pri kojoj se analitički signal ispitivanog analita javlja na potencijalu -1,67 V u odnosu na ZKE (SW voltamogrami označeni crvenom bojom na slici 66C i D).

U cilju ispitivanja moguće adsorpcije roksitromicina na površini Hg(Ag)FE snimani su ciklični voltamogrami u opsegu potencijala od -0,75 V do -2,00 V pri brzinama skeniranja potencijala od 0,01 V s⁻¹ do 0,2 V s⁻¹. Linearna zavisnost intenziteta redukcionog pika roksitromicina od ν kao i ilustrativni prikaz zavisnosti intenziteta redukcionog pika ciljnog analita od $\nu^{1/2}$ prikazane su na slici 68. Dobijena linearna zavisnost intenziteta pika od brzine skeniranja ukazuje da proces koji se odigrava na površini Hg(Ag)FE je kontrolisan adsorpcijom i može se opisati sledećom jednačinom: $I_p = -0,167 [\mu\text{A}] - 0,013 [\mu\text{A}/(\text{mV s}^{-1})] \times \nu$ ($r = -0,996$).



Slika 68. Linearna zavisnost intenziteta redukcionog signala roksitromicina (I_p) od ν i ilustrativni prikaz zavisnosti I_p roksitromicina od $\nu^{1/2}$. Eksperimentalni uslovi: pH 7,0; ν od 0,01 V s⁻¹ do 0,2 V s⁻¹

Kao i u slučaju prethodna tri makrolidna antibiotika, radi potvrde da se molekul roksitromicina pri pH 7,0 nalazi u protonovanom obliku, snimani su ¹H NMR spektri pri odabranim pH vrednostima (pH 7,0; 7,4; 8,0; 8,2; 8,4; 9,0 i 10,5) pri čemu su praćena hemijska pomeranja N,N-dimetil protona. ¹H NMR spektar komercijalne formulacije roksitromicina pri pH 7,0 prikazan je na slici 69A, dok su uvećani prikazi spektara sa signalom od interesa pri različitim pH vrednostima prikazani na slici 69B. Asignaciju ¹H NMR spektra roksitromicina u D₂O izvršili su **Gharbi-Benarous i dr.** i na osnovu njihovih rezultata hemijsko pomeranje za signale N,N-dimetil protona je 2,63 ppm [141]. Eksperimentalno dobijene vrednosti za hemijska pomeranja signala od interesa pri odabranim pH vrednostima predstavljene su u tabeli 10.



Slika 69. ^1H NMR spektri roksitromicina pri različitim pH vrednostima Briton-Robinsonovog pufera sa D_2O : A) ^1H NMR spektar roksitromicina pri pH 7,0; B) izdvojeni signali za N,N -dimetil protone pri pH 7,0; 7,4; 8,0; 8,2; 8,4; 9,0 i 10,5

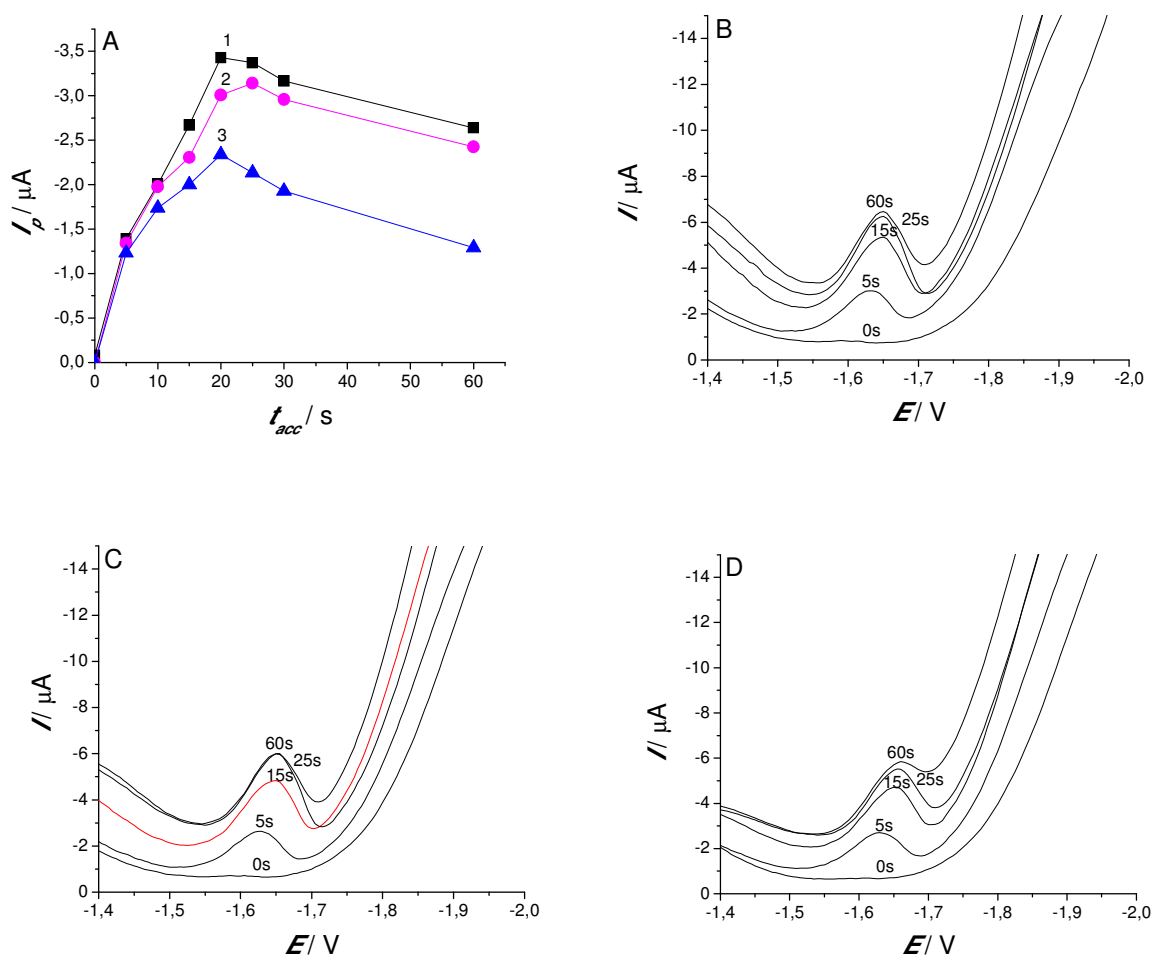
Sa slike 69B uočava se značajnije hemijsko pomeranje signala od interesa između pH 8,4 i pH 9,0 što ukazuje na moguću deprotonaciju molekula roksitromicina.

Tabela 10. Vrednosti za hemijska pomeranja signala za N,N-dimetil protone roksitromicina pri odabranim pH vrednostima

pH	$\delta_{(H)}$ [ppm]
6,0	2,84
7,0	2,82
7,4	2,78
8,0	2,77
8,2	2,76
8,4	2,74
9,0	2,59
10,5	2,44
11,0	2,47

Na osnovu dobijenih vrednosti za hemijska pomeranja signala N,N-dimetil protona može se tvrditi da se molekul roksitromicina nalazi u protonovanom obliku pri pH 7,0 što olakšava adsorpciju molekula na negativno polarizovanoj površini Hg(Ag)FE.

Nakon utvrđivanja da je proces koji se odigrava na površini radne elektrode kontrolisan adsorpcijom primenom ciklične voltametrije, optimizovani su parametri SW-AdSV metode, E_{acc} i t_{acc} pri pH 7,0 i koncentraciji roksitromicina $0,79 \mu\text{g mL}^{-1}$. Potencijal akumulacije ispitivan je u opsegu potencijala od -0,50 V do -1,45 V pri vremenu akumulacije od 10 s. Na osnovu dobijenih rezultata intenzivniji pikovi se dobijaju pri potencijalima od -0,50 V do -1,00 V, nakon čega intenzitet signala blago opada. Kao i u slučaju klaritromicina pri pozitivnijim vrednostima potencijala akumulacije dobijaju se relativno nereproduktivni signali, stoga je optimizacija vremena akumulacije vršena na negativnijim potencijalima, odnosno pri $E_{acc} = -1,00$ V (1); -1,05 V (2) i -1,25 V (3). Na slici 70A prikazana je zavisnost intenziteta pika od primenjenog vremena akumulacije (0; 5; 10; 15; 20; 25; 30 i 60 s) a na slikama 70B-D prikazani su ilustrativni voltamogrami dobijeni primenom SWV ($t_{acc} = 0$ s) i SW-AdSV metode ($t_{acc} = 5; 10; 15; 20; 25; 30$ i 60 s) pri odabranim potencijalima akumulacije.

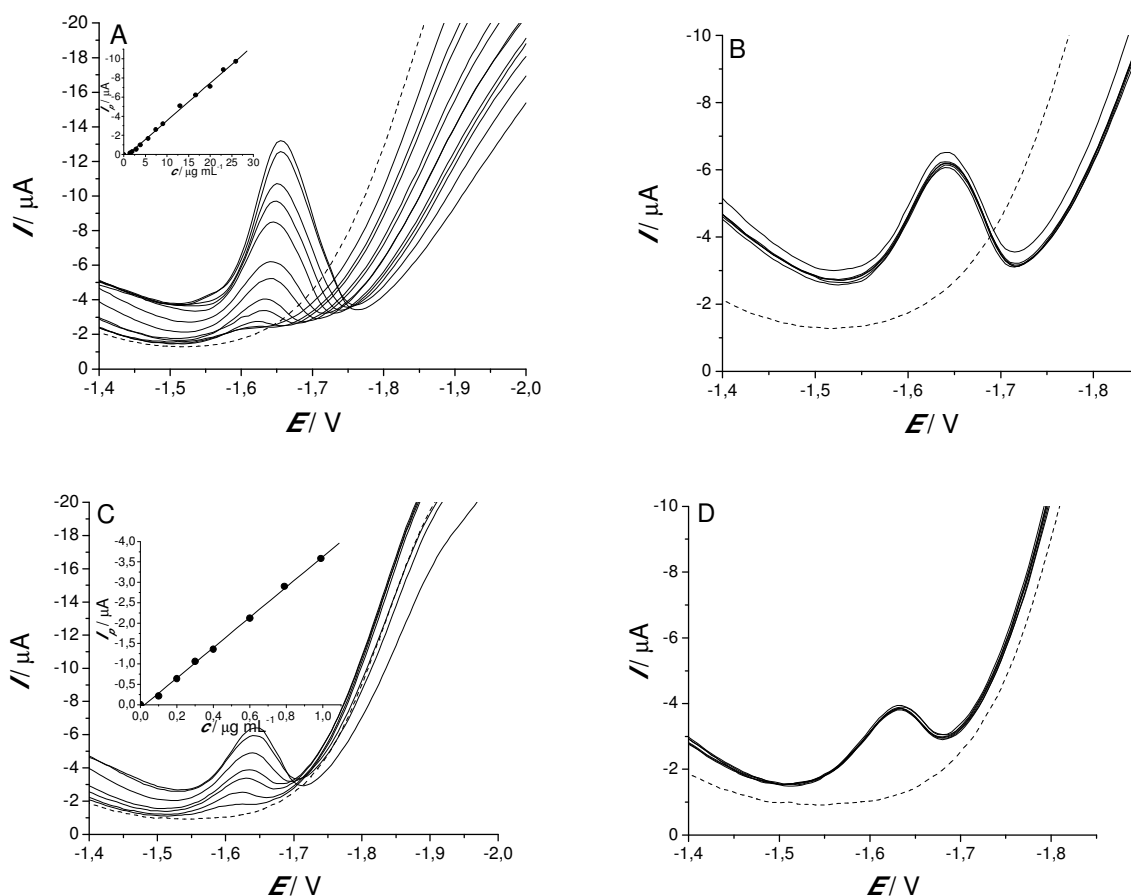


Slika 70. Uticaj potencijala i vremena akumulacije na redukcionu signal roksitromicina ($c = 0,79 \mu\text{g mL}^{-1}$) u Briton-Robinsonovom pomoćnom elektrolitu pH 7,0: A) poređenje vrednosti I_p dobijenih pri različitim vrednostima t_{acc} : 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 i 60 s pri odabranim vrednostima E_{acc} (1) $-1,00 \text{ V}$, 2) $-1,05 \text{ V}$ i 3) $-1,25 \text{ V}$. B-D) ilustrativni voltametrijski signali dobijeni pri odabranom potencijalu akumulacije (odgovarajuća vremena akumulacije su označena na krivama u s) na: B) $-1,00 \text{ V}$, C) $-1,05 \text{ V}$ i D) $-1,25 \text{ V}$

Kao optimalni uslovi za razvoj visoko osetljive analitičke metode određivanja roksitromicina primenom SW-AdSV metode odabrani su $E_{acc} = -1,05 \text{ V}$ i $t_{acc} = 15 \text{ s}$. SW-AdS voltamogram dobijen pri optimalnim uslovima prikazan je na slici 70C crvenom bojom.

4.1.5.2. Voltometrijsko određivanje u model rastvoru

Nakon optimizacije osnovnih operativnih parametara SWV i SW-AdSV protokola vršeno je ispitivanje linearne oblasti rada analitičkih metoda u model rastvoru roksitromicina. Na slici 71A prikazani su SW voltamogrami sa odgovarajućom kalibracionom krivom u opsegu koncentracija ispitivanog analita od $1,48 \mu\text{g mL}^{-1}$ do $25,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ dok su na slici 71C prikazani SW-AdS voltamogrami u opsegu koncentracija od $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ do $0,99 \mu\text{g mL}^{-1}$ sa odgovarajućom kalibracionom krivom.



Slika 71. Karakteristike razvijenih analitičkih metoda na Hg(Ag)FE u Briton-Robinsonovom puferu pH 7,0: A) SWV signali u koncentracionom opsegu roksitromicina $1,48\text{--}25,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ (umetak: odgovarajuća kalibraciona kriva), B) reproduktivnost SWV analitičkog signala za $9,09 \mu\text{g mL}^{-1}$ roksitromicina (6 ponavljanja), C) SW-AdSV signali u koncentracionom opsegu roksitromicina $0,1\text{--}0,99 \mu\text{g mL}^{-1}$ (umetak: odgovarajuća kalibraciona kriva), D) reproduktivnost SW-AdSV analitičkog signala (6 ponavljanja) pri koncentraciji roksitromicina $0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$.
Isprekidane linije prikazuju odgovarajuće voltamogramе bazne linije pri pH 7,0

Odgovarajući analitički parametri određivanja roksitromicina primenom optimizovanih metoda dati su u tabeli 11.

Ispitana je reproduktivnost signala roksitromicina primenom SWV (slika 71B) i SW-AdSV (slika 71D) metode na osnovu šest uzastopnih merenja pri koncentraciji ispitivanog analita $9,09 \mu\text{g mL}^{-1}$ odnosno $0,40 \mu\text{g mL}^{-1}$. RSD prilikom primene optimizovane SWV i SW-AdSV iznosi 0,88%.

Tabela 11. Analitički parametri za direktnu katodnu SWV i SW-AdSV metodu dobijeni primenom Hg(Ag)FE za određivanje roksitromicina

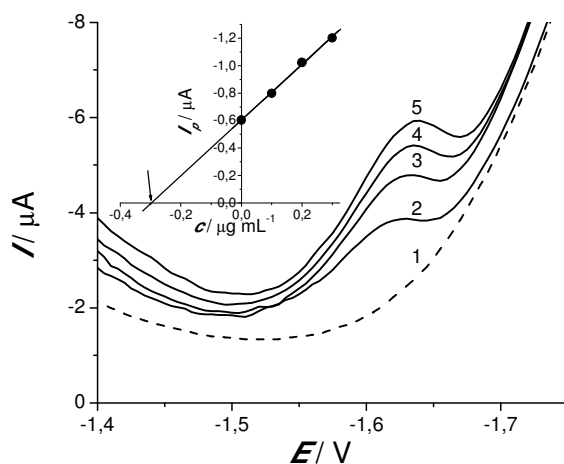
Parametri	Hg(Ag)FE/SWV	Hg(Ag)FE/SW-AdSV
Linearni opseg ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,48-25,9	0,10-0,99
Odsečak (μA)	0,376	0,085
Nagib ($\mu\text{A mL } \mu\text{g}^{-1}$)	-0,391	-3,713
Koeficijent korelacije	-0,998	-0,999
GD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,44	0,03
GO ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,48	0,10

Na osnovu dobijenih rezultata može se videti da se adsorpcijom molekula roksitromicina na površinu Hg(Ag)FE snižava granica detekcije za oko 15 puta. Primenom direktne katodne SWV postignuta je linearnost u širem koncentracionom opsegu roksitromicina nego što je to slučaj primenom SW-AdSV, a reproduktivnost analitičkog signala ispitivanog analita je identična primenom optimizovane SWV i SW-AdSV metode.

4.1.5.3. Voltametrijsko određivanje u odabranom farmaceutskom proizvodu

Primenom optimizovane SW-AdSV metode i Hg(Ag)FE, određivan je sadržaj roksitromicina u rastvoru komercijalne formulacije Runac[®], pri pH 7,0 (slika 72). U vezi detalja pripreme uzorka videti u Eksperimentalnom delu. Nakon snimanja bazne linije (kriva 1) i voltamograma komercijalne formulacije, pri čemu je koncentracija roksitromicina u voltametrijskoj ćeliji iznosila $0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ po deklaraciji proizvođača (kriva 2), dodata su tri

standardna dodatka (krive 3-5) tako da su konačne koncentracije standardnih dodataka roksitromicina u voltometrijskoj ćeliji u opsegu 0,10-0,30 $\mu\text{g mL}^{-1}$.



Slika 72. *Određivanje koncentracije roksitromicina u farmaceutskom preparatu Runac[®] primenom metode standardnog dodatka. SW-AdS voltamogrami bazne linije (1), uzorka komercijalne formulacije (2) i tri standardna dodatka roksitromicina (3-5, konačne koncentracije standardnih dodataka u voltometrijskoj ćeliji: 0,10, 0,20 i 0,30 $\mu\text{g mL}^{-1}$) i odgovarajuća analitička prava prikazana kao umetak*

Određen sadržaj roksitromicina je 0,297 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (umetak slike 72). Na osnovu tri ponovljena merenja sadržaj roksitromicina po tableti je 148,8; 150,3 i 149,3 mg pri čemu je srednja vrednost 149,5 mg/tableti što je u dobroj saglasnosti sa deklarisanim sadržajem roksitromicina (150 mg/tableti). RSD analitičkog signala iznosi 0,5%. Razvijena analitička metoda ispunjavaju osnovne kriterijume Evropske farmakopeje 8 [170] u pogledu greške u tačnosti merenja i na osnovu dobijenih rezultata potvrdila je da se u analiziranoj tableti nalazi deklarisan sadržaj roksitromicina.

Sumirajući dobijene rezultate voltometrijskog ispitivanja i određivanja odabranih antibiotika zasnovanog na njihovoj redukciji primenom Hg(Ag)FE možemo zaključiti da se antraciklični antibiotik redukuje u umereno negativnoj oblasti potencijala, a četiri makrolidna antibiotika u daleko negativnoj oblasti potencijala, što se može prepisati njihovim različitim tipovima elektroaktivnih centara. Svi ispitivani antibiotici u svojim protonovanim formama, u slučaju DOX-a preko primarnog amina, dok kod četiri istraživanih makrolidnih antibiotika preko

njihovih tercijarnih amino grupa, pokazuju afinitet adsorpcije na adekvatno negativno polarizovanoj Hg(Ag)FE. U slučaju DOX-a kompleksni, relativno hidrofobni aromatični sistem, na negativnijim potencijalima verovatno daje i repulsivnu interakciju i shodno tome pogodni potencijali akumulacije/adsorpcije se nalaze u dosta umerenoj negativnoj oblasti akumulacionih potencijala. U slučaju četiri proučavana makrolidna antibiotika izražena lipofilna osobina i njihova jonska molekulska forma su glavni promotori adsorpcije i kod ispitivanih jedinjenja potencijali pogodne akumulacije tj. one potencijalske vrednosti koje pogoduju adsorpciji se nalaze signifikantnije u negativnoj oblasti potencijala. Kod svih navedenih antibiotika razvijene adsorptivne metode u kombinaciji sa pogodnom pulsnom tehnikom voltametrijskog određivanja signifikatno povećavaju osetljivost detekcije i određivanja. Jednostavni operativni koraci obnavljanja površine Hg(Ag)FE takođe doprinose tome da se uzastopna adsorptivna merenja sprovode jednostavno i brzo bez potrebe premeštanja elektrode u drugu sredinu radi mehaničke ili druge metode obnavljanja površine. Razvijene metode su uspešno primenjene za određivanje odabranih antibiotika u model i realnim uzorcima.

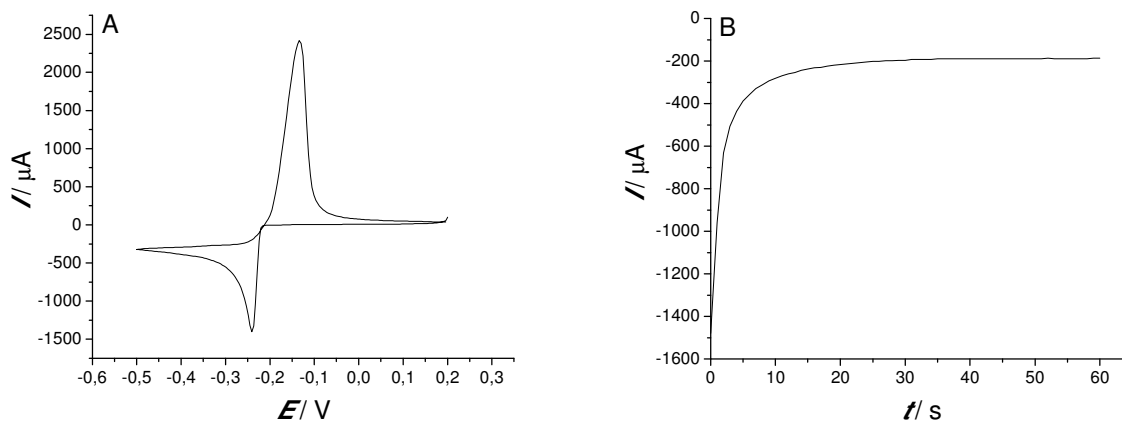
Sažetak u vezi gore navedenih rezultata voltametrijske karakterizacije i određivanja azitromicina, klaritromicina i roksitromicina primenom Hg(Ag)FE elaboriran je u nedavno objavljenom naučnom radu sa SCI liste [183].

4.2. Voltametrijsko ponašanje 3-dehidro-deoksiholne kiseline i njeno određivanje u model rastvoru primenom *ex situ* pripremljene bizmut-film elektrode

De Lima i Spinelli su ispitivali elektrohemijsko ponašanje progesterona primenom *ex situ* bizmut-film elektrode i uočeno je prisustvo redukcionog pika koji potiče od ciljnog analita [122]. S obzirom na činjenicu da progesteron pripada grupi steroida kao i žučne kiseline i da sintetisana 3-DH-DHK ima sličnu strukturu i keto grupu u položaju C3 kao i progesteron, vršeno je ispitivanje primenljivosti *ex situ* bizmut-film elektrode za voltametrijsko određivanje sintetisane 3-DH-DHK.

4.2.1. Priprema *ex situ* bizmut-film elektrode, osnovno voltametrijsko ponašanje elektrode i voltametrijska karakterizacija 3-dehidro-deoksiholne kiseline

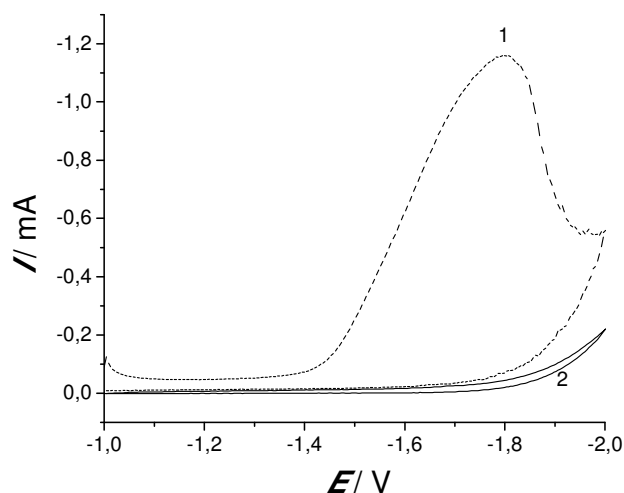
Za voltametrijska merenja, BiF-GCE je pripremljena tako što je vršena elektrodepozicija bizmut-filma na površini elektrode od staklastog ugljenika, u skladu sa ranije elaboriranim *ex situ* protokolom [128,184]. Kao prvo snimljen je ciklični voltamogram primenom GCE u rastvoru za elektrodepoziciju koji sadrži $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ rastvor $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$, $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ HCl i $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ KBr u opsegu potencijala od $0,20 \text{ V}$ do $-0,50 \text{ V}$ (slika 73A) kako bi se optimizovali uslovi izdvajanja bizmut-filma na površini elektrode. Na osnovu CV na kojem se uočava maksimum redukcionog pika Bi(III) na $-0,24 \text{ V}$, u odnosu na ZKE bizmut-film je izdvajanje na površini radne elektrode primenom hronoamperometrije na potencijalu $-0,24 \text{ V}$ u toku 60 s u mirnom rastvoru. Hronoamperogram izdvajanja bizmut-filma na površinu GCE prikazan je na slici 73B.



Slika 73. Ciklični voltamogram rastvora za elektrodepoziciju ($0,02 \text{ mol L}^{-1} \text{ Bi}(\text{NO}_3)_3 + 1,0 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl} + 0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ KBr}$) $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ (A) i odgovarajući hronoamperogram izdvajanja bizmut-filma na površini GCE na potencijalu $-0,24 \text{ V}$ u toku 60 s

Nakon *ex situ* izdvajanja bizmut-filma na površini GCE i detaljnog pranja BiF-GCE senzorkse površine u $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ rastvoru HCl-a po već ranije opisanom protokolu [184], ispitivano je voltametrijsko ponašanje pripremljene elektrode u Briton-Robinsonovom puferu pri odabranim pH vrednosti. Ciklični voltamogram snimljen pri pH 11,8 pokazuje dominantan redukcioni pik u oblasti potencijala od $-1,40 \text{ V}$ do $-2,00 \text{ V}$ sa maksimumom pika na oko $-1,7 \text{ V}$

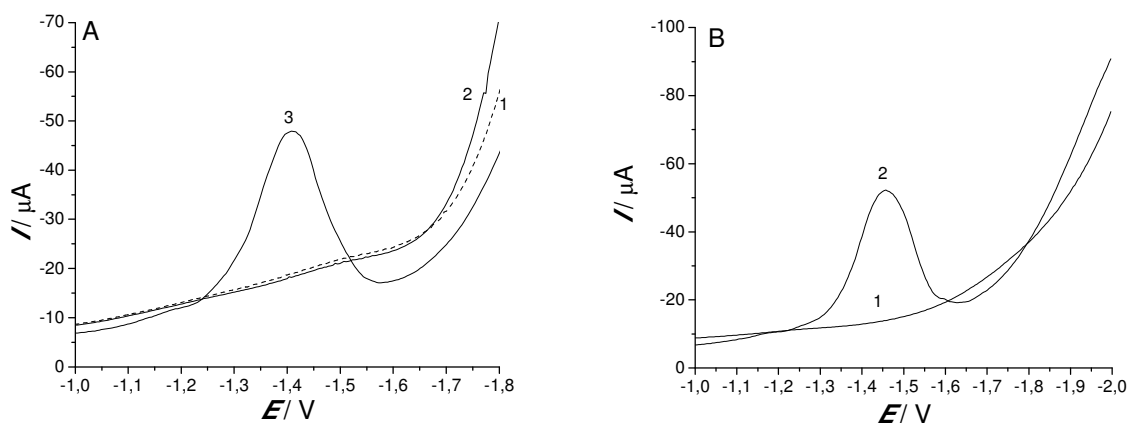
(slika 74, kriva 1), slično kao i u slučaju ranije objavljenog/predstavljenog signala pri pH 8,0 [128]. Sa povećanjem broja uzastopnog cikliranja, intenzitet signala opada, već drugi snimljen CV ima znatno manji intenzitet redukcionog pika i nakon 15 snimljenih uzastopnih CV-a, u toku predtretmana elektrode, pomenuti redukциони pik se ne prepoznaje na CV-u (slika 74, kriva 2).



Slika 74. Ciklični voltamogrami BiF-GCE u Britton-Robinsonovom puferu pH 11,8. Prvi CV (kriva 1) i 15. CV (kriva 2)

Ovaj fenomen se može objasniti činjenicom da se prilikom kondicioniranja elektrode bizmut-film čisti od oksidnih formi, a i dodatno, može se pretpostaviti da dolazi do preuređivanja bizmut čestica na površini elektrode, što je u saglasnosti sa ranije opisanim ponašanjem BiF-GCE pri pH 7,0 [184].

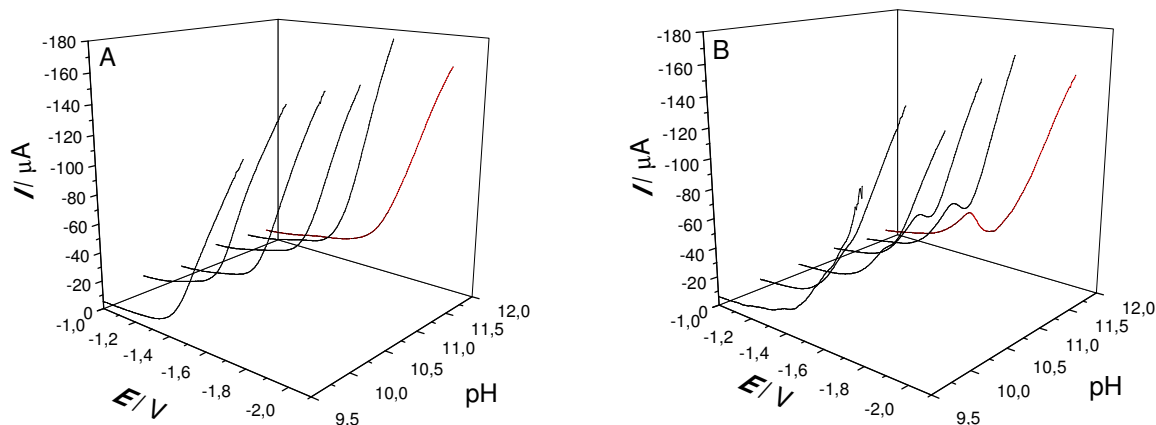
Inicijalna SW-AdSV merenja u Britton-Robinsonovom puferu pH 11,8 ukazuju na činjenicu da nakon takvog kondicioniranja elektrode bazna linija/slepa proba nema uočljiv redukциони signal u ispitivanoj oblasti potencijala (slika 75A, kriva 1) i da dodatkom 3,0 mL Britton-Robinsonovog pufera u svojstvu slepe probe ne dolazi do promene bazne linije (slika 75A, kriva 2). Nakon dodatka $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ 3-DH-DHK uočava se prisustvo redukcionog pika ispitivanog analita na potencijalu oko -1,4 V (slika 75A, kriva 3).



Slika 75. SW-AdS voltamogrami u Briton-Robinsonovom puferu pH 11,8 snimljeni primenom BiF-GCE (A):kriva 1: 17,0 mL pufera; kriva 2: nakon dodatka još 3,0 mL istog pufera; kriva 3: nakon dodatka $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ 3-DH-DHK. SW-AdS voltamogrami pri koncentraciji $28,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ 3-DH-DHK (B): kriva 1: primenom GCE; kriva 2: primenom BiF-GCE

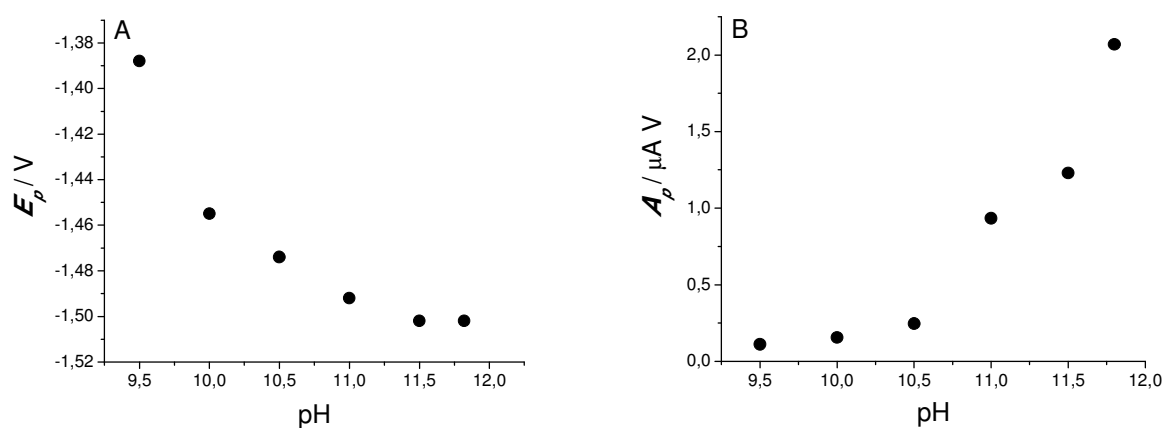
Na osnovu dobijenih SW-AdSV voltamograma prikazanih na slici 75B može se videti da bizmut-film izdvojen na površini GCE omogućava detekciju redukcionog signala 3-DH-DHK (kriva 2) u obliku 3-dehidro-deoksiholata, dok to nije slučaj u vezi nemodifikovane GCE na kojem se pri istim uslovima rada i ne uočava redukциони pik (kriva 1).

Primenom SW-AdSV vršeno je ispitivanje uticaja pH vrednosti sredine na oblik i intenzitet signala 3-DH-DHK (slika 76). Pri svakoj primenjenoj pH vrednosti prvo je vršeno cikliranje elektrode u rastvoru odgovarajućeg pufera (minimum 15 ciklusa pri brzini skeniranja od $0,25 \text{ V s}^{-1}$, u opsegu potencijala od -1,00 V do -1,80 V), a nakon toga su snimani SW-AdS voltamogrami (slika 76A). Ispitivanje je vršeno pri koncentraciji 3-DH-DHK od $12,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ (slika 76B).



Slika 76. SW-AdSV snimljeni primenom BiF-GCE: A) Briton-Robinson pomoćni elektrolit od pH 9,5 do pH 11,8 i B) isti rastvori pufera u prisustvu $12,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ 3-DH-DHK

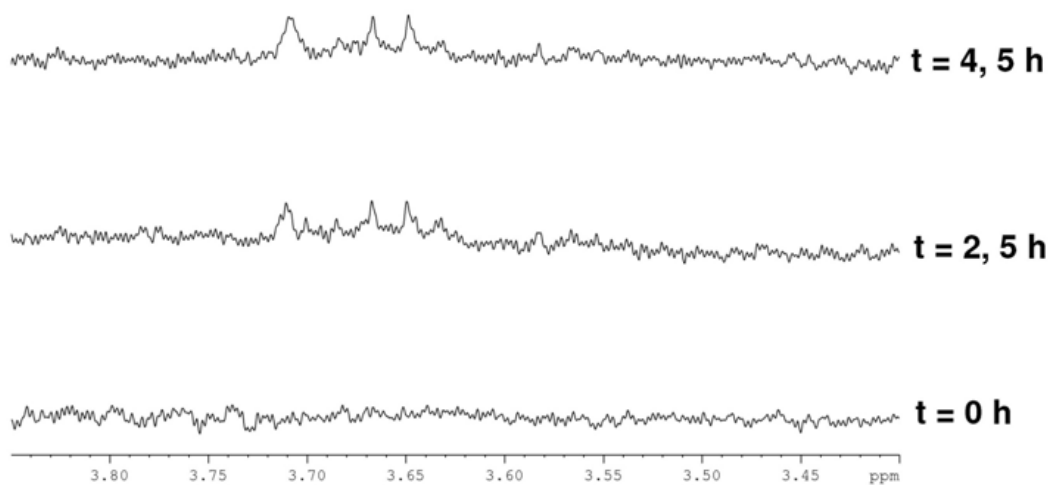
Kao što se sa slike 76B može videti pri pH vrednosti 9,5 dolazi do formiranja redukcionog pika ispitivanog analita veoma malog intenziteta, a treba napomenuti to da pri pH vrednostima nižim od pH 9,5 pik ciljnog analita je manjeg intenziteta i reproduktivnost analitičkog signala pri tim pH vrednostima je ispod vrednosti potrebnih za pouzdanu analitičku metodu. Na osnovu potencijala pika i intenziteta površine redukcionog pika 3-DH-DHK konstruisane su odgovarajuće E_p -pH i A_p -pH zavisnosti koje su prikazane na slici 77.



Slika 77. E_p -pH (A) i A_p -pH (B) zavisnost signala 3-DH-DHK ($c = 12,4 \mu\text{g mL}^{-1}$) u Briton-Robinson pomoćnom elektrolitu od pH 9,5 do pH 11,8

Na osnovu dobijene E_p -pH zavisnosti (slika 77A) može se videti da se maksimum pika pomera ka negativnijim vrednostima potencijala sa porastom pH vrednosti sredine od pH 9,5 do pH 11,5 nakon čega uglavnom ne dolazi do pomeranja maksimuma pika. Nagib linearnog dela zavisnosti E_p -pH je $-66,1 \text{ mV/pH}$ ($r = 0,91$) što je analogno sa ranije objavljenom vrednosti za nagib E_p -pH zavisnosti u slučaju redukcije progesterona koji u svojoj strukturi takođe sadrži okso grupu u poziciji C3 [122]. Na osnovu dobijene vrednosti za nagib može se pretpostaviti da u procesu redukcije učestvuje isti broj protona i elektrona.

U narednom eksperimentu praćen je i tok elektrolize 3-DH-DHK primenom ^1H NMR tehnike. Elektroliza je vršena na ploči elektrode od staklastog ugljenika površine $35,32 \text{ cm}^2$ na koji je izdvojen bizmut-film istim postupkom kao i kod voltametrijskih merenja samo je izdvajanje vršeno na potenciju $-0,415 \text{ V}$ i u toku 180 s. Rastvor ispitivanog analita je pripremljen rastvaranjem 3-DH-DHK u smeši Briton-Robinson pufer pH 11,8 i D_2O u odnosu 62,5%:37,5% (V/V), tako da je koncentracija ispitivanog analita $1171,6 \mu\text{g mL}^{-1}$. Elektroliza je vršena na potencijalu $-1,55 \text{ V}$ u toku 5 h. Na slici 78 prikazani su ^1H NMR spektri 3-DH-DHK pre početka elektrolize ($t = 0$), nakon 2,5 h i nakon 4,5 h elektrolize.

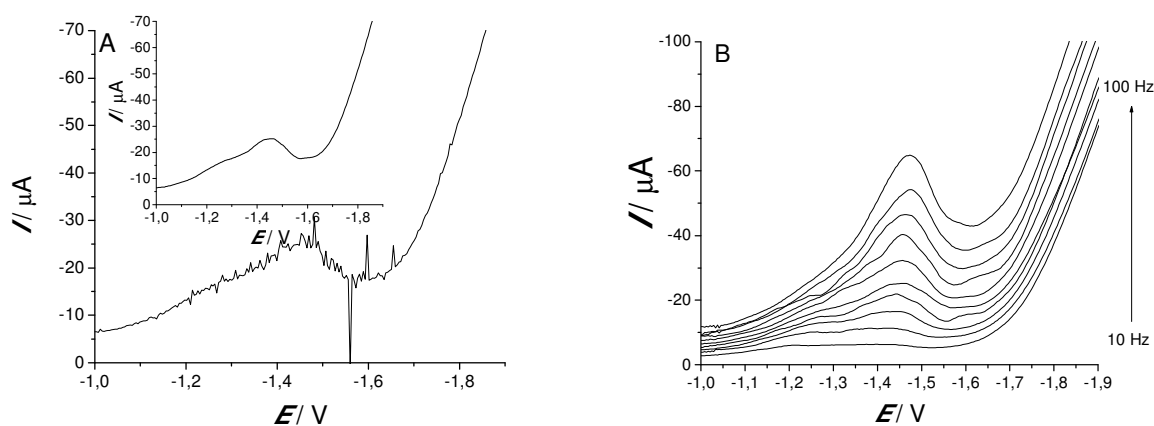


Slika 78. ^1H NMR spektri 3-DH-DHK pre početka elektrolize ($t = 0$), nakon 2,5 h i 4,5 h elektrolize

Na osnovu dobijenih ^1H NMR spektara i signala na hemijskom pomeranju oko 3,73 ppm koji je karakterističan za alkohole, može se pretpostaviti da prilikom elektrolize dolazi do redukcije keto grupe ispitivanog molekula.

Iz prikazane zavisnosti A_p -pH (slika 77B) uočava se da intenzitet/površina redukcionog pika ispitivanog analita blago raste u opsegu pH vrednosti od pH 9,5 do pH 10,5 nakon čega intenzitet/površina pika značajno raste sve do pH 11,8. Zbog oblika dobijenog redukcionog signala 3-DH-DHK i zbog intenziteta struje redukcionog pika, kao optimalna pH vrednost za dalja određivanja ciljnog analita primenjena je pH vrednost 11,8.

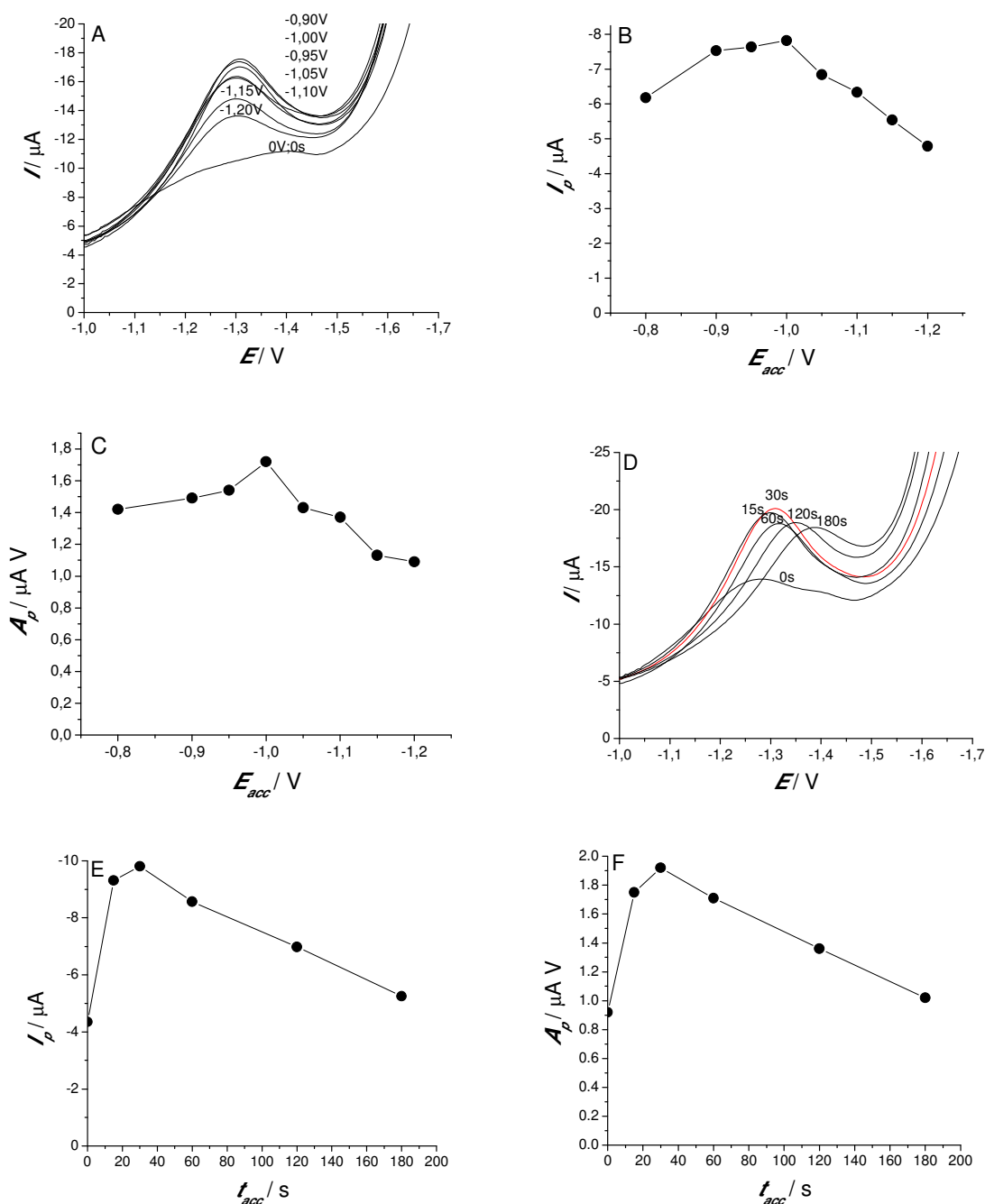
Nakon odabira optimalne pH vrednosti za dalja određivanja 3-DH-DHK, u formi 3-dehidro-deoksiholata, optimizovana je i radna frekvencija. Snimani su SW voltamogrami pri koncentraciji ispitivanog analita od $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ pri pH 11,8, a ispitivane frekvencije su bile: 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100 Hz. Zbog prisustva šumova na krivama, voltamogrami su softverski glačani uz primenu softverskog programa GPES. Na slici 79A prikazan je dobijen SW voltamogram pri frekvenciji od 50 Hz i isti SW voltamogram nakon softverskog glačanja krive (prikazan kao umetak slike 79A). Na slici 79B prikazani su softverski glačani SW voltamogrami pri svim ispitivanim vrednostima frekvencije.



Slika 79. A) SW voltamogram 3-DH-DHK snimljen u Briton-Robinsonovom puferu pH 11,8 pri frekvenciji od 50 Hz (kao umetak slike predstavljen je isti SW voltamogram nakon softverskog glačanja) i B) SW voltamogrami 3-DH-DHK snimljeni u Briton-Robinsonovom puferu pH 11,8 pri frekvenciji (10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100 Hz) nakon softverskog glačanja krivi. Koncentracija 3-DH-DHK je $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$

Iz prikazanih SW voltamograma uočava se da intenzitet pika raste sa porastom frekvencije ali takođe i intenzitet šumova raste sa porastom frekvencije. Zbog toga je bilo otežano snimanje SW voltamograma pri frekvenciji od 125 Hz. Na osnovu dobijenih intenziteta pika, i na osnovu pogodnijeg odnosa signal/šum kao optimalna radna frekvencija odabrana je 50 Hz.

Pošto je odabrana optimalna pH vrednost i s obzirom da su optimizovani osnovni parametri SW metode, vršena ja optimizacija osnovnih parametara adsorptivne metode, potencijal akumulacije (slika 80A-C) i vreme akumulacije (slika 80D-F). Na slici 80A prikazani su SW-AdS voltamogrami (E_{acc} od -0,90 V do -1,20 V) i SW votlamogram ($E_{acc} = 0,0$ V, $t_{acc} = 0$ s) optimizacije potencijala akumulacije pri $t_{acc} = 30$ s, dok su na slikama 80B i C prikazane odgovarajuće zavisnosti intenziteta pika (slika 80B) odnosno površine pika (slika 80C) od primenjenog potencijala akumulacije. Vršeno je i integraljenje dobijenih signala zbog nesimetričnosti signala 3-DH-DHK.

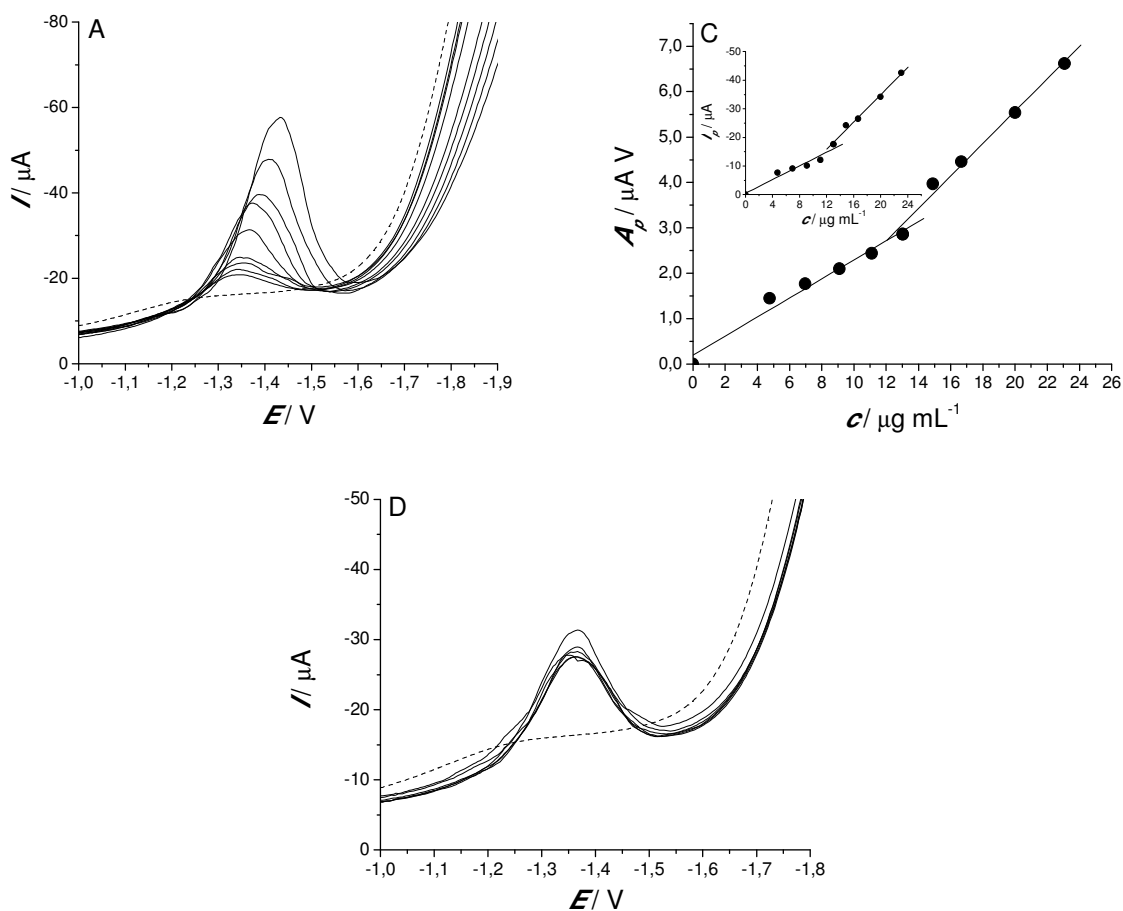


Slika 80. Uticaj E_{acc} i t_{acc} na redukcionu signal 3-DH-DHK ($c = 4,76 \mu\text{g mL}^{-1}$) u Briton-Robinsonovom puferu pH 11,8: A) ilustrativni voltamogrami dobijeni pri odabranom E_{acc} (odgovarajući E_{acc} su označena na krivama u V) pri $t_{acc} = 30$ s; B) odgovarajuća zavisnost I_p od primenjenog E_{acc} ; C) odgovarajuća zavisnost A_p od E_{acc} ; D) ilustrativni voltametrijski signali dobijeni pri odabranom t_{acc} (odgovarajuća t_{acc} su označena na krivama u s) pri $E_{acc} = -1,00$ V; E) odgovarajuća zavisnost I_p od primenjenog t_{acc} ; F) odgovarajuća zavisnost A_p od primenjenog t_{acc}

Na voltamogramima dobijenim prilikom optimizacije E_{acc} uočava se prisustvo pika na oko -1,3 V koji potiče od ispitivanog analita. Kao optimalni potencijal akumulacije odabran je -1,00 V. Potom je vršena optimizacija vremena akumulacije počevši od 0 s do 180 s (slika 80D). Takođe i kod ispitivanja uticaja vremena akumulacije ciljnog analita na površinu radne elektrode, konstruisana je odgovarajuća zavisnost i intenziteta dobijenog pika (slika 80E) i površine dobijenog pika (slika 80F) od primenjenog vremena akumulacije. Najintenzivniji signal dobija se kada se analit akumulira na površini elektrode u toku 30 s na potencijalu -1,00 V. Dalja SW-AdSV merenja su vršena pri $E_{acc} = -1,00$ V i $t_{acc} = 30$ s (kriva označena crvenom bojom na slici 80D). Na osnovu snimljenih direktnih katodnih SW voltamograma prikazanih na slici 80A i D može se videti da se primenom ove metode ne generiše se jasno definisan signal ciljnog analita a moguće objašnjenje je da metoda nije dovoljno osetljiva da se može primeniti za određivanje koncentracije ispitivanog analita pri kojoj je vršena optimizacija parametara SW-AdSV metode ($4,76 \mu\text{g mL}^{-1}$). Shodno tome, u slučaju BiF-GCE neophodno je primeniti SW-AdSV metodu rada.

4.2.2. Voltametrijsko određivanje u model rastvoru

Nakon optimizacije svih parametara snimljeni su SW-AdS voltmogrami pri pH 11,8 u opsegu potencijala skeniranja tokom SW koraka SW-AdS protokola od -1,00 V do -2,00 V pri različitim koncentracijama ispitivanog analita (slika 81A). Na slici 81B prikazana je linearna zavisnost površine redukcionog pika od koncentracija ispitivanog analita dok je zavisnost intenziteta pika od koncentracije predstavljena je kao umetak slike 81B. Uočena su dva linearna opsega, prvi je u koncentracionom opsegu od $4,76$ - $13,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, a drugi u opsegu koncentracija $13,0$ - $23,1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Zbog relativne asimetričnosti signala ispitivanog analita, sa E_p na -1,35 V u odnosu na ZKE, za definisanje osnovnih analitičkih parametara razvijena metoda preferira primenu zavisnosti površine dobijenih redukcionih signala 3-DH-DHK od njegove koncentracije.



Slika 81. SW-AdSV 3-DH-DHK u koncentracionom opsegu $4,76\text{-}23,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (A), odgovarajuća kalibraciona kriva na osnovu A_p (B), reproduktivnost analitičkog signala 3-DH-DHK, šest uzastopnih merenja, pri koncentraciji $13,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (C). Umetak slike B: odgovarajuća kalibraciona kriva na osnovu I_p . Isprekidane linije prikazuju odgovarajuće voltamogramе bazne linije pri pH 11,8

Analitički parametri dobijenih linearnih zavisnosti određivanja 3-DH-DHK primenom optimizovane SW-AdSV metode dati su u tabeli 12.

Tabela 12. Analitički parametri dobijeni primenom BiF-GCE i SW-AdSV metode za određivanje 3-dehidro-deoksiholne kiseline

Parametri	Preko I_p		Preko A_p	
	I linearni opseg	II linearni opseg	I linearni opseg	II linearni opseg
Linearni opseg ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	4,76-13,0	13,0-23,1	4,76-13,0	13,0-23,1
Odsečak (μA)	-0,482	0,013	0,197	-1,571
Nagib ($\mu\text{A mL } \mu\text{g}^{-1}$)	-1,194	-2,383	0,210	0,357
Koeficijent korelacije	-0,972	-0,995	0,987	0,993
GD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,43		1,43	
GO ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	4,76		4,76	

Takođe je ispitana i reproduktivnost analitičkog signala pri koncentraciji $13,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ primenom optimizovane metode na osnovu šest uzastopnih merenja (slika 81C). Reproductivnost je izražena preko RSD i na osnovu površina dobijenih pikova iznosi 3,2%, a na osnovu intenziteta dobijenih pikova RSD je 7,7%.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je *ex situ* pripremljena BiF-GCE elektroda primenljiva za voltametrijsko određivanje sintetisane 3-DH-DHK u obliku 3-dehidro-deoksiholata. Analitička metoda je zasnovana na redukciji ciljnog analita. Takođe se može uočiti da se 3-DH-DHK u formi 3-dehidro-deoksiholata pri optimalnim uslovima rada adsorbuje na površini BiF-GCE što pored pored bizmut-filma dodatno povećava osetljivost razvijene metode. Zbog asimetričnosti dobijenih redukcionih signala, za analitičke svrhe pouzdanije je pratiti promenu površine dobijenih signala nego promenu intenziteta signala u funkciji koncentracije ciljnog analita. BiF-GCE može da posluži i kao radna elektroda za elektroanalizu ciljnog analita što u narednim koracima rada u kombinaciji sa ^1H NMR mernom tehnikom uz potiskivanje signala vode može da obezbedi dodatne korisne informacije u vezi ispitivanog sistema.

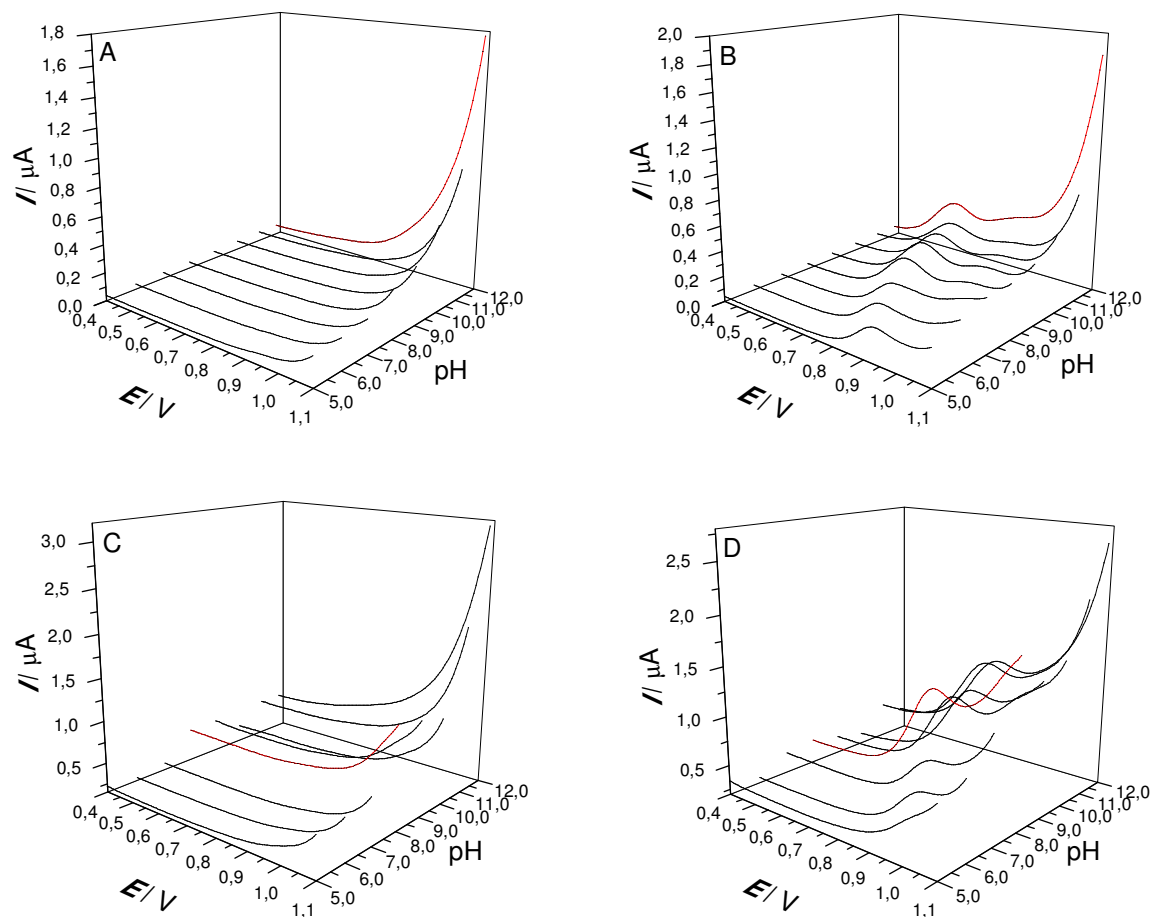
4.3. Voltametrijsko određivanje makrolidnih antibiotika primenom elektrode od ugljenične paste

Na osnovu prethodnih ispitivanja voltametrijskog ponašanja odabranih makrolidnih antibiotika uočeno je da eritromicin, azitromicin, klaritromicin i roksitromicin daju oksidativne signale primenom elektroda kao što su GCE, elektroda od zlata, GCE modifikovana jednozidnim ugljeničnim nanocevima i CPE [52,58-61,117]. Zbog toga je ispitivana primenljivost elektrode od ugljenične paste za voltametrijsko određivanje eritromicin-etilsukcinata, azitromicina, klaritromicina i roksitromicina u model rastvorima, a u slučaju roksitromicina i za njegovo određivanje u komercijalnoj formulaciji. Takođe, prilikom određivanja azitromicina kao radna elektroda testirana je i elektroda od ugljenične paste površinski modifikovana koloidnim zlatom.

4.3.1. Voltametrijsko ponašanje eritromicin-etilsukcinata i njegovo određivanje u model rastvoru

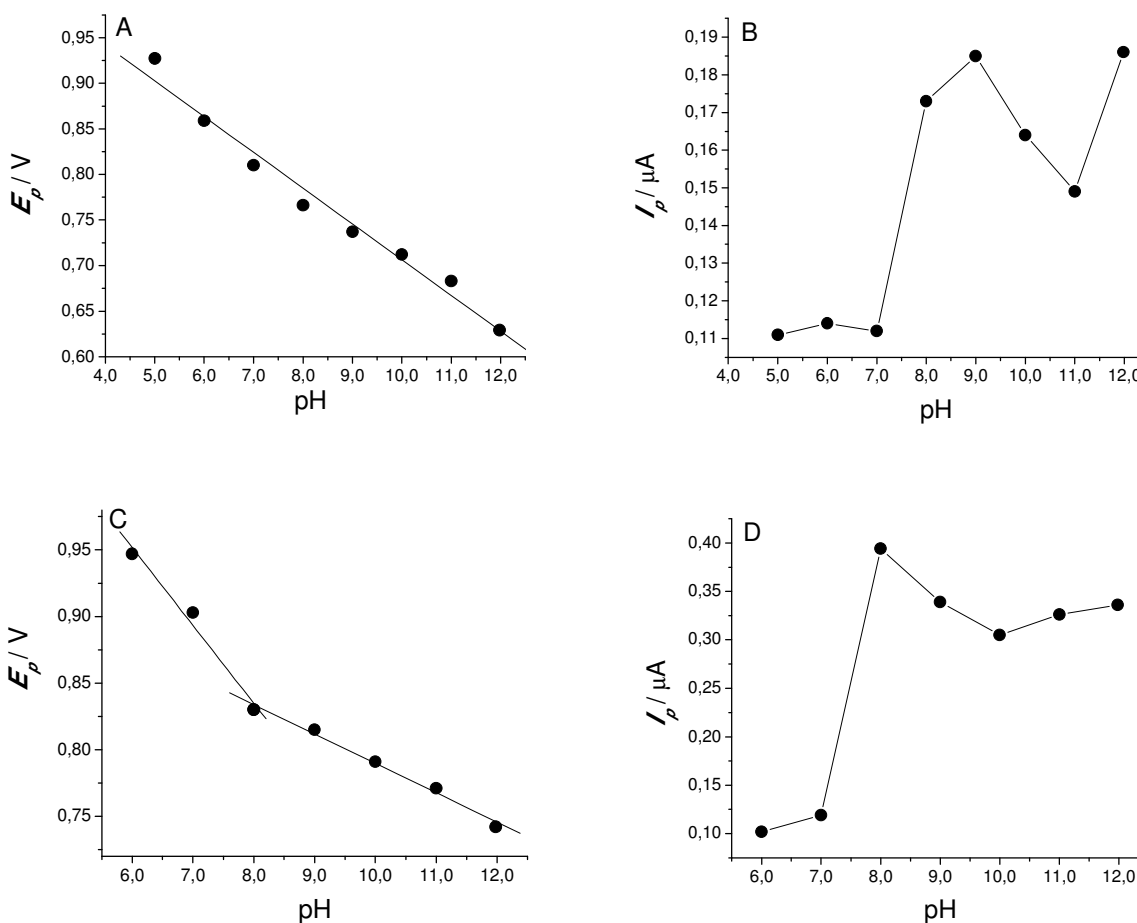
4.3.1.1. Voltametrijska karakterizacija

Oksidativno voltametrijsko ponašanje EES-a ispitivano je primenom DPV i SWV mernih tehnika. Prvo je ispitivan uticaj pH vrednosti sredine (od pH 2,0 do pH 12,0) na oblik i intenzitet signala ispitivanog analita primenom obe metode, u opsegu potencijala od 0,40 V do 1,10 V. Na osnovu dobijenih rezultata uočava se da je signal EES-a nestabilan pri pH vrednostima od pH 2,0 do pH 4,0 zbog čega su prikazani voltamogrami dobijeni primenom DPV (slika 82A i B) i SWV (slika 82C i D) u oblasti pH vrednosti sredine od pH 5,0 do pH 12,0.



Slika 82. Voltamogrami snimljeni primenom CPE i DPV (A i B) i CPE i SWV (C i D): A i C) Briton-Robinson pomoćni elektrolit od pH 5,0 do pH 12,0; B i D) isti rastvori pufera u prisustvu $27,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ EES

Primenom SWV metode pri pH 5,0 uočava se veoma slab oksidacioni pik ciljnog analita. Na osnovu snimljenih voltamograma može se uočiti da pH vrednost sredine utiče na oblik i intenzitet oksidacionog pika ciljnog analita naročito primenom SWV metode. Na slikama 83A, B, C i D prikazane su odgovarajuće zavisnosti položaja, u vidu E_p , i intenziteta, u vidu I_p pika, dobijenih primenom obe metode, od pH vrednosti sredine.



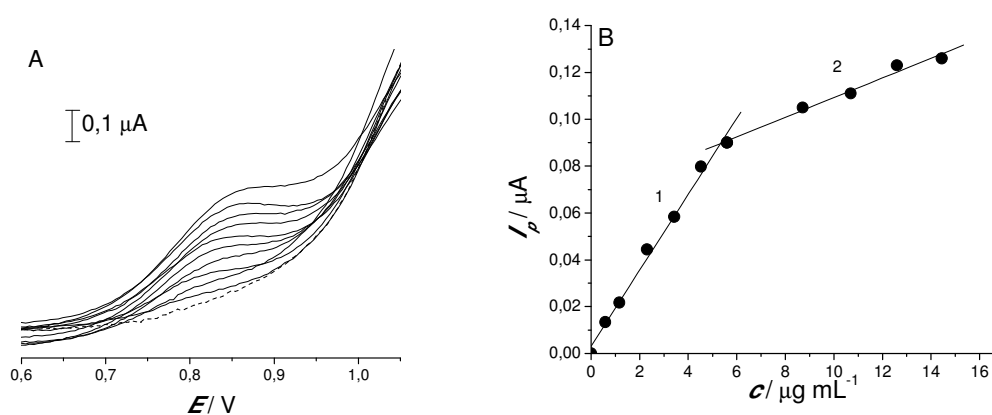
Slika 83. E_p -pH (A, C) i I_p -pH (B, D) zavisnost signala EES ($c = 27,2 \mu\text{g mL}^{-1}$) primenom CPE i DPV (A, B) i CPE i SWV (C, D)

Primenom DPV (slika 83A) i SWV (slika 83C) metoda sa porastom pH vrednosti dolazi do pomeranja položaja maksimuma oksidacionog pika ciljnog analita ka negativnijim vrednostima potencijala. Linearna zavisnost E_p -pH dobijena primenom DPV metode (slika 83A) može da se opiše sledećom jednačinom: $E_p = 1,099 \text{ [V]} - 0,039 \text{ [V/pH]} \times \text{pH}$ ($r = -0,988$). Sa slike zavisnosti E_p -pH dobijene primenom SWV metode (slika 83C) mogu se uočiti dve linearne oblasti, prva od pH 6,0 do pH 8,0 koja se može opisati jednačinom: $E_p = 1,303 \text{ [V]} - 0,058 \text{ [V/pH]} \times \text{pH}$ ($r = -0,989$) a druga od pH 8,0 do pH 12,0 koju opisuje jednačina: $E_p = 1,010 \text{ [V]} - 0,022 \text{ [V/pH]} \times \text{pH}$ ($r = -0,994$). Najintenzivniji oksidacioni pik EES-a primenom DPV se dobija pri pH 9,0 i pH 12,0 (slika 83B), dok se primenom SWV najintenzivniji pik dobija pri pH 8,0 (slika 83D). Može se takođe uočiti da se primenom SWV metode pri pH vrednostima većim od

pH 7,0 dobijaju intenzivniji signali nego primenom DPV metode. Treba naglasti, da u jako alkalnoj sredini može doći do strukturnih promena ciljnih analita kao na primer hidroliza datih molekula.

4.3.1.2. Voltametrijsko određivanje u model rastvoru

Kao adekvatna pH vrednost za određivanje EES-a primenom optimizovane SWV metode odabrana je pH 8,0 jer se pri ovoj pH vrednosti dobijaju najintenzivniji oksidacioni pikovi ciljnog analita sa E_p na 0,83 V u odnosu na ZKE. Analitička metoda određivanje EES-a zasnovano je na linearnoj zavisnosti koncentracije ispitivanog analita i intenziteta struje dobijenih pikova pri datim koncentracijama. Ispitivana oblast koncentracija je od 0,59 do 14,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i dobijeni SW voltamogrami prikazani su na slici 84A zajedno sa kalibracionom krivom prikazanom na slici 84B.

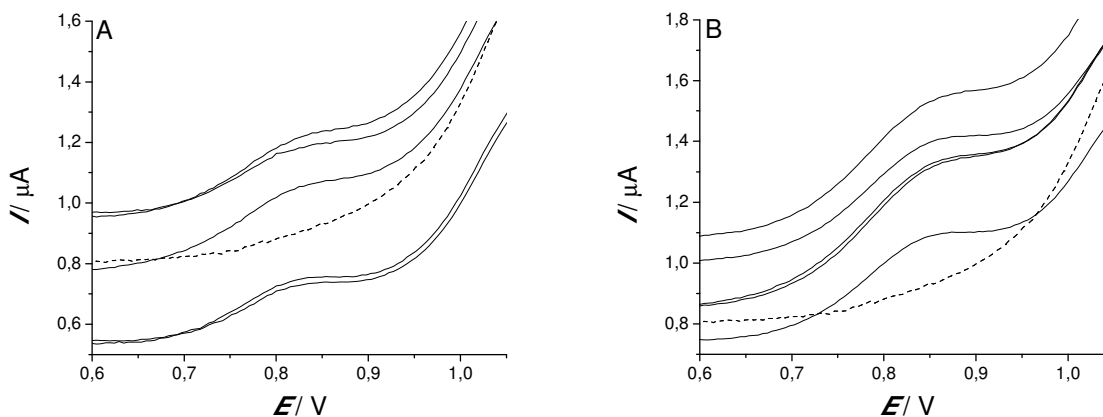


Slika 84. SW voltamogrami EES-a u koncentracionom opsegu 0,59-14,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (A) i odgovarajuća kalibraciona kriva (B). Isprekidana linija prikazuje odgovarajući voltamogram bazne linije pri pH 8,0

Na osnovu konstruisane zavisnosti I_p od koncentracije ciljnog analita u ispitivanoj oblasti koncentracija javljaju se dva linearna opsega koji se mogu opisati sledećim jednačinama: (1) $I_p = 0,003 [\mu\text{A}] + 0,016 [\mu\text{A mL } \mu\text{g}^{-1}] \times c$ ($r = 0,996$) i (2) $I_p = 0,067 [\mu\text{A}] + 0,004 [\mu\text{A mL } \mu\text{g}^{-1}] \times c$ ($r = 0,991$). Pretpostavlja se da se određivanje ciljnog analita u nekim realnim uzorcima u opsegu koncentracija koje pripadaju prvoj linearnoj oblasti može vršiti primenom metode standardnog dodatka, dok ako se određivanje vrši u oblasti koncentracija koje pripadaju drugoj linearnoj

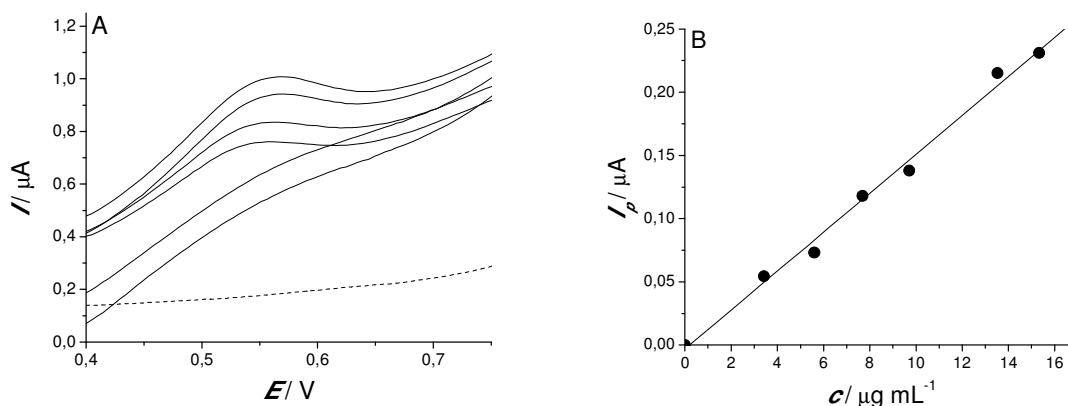
oblasti, pretpostavlja se da bi bilo pogodnije određivanje sa kalibracione krive, ako to efekat matriksa omogućava.

Ispitana je reproduktivnost analitičkog signala ciljnog analita na osnovu šest uzastopno ponovljenih merenja pri koncentraciji EES-a od $3,42 \mu\text{g mL}^{-1}$ (slika 85A) i $14,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ (slika 85B) i na osnovu dobijenih intenziteta signala RSD iznosi 4,9% odnosno 5,7%.



Slika 85. Reproductivnost analitičkog signala EES-a na osnovu šest uzastopno ponovljenih merenja pri koncentraciji od $3,42 \mu\text{g mL}^{-1}$ (A) i $14,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ (B) primenom SWV metode. Isprekidane linije prikazuju odgovarajuće voltamograme bazne linije pri pH 8,0

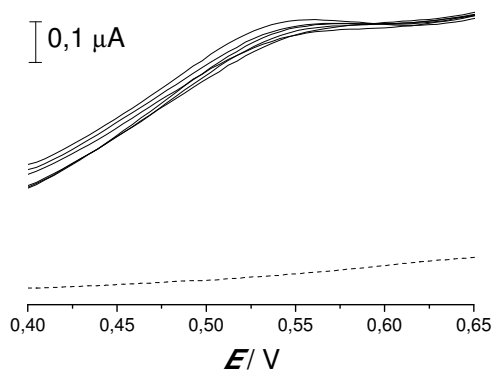
Određivanje EES-a u model rastvoru vršeno je i primenom DPV metode pri pH 12,0 jer se pri ovoj pH vrednosti dobijaju najintenzivniji i jasnije definisani signali ispitivanog analita ($E_p = 0,55 \text{ V}$ u odnosu na ZKE). DP voltamogrami snimljeni u opsegu koncentracija EES-a od $3,42 \mu\text{g mL}^{-1}$ do $15,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ predstavljeni su na slici 86A, a odgovarajuća kalibraciona kriva je predstavljena na slici 86B.



Slika 86. DP voltamogrami EES-a u koncentracionom opsegu $3,42\text{-}15,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ (A) i odgovarajuća kalibraciona kriva (B). Isprekidana linija prikazuje odgovarajući voltamogram bazne linije pri pH 12,0

Dobijena linearna zavisnost primenom optimizovane DPV metode može se opisati sledećom jednačinom $I_p = -0,003 [\mu\text{A}] + 0,015 [\mu\text{A mL } \mu\text{g}^{-1}] \times c$ ($r = 0,996$).

Takođe je ispitana i reproduktivnost analitičkog signala ciljnog analita primenom optimizovane DPV metode na osnovu šest uzastopnih merenja pri koncentraciji EES-a $7,69 \mu\text{g mL}^{-1}$ (slika 87). Izračunata vrednost za RSD iznosi 4,8%.



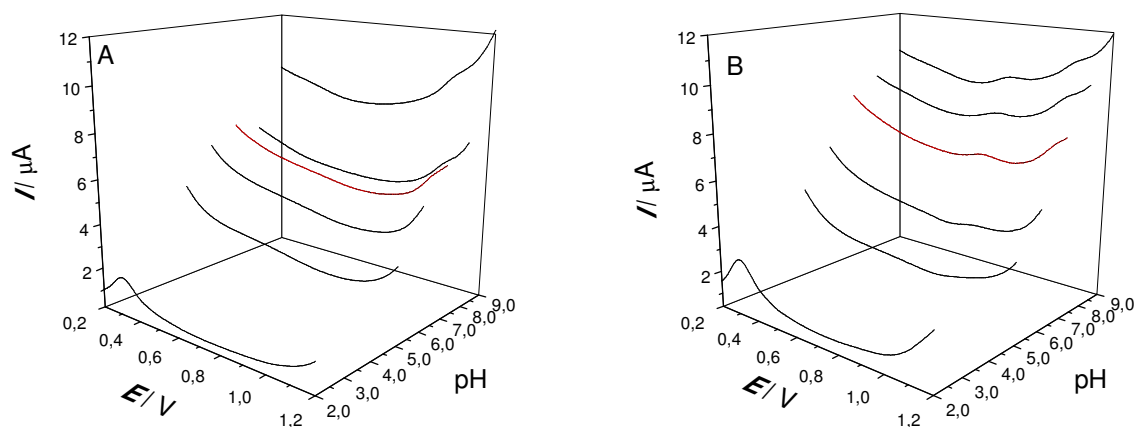
Slika 87. Reproductivnost analitičkog signala EES-a na osnovu šest uzastopno ponovljenih merenja pri koncentraciji od $7,69 \mu\text{g mL}^{-1}$ primenom DPV metode. Isprekidana linija prikazuje odgovarajući voltamogram bazne linije pri pH 12,0

Na osnovu dobijenih rezultata određivanja EES-a u model rastvorima primenom optimizovanih SWV i DPV metoda, može se zaključiti da se niža granica detekcije postiže primenom SWV metode ($GD = 0,17 \mu\text{g mL}^{-1}$) nego primenom DPV metode ($GD = 1,03 \mu\text{g mL}^{-1}$).

4.3.2. Voltametrijsko ponašanje azitromicina i njegovo određivanje u model rastvoru

4.3.2.1. Voltametrijska karakterizacija

Odabir optimalne pH vrednosti Briton-Robinsonovog pufera (od pH 2,0 do pH 9,0) za određivanje ciljnog analita, azitromicina, vršen je primenom SWV metode pri čemu su voltamogrami snimani u opsegu potencijala od 0,20 V do 1,20 V pri koncentraciji ispitivanog analita $24,7 \mu\text{g mL}^{-1}$. Oksidacioni signal AZI-a uočava se pri pH vrednostima većim od pH 5,0. Na slici 88A prikazani su SW voltamogrami slepih proba/bazne linije na odabranim pH vrednostima (pH 2,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 i 9,0) dok su na slici 88B SW voltamogrami u prisustvu ciljnog analita pri istim pH vrednostima sredine.

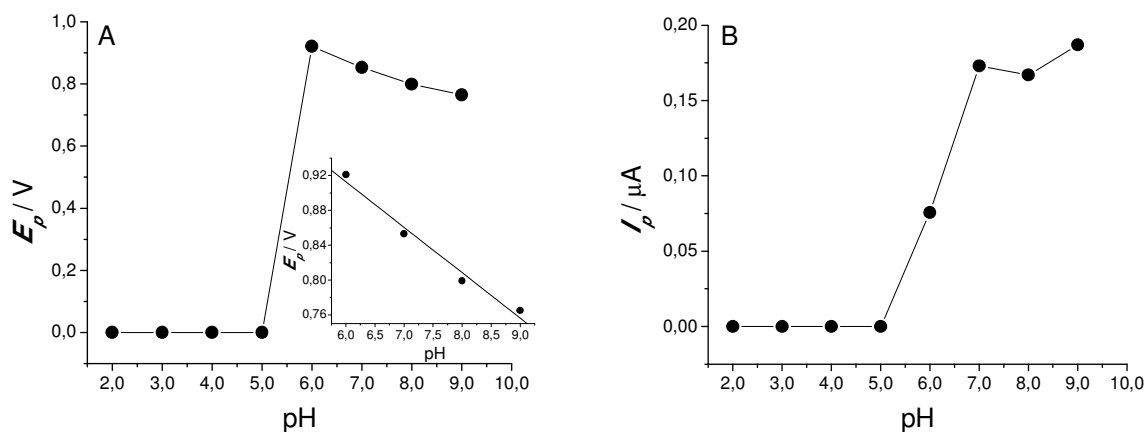


Slika 88. SW voltamogrami snimljeni primenom CPE: A) Briton-Robinson pomoćni elektrolit pri odabranim pH vrednostima sredine (pH 2,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0) i B) isti rastvori pufera u prisustvu $24,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ azitromicina

Na osnovu snimljenih SW voltagrama pri različitim pH vrednostima vidi se da pH vrednost sredine u velikoj meri utiče na oblik i intenzitet signala azitromicina i da se oksidacioni

pik ispitivanog analita javlja na potencijalima između 0,95 V i 0,75 V u odnosu na ZKE u zavisnosti od pH vrednosti sredine.

Odgovarajuće zavisnosti položaja, E_p i intenziteta, I_p oksidacionog pika ciljnog analita od pH vrednosti pomoćnog elektrolita predstavljene su na slici 89.



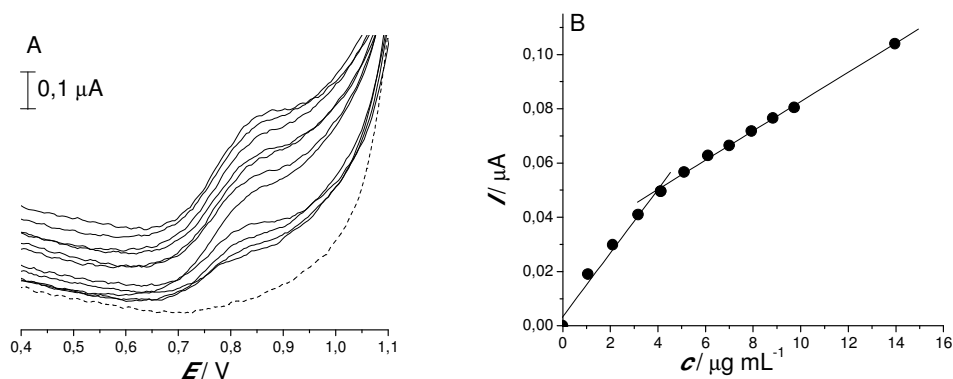
Slika 89. E_p -pH (A) i I_p -pH (B) zavisnost signala azitromicina ($c = 24,7 \mu\text{g mL}^{-1}$) u Briton-Robinson pomoćnom elektrolitu od pH 2,0 do pH 9,0. Umetak: E_p -pH zavisnost od pH 6,0 do pH 9,0

Sa porastom pH vrednosti pomoćnog elektrolita dolazi do pomeranja položaja oksidacionog pika azitromicina ka negativnijim vrednostima potencijala (slika 89A). Kao umetk slike 89A predstavljena je E_p -pH zavisnost od pH 6,0 do pH 9,0 koja se može opisati sledećom jednačinom: $E_p = 1,226 [\text{V}] - 0,052 [\text{V/pH}] \times \text{pH}$ ($r = -0,989$). Najintenzivniji oksidacioni pik ciljnog analita javlja se pri pH 9,0 što se može uočiti sa slike 89B ali simetričniji oblik signala dobija se pri pH 7,0. Daljom optimizacijom uočeno je da pH 9,0 nije pogodna za dalja određivanja azitromicina jer se pri ovoj pH vrednosti ne dobijaju reproduktivni signali ciljnog analita, pa je kao optimalna pH vrednost odabrana pH 7,0 pri kojoj se maksimum pika javlja na potencijalu 0,85 V u odnosu na ZKE.

4.3.2.2. Voltametrijsko određivanje u model rastvoru

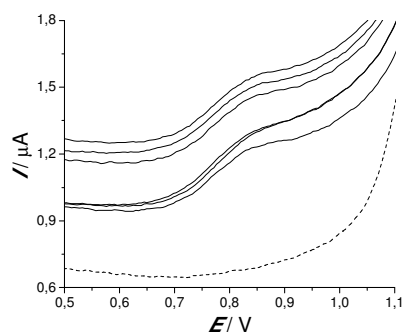
Nakon iznalaženja optimalnog operativnog parametra tj. pH vrednosti (pH 7,0) sredine ispitivana je linearna oblast SWV analitičke metode. Analitička metoda zasnovana je na

linearnoj zavisnosti između intenziteta struje oksidacionog pika ciljnog analita i njegove koncentracije. SW voltamogrami snimljeni u opsegu potencijala od 0,20 V do 1,20 V pri različitim koncentracijama azitromicina prikazani su na slici 90A dok je odgovarajuća kalibraciona kriva prikazana na slici 90B.



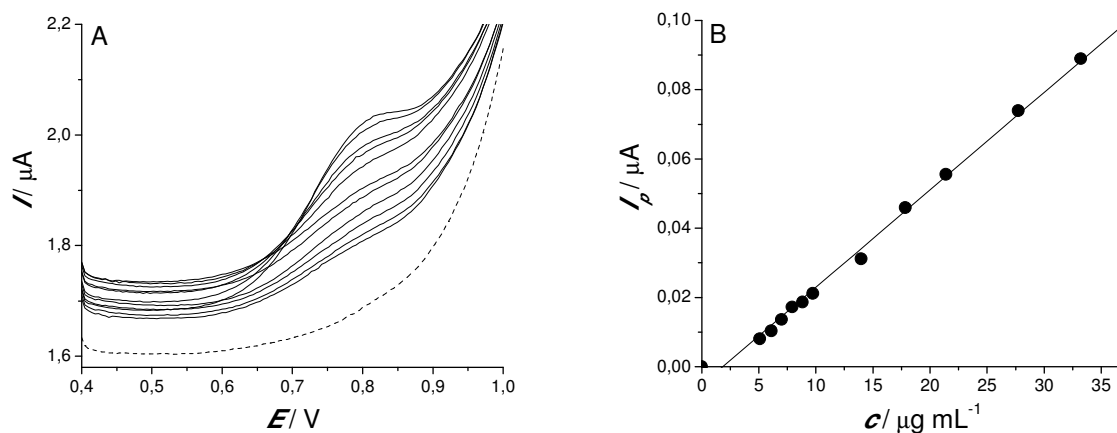
Slika 90. SW voltamogrami azitromicina u koncentracionom opsegu 1,06-14,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (A) i odgovarajuća kalibraciona kriva (B). Isprekidana linija prikazuje odgovarajući voltamogram bazne linije pri pH 7,0

Na osnovu dobijene kalibracione krive uočavaju se dva linearna opsega rada, prvi je u opsegu koncentracija od 1,06 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do 4,12 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a drugi od 4,12 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do 14,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a sažetak važnijih dobijenih analitičkih parametara metode je dat u tabeli 13. Na osnovu šest uzastopno ponovljenih merenja ispitana je reproduktivnost analitičkog signala. Reprodutivnost je ispitana pri koncentraciji azitromicina od 9,73 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i RSD je 4,8% (slika 91).



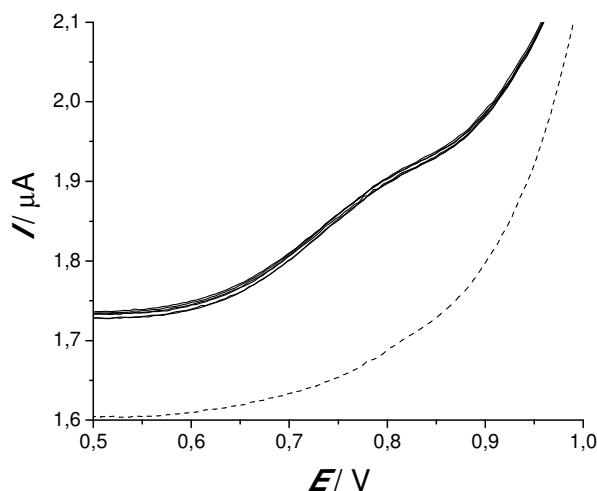
Slika 91. Reprodutivnost analitičkog signala azitromicina na osnovu šest uzastopno ponovljenih merenja pri koncentraciji od 9,73 $\mu\text{g mL}^{-1}$ primenom SWV metode. Isprekidana linija prikazuje odgovarajući voltamogram bazne linije pri pH 7,0

Potom je azitromicin određivan u model rastvoru primenom DPV merne tehnike u kombinaciji sa nemodifikovanom CPE takođe pri pH 7,0 (E_p analitičkog signala je 0,80 V u odnosu na ZKE). DP voltamogrami su snimani u opsegu potencijala od 0,40 V do 1,10 V i prikazani su na slici 92A sa odgovarajućom kalibracionom krivom (slika 92B).



Slika 92. DP voltamogrami azitromicin snimljeni primenom CPE u koncentracionom opsegu 5,10-33,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (A) i odgovarajuća kalibraciona kriva (B). Isprekidana linija prikazuje odgovarajući voltamogram bazne linije pri pH 7,0

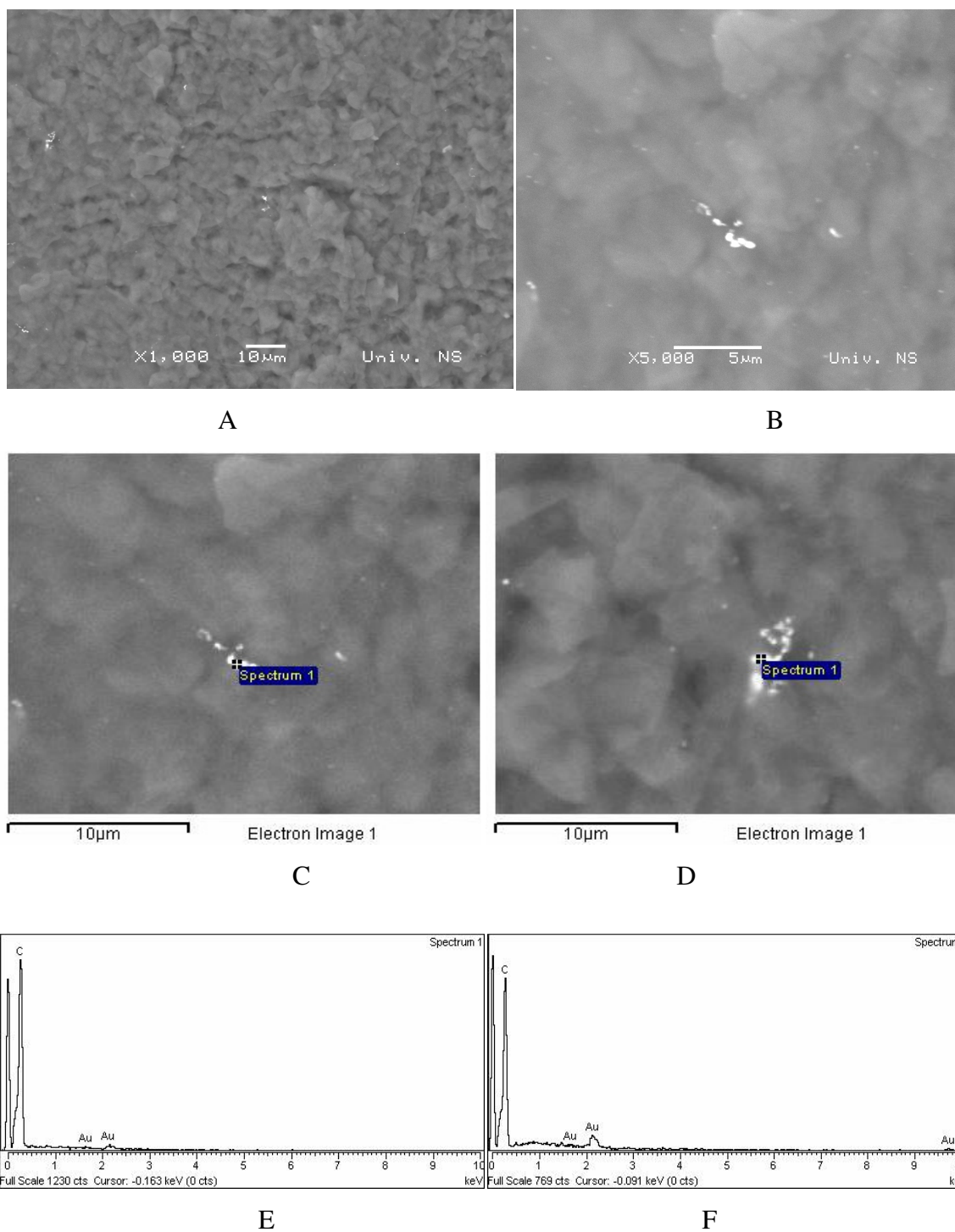
Primenom DPV postiže se zadovoljavajuća linearnost kalibracione krive u opsegu koncentracija azitromicina od 5,10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do 33,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Reproductivnost analitičkog signala ispitana je pri koncentraciji ciljnog analita 9,73 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (slika 93) i na osnovu šest uzastopnih merenja snimljenih u istom ispitivnom rastvoru RSD je 6,0%. Dobijeni analitički parametri određivanja azitromicina primenom DPV i nemodifikovane CPE dati su u tabeli 13.



Slika 93. Reproductivnost analitičkog signala azitromicina na osnovu šest uzastopno ponovljenih merenja pri koncentraciji od $9,73 \mu\text{g mL}^{-1}$ primenom DPV metode. Isprekidana linija prikazuje odgovarajući voltamogram bazne linije pri pH 7,0

Primenom DPV metode postiže se linearnost kalibracione krive u širem opsegu koncentracija u poređenju sa primenjenom SWV metodom, dok se primenom SWV postiže niža granica detekcije i određivanja.

Radi poboljšanja osetljivosti i reproductivnosti optimizovane DPV metode, kao radna elektroda primenjena je CPE koja je površinski modifikovana sa $3,0 \mu\text{L}$ koloidnog zlata (prečnika 10 nm), Au-CPE. Treba naglasti da je prethodno optimizovana količina modifikatora koja je naneta na prethodno pripremljenu površinu CPE. Morfologija površine radne elektrode, Au-CPE ispitana je primenom SEM (slika 94A, uvećanje x1000 i slika 94B uvećanje x5000) i odabrana reprezentativna oblast površine radne elektrode je analizirana primenom EDS (slika 94C, D, E i F).

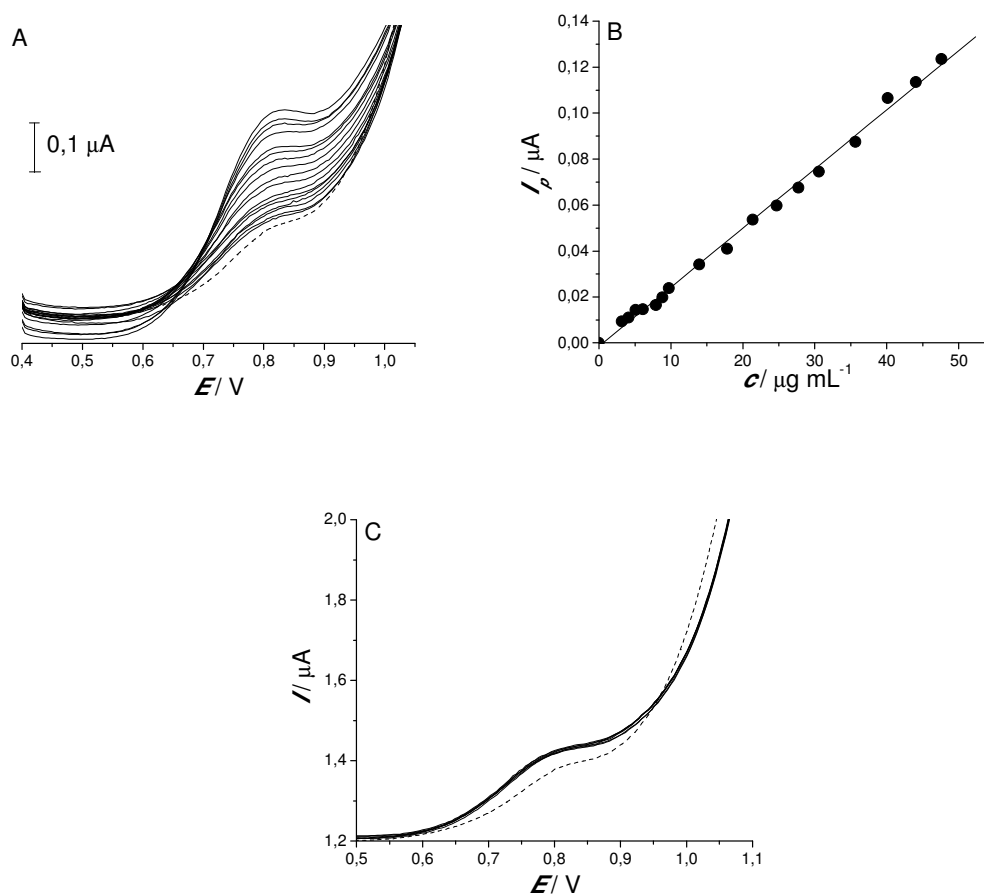


Slika 94. Reprezentativni deo površine Au-CPE elektrode (A, B, C i D) i EDS spektri Au čestica na površini ugljenične paste (E i F)

Na osnovu slika 94A, B, C i D može se videti da su nanočestice Au (svetle čestice) nasumice raspoređene na površini ugljenične paste i da prodiru u prve slojeve paste sa sličnom

raspodelom kao i na samoj površini. EDS merenje izvršeno na odabranom delu površine gde se uočavaju jasno vidljive svetle čestice dokazuje da su svetle čestice nasumice raspoređene po površini ugljenične paste zaista čestice zlata. EDS spektar prikazan na slici 94E pripada površini prikazanoj na slici 94C dok EDS spektar prikazan na slici 94F pripada površini prikazanoj na slici 94D.

Pošto je izvršena osnovna karakterizacija površine radne elektrode Au-CPE snimani su DP voltamogrami pri koncentracijama azitromicina od $3,17 \mu\text{g mL}^{-1}$ do $47,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ (slika 95A). Na osnovu intenziteta struje dobijenog oksidacionog pika ciljnog analita, sa $E_p = 0,80 \text{ V}$ u odnosu na ZKE, konstruisana je odgovarajuća kalibraciona kriva koja je prikazana na slici 95B.



Slika 95. DP voltamogrami azitromicina snimljeni primenom Au-CPE u koncentracionom opsegu $3,17\text{-}47,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ (A), odgovarajuća kalibraciona kriva (B) i reproduktivnost DP voltamograma (šest uzastopnih merenja) pri koncentraciji azitromicina $9,73 \mu\text{g mL}^{-1}$ (C). Isprekidane linije prikazuju odgovarajuće voltamograme bazne linije pri pH 7,0

Prilikom analiziranja signala azitromicina, od intenziteta pika ciljnog analita oduziman je intenzitet pika na baznoj liniji jer se signal na baznoj liniji uočava na sličnom potencijalu gde i signal ciljnog analita. U koncentracionom opsegu 3,17-47,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ postignuta je zadovoljavajuća linearnost kalibracione krive, a odgovarajući analitički parametri određivanja azitromicina primenom DPV i Au-CPE takođe su tadi u tabeli 13. Reproductivnost analitičkog signala azitromicina ispitana je na osnovu šest uzastopnih merenja pri koncentraciji ciljnog analita od 9,73 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (slika 95C) pri čemu RSD iznosi 3,5%.

Tabela 13. Analitički parametri određivanja azitromicina primenom CPE i Au-CPE u kombinaciji sa optimizovanim SWV i DPV metodama

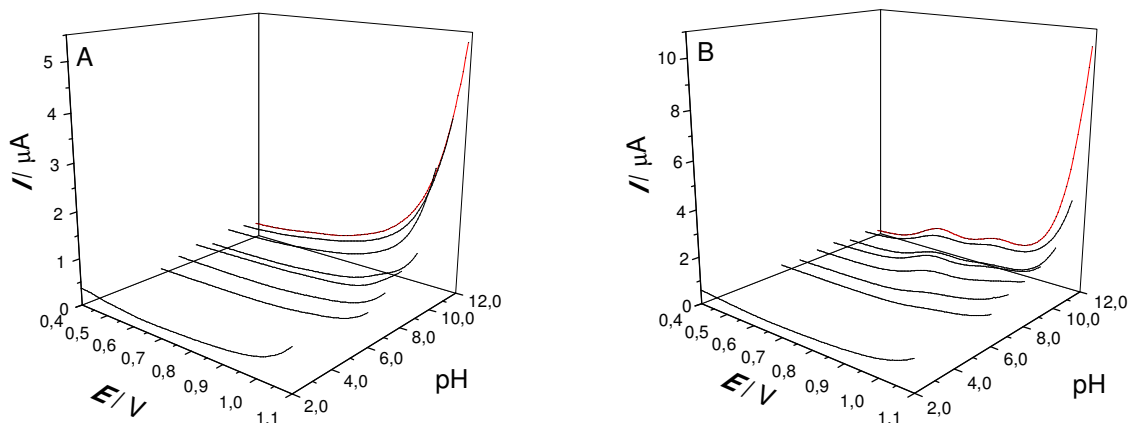
Parametri	CPE/SWV		CPE/DPV	Au-CPE/DPV
	I linearni opseg	II linearni opseg		
Linearni opseg ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,06-4,12	4,12-14,0	5,10-33,2	3,17-47,6
Odsečak (μA)	0,003	0,029	0,005	0,001
Nagib ($\mu\text{A mL } \mu\text{g}^{-1}$)	0,012	0,005	0,003	0,003
Koeficijent korelacije	-0,990	-0,999	0,997	0,998
GD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,32		1,53	0,95
GO ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,06		5,10	3,17

Na osnovu dobijenih rezultata zaključuje se da se primenom Au-CPE kao radne elektrode postiže niža granica detekcije u odnosu na CPE primenom DPV metode. Takođe, reproductivnost analitičkog signala azitromicina je poboljšana površinskom modifikacijom CPE, a i dobija se širi linearni koncentracioni opseg prilikom određivanja azitromicina u model rastvoru u slučaju primene Au-CPE i DPV metode.

4.3.3. Voltametrijsko ponašanje klaritromicina i njegovo određivanje u model rastvoru

4.3.3.1. Voltametrijska karakterizacija

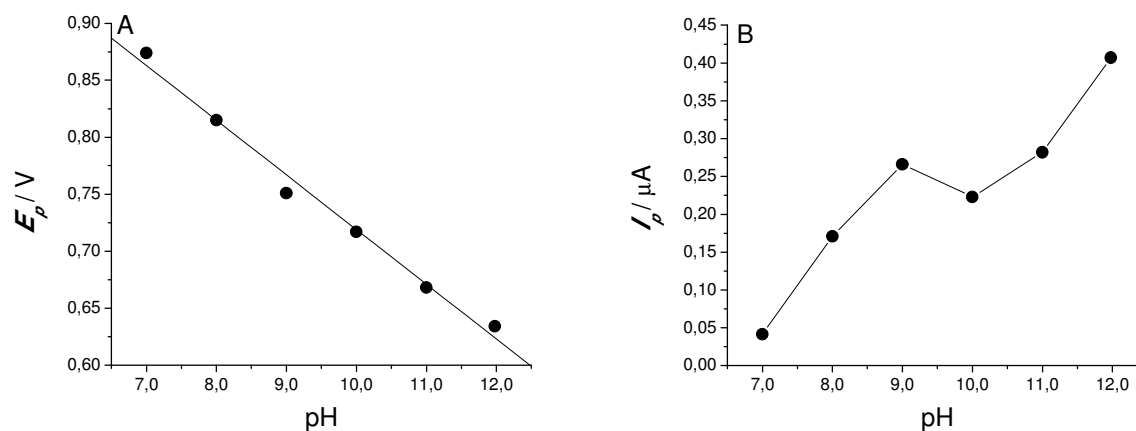
Primenom SWV metode vršeno je ispitivanje uticaja pH vrednosti sredine, od pH 2,0 do pH 12,0 na oblik i intenzitet signala klaritromicina pri koncentraciji $33,3 \mu\text{g mL}^{-1}$. Briton-Robinson pufer je korišćen kao pomoćni elektrolit. SW voltamogrami su snimani u opsegu potencijala od 0,40 V do 1,10 V i na osnovu dobijenih voltamograma vidi se da se oksidacioni signal CLA-a javlja tek pri pH vrednostima većim od pH 6,0. Stoga su na slici 96 prikazani SW voltamogrami slepih proba/bazne linije (slika 96A) i u prisustvu klaritromicina (slika 96B) pri odabranim pH vrednostima (pH 2,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0; 11,0 i 12,0).



Slika 96. SW voltamogrami snimljeni primenom CPE: A) Briton-Robinson pomoćni elektrolit pri odabranim pH vrednostima (pH 2,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0; 11,0 i 12,0) i B) isti rastvori pufera u prisustvu $33,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ klaritromicina

Na osnovu dobijenih SW voltamograma uočava se da su pri pH vrednostima većim od pH 8,0 prisutna dva oksidaciona pika klaritromicina, prvi na potencijalu između 0,63 V i 0,75 V, u zavisnosti od pH vrednosti sredine, a drugi na potencijalu između 0,85 V i 0,95 V, ali za analitičke svrhe korišćen je prvi oksidacioni pik ispitivanog analita.

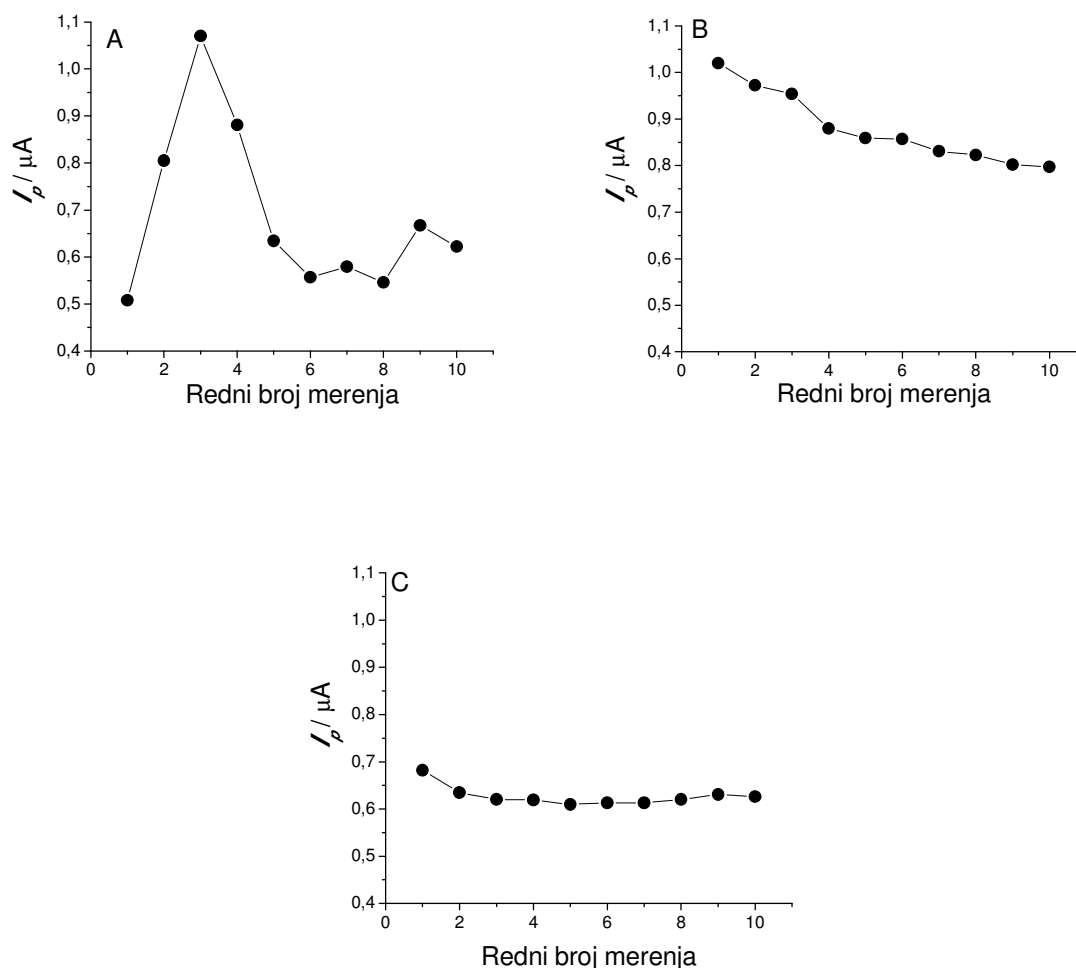
Zavisnost položaja, u vidu E_p , i intenziteta, u vidu I_p , prvog oksidacionog pika klaritromicina od pH vrednosti sredine predstavljena je na slici 97A odnosno 97B.



Slika 97. E_p -pH (A) i I_p -pH (B) zavisnost signala klaritromicina ($c = 33,3 \mu g mL^{-1}$) u Briton-Robinson pomoćnom elektrolitu od pH 7,0 do pH 12,0

Sa porastom pH vrednosti sredine, dolazi do pomeranja položaja maksimuma oksidacionog pika klaritromicina ka negativnijim vrednostima potencijala, što se može videti sa slike 97A, kao što je to slučaj i sa prethodna dva makrolidna antibiotika. Dobijena linearna zavisnost položaja signala od pH vrednosti sredine može se opisati sledećom jednačinom: $E_p = 1,199 [V] - 0,048 [V/pH] \times pH$ ($r = -0,994$). Najintenzivniji signal ispitivanog analita uočava se pri pH 12,0 (slika 97B) i na osnovu oblika, a i intenziteta signala, kao optimalna pH vrednost za dalja određivanja klaritromicina odabrana je pH 12,0, pri čemu se maksimum pika javlja na potencijalu 0,65 V u odnosu na ZKE.

Nakon optimizacije metode i odabira optimalne pH vrednosti vršeno je ispitivanje kako mehaničko obnavljanje, odnosno ne obnavljanje površine radne elektrode, CPE, utiče na reproduktivnost analitičkog signala. Snimano je 10 uzastopnih merenja u rastvoru klaritromicina koncentracije $33,3 \mu g mL^{-1}$ pri pH 12,0 (slika 98) u cilju ispitivanja reproduktivnosti analitičkog signala. Na osnovu intenziteta dobijenih signala klaritromicina izračunata je RSD. Kada je pre svakog merenja vršeno mehaničko obnavljanje površine CPE, RSD je 25,9% (slika 98A), a kada je sve snimano sa istom površinom radne elektrode, RSD je 8,7% (slika 98B).



Slika 98. Zavisnost intenziteta oksidacionog signala klaritromicina od rednog broja merenja prilikom obnavljanja (A) i ne obnavljanja (B) površine CPE pre svakog merenja. Zavisnost intenziteta oksidacionog signala klaritromicina od rednog broja merenja prilikom neobnavljanja površine CPE i prethodnog cikliranja (C). Koncentracija klaritromicina je $33,3 \mu g mL^{-1}$

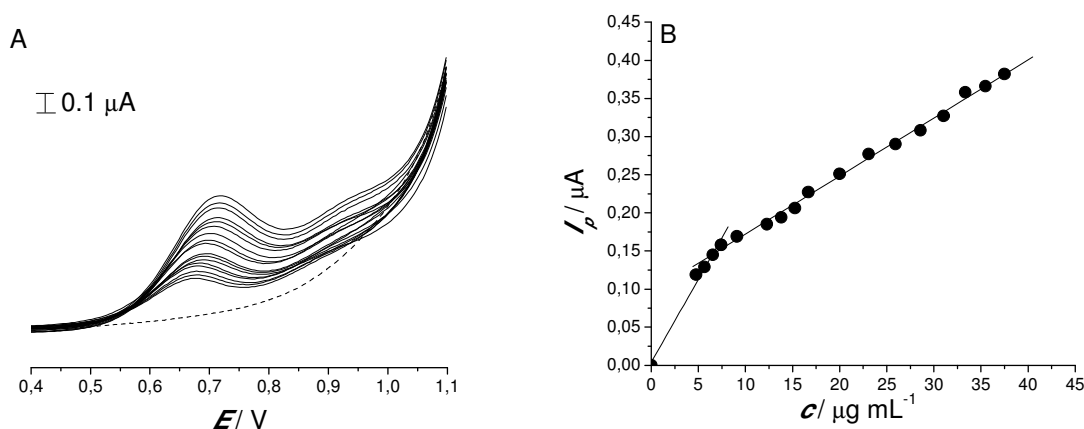
Na osnovu dobijenih rezultata, pri daljem određivanju klaritromicina primenom CPE nije se mehanički obnavljala površina elektrode jer se pri ovim uslovima postigla bolja reproduktivnost analitičkog signala. Potom je ispitano kako prethodno cikliranje utiče na reproduktivnost analitičkog signala. Snimljeni su ciklični voltamogrami (20 ciklusa) u opsegu potencijala od 0,40 V do 1,10 V pri brzini skeniranja potencijala do $0,250 V s^{-1}$, a potom je snimljeno 10 uzastopnih SW voltamograma u istom rastvoru pri koncentraciji klaritromicina $33,3 \mu g mL^{-1}$ bez obnavljanja površine CPE. Na osnovu dobijenih intenziteta signala ispitivanog

analita, RSD je 3,3%. Zavisnost intenziteta oksidacionog signala klaritromicina od rednog broja merenja data je na slici 98C.

Može se zaključiti da se prethodnim cikliranjem elektrode i neobnavljanjem površine CPE prilikom određivanja klaritromicina dobija stabilniji signal ciljnog analita. Zbog toga će se u toku daljeg određivanja ispitivanog analita prvo isciklirati elektroda a potom vršiti njegovo određivanje bez obnavljanja površine radne elektrode.

4.3.3.2. Voltametrijsko određivanje u model rastvoru

Nakon odabira optimalne pH vrednosti i utvrđivanja optimalnih uslova merenja snimani su SW voltamogrami pri različitim koncentracijama klaritromicina (slika 99A), a na osnovu intenziteta struje dobijenih oksidacionih pikova konstruisana je odgovarajuća kalibraciona kriva (slika 99B).

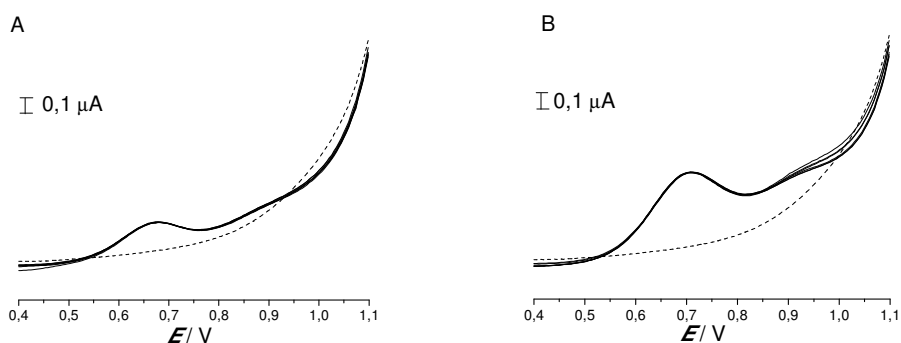


Slika 99. SW voltamogrami klaritromicina u koncentracionom opsegu 4,76-37,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (A) i odgovarajuća kalibraciona kriva (B). Isprekidana linija prikazuje odgovarajući voltamogram bazne linije pri pH 12,0

Prilikom konstruisanja odgovarajuće kalibracione krive uočavaju se dva linearna opsega, što je takođe slučaj i kod određivanja EES-a i azitromicina primenom SWV metode. Prvi je u opsegu koncentracija od 4,76 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do 7,41 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a drugi od 7,41 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do 37,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Kako i u slučaju dva prethodna pomenuta antibiotika može se pretpostaviti da se prvi linearni

opseg može primeniti za određivanje klaritromicina u realnim uzorcima primenom metode standardnog dodatka.

Reproduktivnost analitičkog signala ispitana je na osnovu šest uzastopnih merenja pri koncentraciji ciljnog analita $5,66 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $28,6 \mu\text{g mL}^{-1}$, a dobijeni SW voltamogrami su predstavljeni na slici 100A odnosno 100B. Izračunata RSD na osnovu dobijenih intenziteta oksidacionog signala klaritromicina je 1,2% pri koncentraciji $5,66 \mu\text{g mL}^{-1}$ i 1,0% pri koncentraciji $28,6 \mu\text{g mL}^{-1}$.



Slika 100. Reproductivnost analitičkog signala klaritromicina na osnovu šest uzastopnih merenja pri pH 12,0. Koncentracija klaritromicina $5,66 \mu\text{g mL}^{-1}$ (A) i $28,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ (B). Isprekidane linije prikazuju odgovarajuće voltamograme bazne linije pri pH 12,0

Odgovarajući analitički parametri određivanja klaritromicina primenom nemodifikovane CPE pri pH 12,0 dati su u tabeli 14.

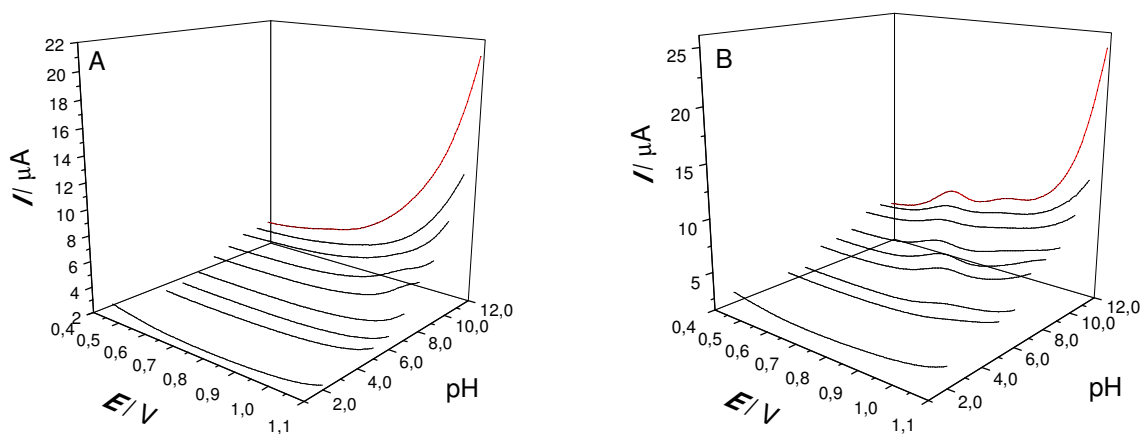
Tabela 14. Analitički parametri određivanja klaritromicina primenom CPE i optimizovane SWV metode

Parametri	I linearni opseg	II linearni opseg
Linearni opseg ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	4,76-7,41	7,41-37,5
Odsečak (μA)	0,004	0,096
Nagib ($\mu\text{A mL } \mu\text{g}^{-1}$)	0,022	0,008
Koeficijent korelacije	0,994	0,998
GD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,43	
GO ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	4,76	

4.3.4. Voltametrijsko ponašanje roksitromicina i njegovo određivanje u model rastvoru i odabranom farmaceutskom proizvodu

4.3.4.1. Voltametrijska karakterizacija

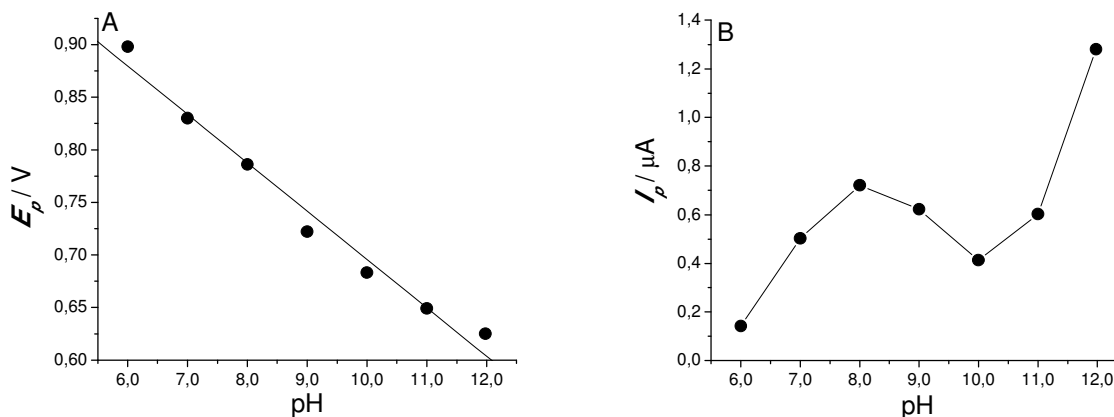
Ispitivanjem uticaja pH vrednosti sredine (od pH 2,0 do pH 12,0) na oblik i intenzitet oksidacionog signala roksitromicina pri koncentraciji $33,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ primenom SWV metode uočen je oksidacioni pik ciljnog analita pri pH vrednostima većim od pH 5,0 na potencijalu između 0,90 V i 0,60 V u zavisnosti od pH vrednosti sredine. Kao pomoćni elektrolit korišćen je Briton-Robinsonov pufer i SW voltamogrami su snimani u opsegu potencijala od 0,40 V do 1,10 V. Analogno prethodno pomenutim makrolidima, na slici 101 prikazani su SW voltamogrami slepih proba/bazne liniji (slika 101A) i SW voltamogrami u prisustvu ispitivanog analita (slika 101B) pri odabranim pH vrednostima sredine (pH 2,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0; 11,0 i 12,0).



Slika 101. SW voltamogrami snimljeni primenom CPE: A) Briton-Robinson pomoćni elektrolit pri odabranum pH vrednostima (pH 2,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0; 11,0 i 12,0) i B) isti rastvori pufera u prisustvu $33,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ roksitromicina

Slično ponašanju klaritromicina u izraženo alkalnoj sredini ispitivanjem uticaja pH vrednosti na oblik i intenzitet signala roksitromicina pri pH 12,0 dovelo je do zapažanja da se javljaju dva oksidaciona pika ispitivanog analita. Za razvoj analitičke metode je u daljem primenjen signal na pozitivnijim vrednostima potencijala, na oko 0,6 V zbog pogodnijeg oblika i intenziteta.

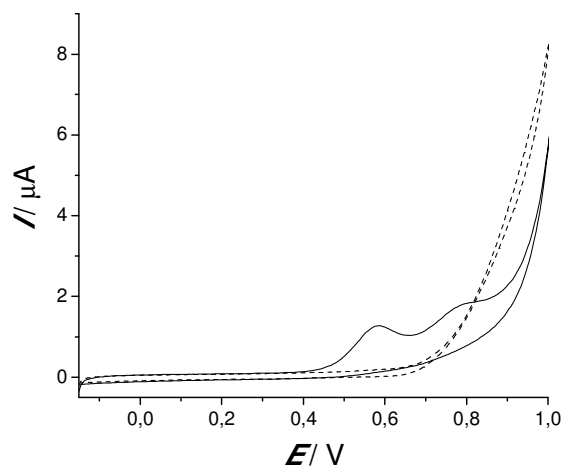
Na osnovu pik maksimuma i potencijala oksidacionog pika ROX-a konstruisane su odgovarajuće E_p -pH i I_p -pH zavisnosti koje su prikazane na slici 102.



Slika 102. E_p -pH (A) i I_p -pH (B) zavisnost signala roksitromicina ($c = 33,3 \mu\text{g mL}^{-1}$) u Briton-Robinson pomoćnom elektrolitu od pH 6,0 do pH 12,0

Sa prikazanih zavisnosti može se videti da se maksimum pika ispitivanog analita sa povećanjem pH vrednosti sredine pomera ka negativnijim potencijalima (slika 102A) i shodno tome može se zaključiti da je to karakteristično ponašanje za sva četiri ispitana makrolidna antibiotika primenom nemodifikovane CPE i SWV metode. Dobijena E_p -pH zavisnost može se opisati sledećom jednačinom: $E_p = 1,155 \text{ [V]} - 0,046 \text{ [V/pH]} \times \text{pH}$ ($r = -0,989$). Najintenzivniji pik roksitromicina se beleži pri pH 12,0 (slika 102B) i zbog toga kao i zbog oblika signala dobijenog pri toj pH vrednosti (E_p analitičkog signala je 0,63 V u odnosu na ZKE) dalja određivanja ciljnog analita će se vršiti pri pH 12,0.

Voltametrijsko ponašanje roksitromicina je takođe proučavano primenom CV pri pH 12,0. Ciklični voltamogrami snimani su u opsegu potencijala od -0,15 V do 1,00 V pri različitim brzinama skeniranja potencijala, a koncentracija roksitromicina je bila $60,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Na osnovu snimljenih voltamograma, uočeno je da sa povećanjem brzine skeniranja dolazi do porasta intenziteta signala i do njegovog pomeranja ka pozitivnijim vrednostima potencijala. Na slici 103 prikazani su ilustrativni ciklični voltamogrami pri brzini skeniranja $0,050 \text{ V s}^{-1}$ pri čemu ciklični voltamogram slepe probe (rastvor pomoćnog elektrolita) je prikazan isprekidanom linijom, a ciklični voltamogram u prisustvu roksitromicina prikazan je punom linijom.

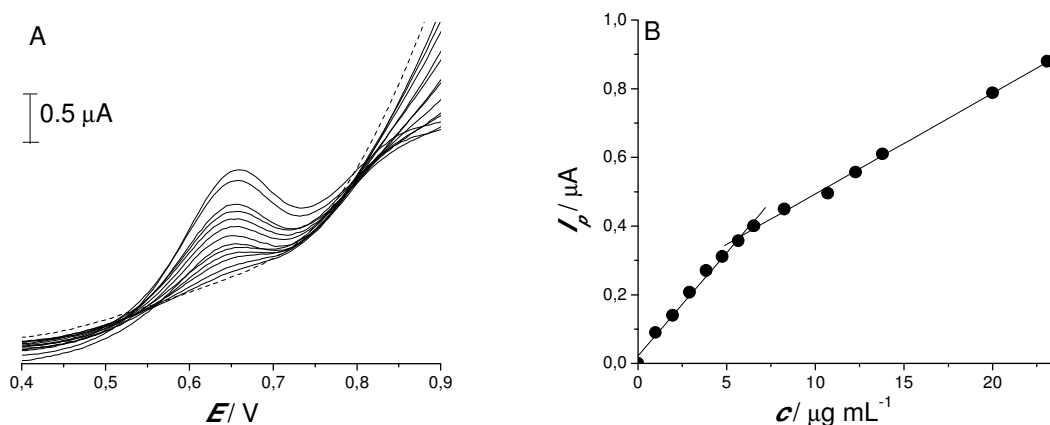


Slika 103. Ciklični voltamogrami pri pH 12,0 i brzini skeniranja $0,050 \text{ V s}^{-1}$. Ciklični voltamogram slepe probe (isprekidana linija), ciklični voltamogram roksitromicina (puna linija)

Na cikličnom voltamogramu snimljenom u prisustvu roksitromicina uočavaju se dva oksidaciona pika ciljnog analita što je u slaganju sa dobijenim SW voltamogramima roksitromicina pri istoj pH vrednosti. Prvi oksidacioni pik javlja se na potencijalu oko 0,6 V a drugi na oko 0,8 V. Na osnovu cikličnog voltamograma možemo videti da su oba oksidaciona pika ireverzibilna. Ciklični voltamogrami snimani su pri brzini skeniranja od $0,010$ do $0,075 \text{ V s}^{-1}$ i na osnovu linearne zavisnosti intenziteta oksidacionog pika na E_p oko 0,6 V i kvadratnog korena brzine skeniranja potencijala, koja se može opisati jednačinom $I_p = -0,039 [\mu\text{A}] - 0,083 [\mu\text{A}/(\text{mV s}^{-1})^{1/2}] \times v^{1/2}$ ($r = -0,995$), možemo zaključiti da proces koji se odigrava na elektrodnoj površini je kontrolisan difuzijom.

4.3.4.2. Voltametrijsko određivanje u model rastvoru

Nakon optimizacije SWV operativnih parametara i odabira optimalne pH vrednosti sredine, vršeno je ispitivanje linearne oblasti analitičke metode određivanja ciljnog analita. SW voltamogrami snimani su u opsegu potencijala od 0,40 V do 1,10 V pri različitim koncentracijama ispitivanog analita. Na slici 104A prikazani su SW voltamogrami snimljeni u opsegu koncentracija roksitromicina od $0,99 \mu\text{g mL}^{-1}$ do $23,1 \mu\text{g mL}^{-1}$, a na slici 104B predstavljena je odgovarajuća kalibraciona kriva.



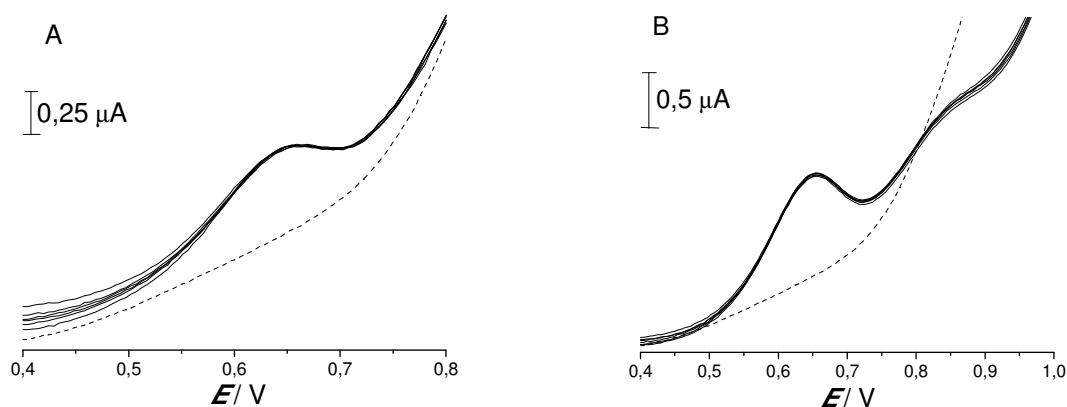
Slika 104. SW voltamogrami roksitromicina u koncentracionom opsegu 0,99-23,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (A) i odgovarajuća kalibraciona kriva (B). Isprekidana linija prikazuje odgovarajući voltamogram bazne linije pri pH 12,0

Na osnovu dobijene zavisnosti intenziteta struje pika ciljnog analita od njegove koncentracije, uočavaju se dva linearna opsega. Prvi je u koncentracionom opsegu od 0,99 do 6,54 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dok je drugi linearni opsegu u opsegu koncentracija od 6,54 do 23,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Analitički parametri za obe linearne oblasti dati su u tabeli 15.

Tabela 15. Analitički parametri određivanja roksitromicina primenom CPE i optimizovane SWV metode

Parametri	I linearni opseg	II linearni opseg
Linearni opseg ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,99-6,54	6,54-23,1
Odsečak (μA)	0,021	0,200
Nagib ($\mu\text{A mL } \mu\text{g}^{-1}$)	0,060	0,029
Koeficijent korelacije	0,996	0,999
GD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,3	
GO ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,99	

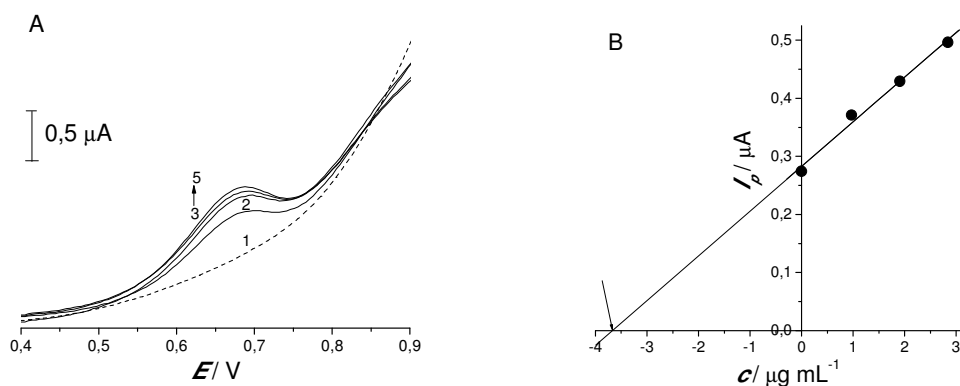
Ispitana je reproduktivnost analitičkog signala roksitromicina za obe linearne oblasti na osnovu šest uzastopnih merenja pri koncentraciji roksitromicina $4,76 \mu\text{g mL}^{-1}$ (slika 105A) i $13,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ (slika 105B). RSD za nižu koncentraciju ispitivanog analita je 1,3% dok je za višu koncentraciju 1,9%.



Slika 105. Reproductivnost analitičkog signala roksitromicina na osnovu šest ponovljenih merenja pri koncentracija od $4,76 \mu\text{g mL}^{-1}$ (A) i $13,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ (B) primenom SWV metode. Isprekidane linije prikazuju odgovarajuće voltamograme bazne linije pri pH 12,0

4.3.4.3. Voltametrijsko određivanje u odabranom farmaceutskom proizvodu

Primenljivost optimizovane SWV metode određivanja roksitromicina jet testirana za određivanje aktivne komponente tj. roksitromicina u komercijalnoj formulaciji Runac[®] (slika 106) u oblasti koncentracija koje pripadaju prvoj linearnoj oblasti kalibracione krive čime je i testirana pretpostavka da se u ovoj oblasti koncentracija koje pripadaju prvoj linearnoj oblasti može određivati ciljni analit primenom metode standardnog dodatka. Nakon snimanja bazne linije/slepe probe (slika 106A, kriva 1, isprekidana linija) dodat je određeni alikvot adekvatno pripremljenog rastvora tablete tako da je po deklaraciji proizvođača koncentracija roksitromicina u voltametrijskoj ćeliji iznosi $3,66 \mu\text{g mL}^{-1}$ (slika 106A, kriva 2), a potom su dodata tri standardna dodatka roksitromicina (slika 106A, krive 3-5) tako da su konačne koncentracije roksitromicina u voltametrijskoj ćeliji usled standardnih dodataka bile $0,97$; $1,91$ i $2,84 \mu\text{g mL}^{-1}$.



Slika 106. *Određivanje koncentracije roksitromicina u farmaceutskom preparatu Runac[®] primenom metode standardnog dodatka. SW voltamogrami (A): bazna linija (1), uzorak komercijalne formulacije (2) i tri standardna dodatka roksitromicina (3-5, krajnje koncentracije standardnih dodataka u voltametrijskoj ćeliji: 0,97; 1,91 i 2,84 μg mL⁻¹) i odgovarajuća analitička prava (B)*

Određen je sadržaj roksitromicina kao 3,67 μg mL⁻¹ (slika 106B) što preračunato na tabletu iznosi 150,5 mg/tableti, što je u saglasnosti sa deklarisanim sadržajem roksitromicina u tableti (150 mg). Urađena su još dva ponavljanja određivanja sadržaja roksitromicina i nakon preračunavanja na tabletu dobijene su vrednosti 151,3 mg i 150,9 mg. Srednja vrednost dobijenih rezultata iznosi 150,9 mg što je veoma blizu deklarisanom sadržaju i zadovoljava osnovne uslove Evropske farmakopeje 8 [170] u pogledu grešaka u tačnosti merenja i potvrđuje da je u analiziranim tabletama pronađen sadržaj roksitromicina koji je propisan po deklaraciji proizvođača. RSD na osnovu tri ponovljena merenja iznosi 0,15%.

Elektroda od ugljenične paste pokazala se kao pogodna radna elektroda za voltametrijsko određivanje odabranih makrolidnih antibiotika zasnovano na njihovoj oksidaciji. Primenom SWV metode uočavaju se dva linearna opsega kalibracionih krivi i pretpostavlja se da se u koncentracionom opsegu koji pripada prvoj linearnoj oblasti ciljni analit može određivati metodom standardnog dodatka, što je i potvrđeno u slučaju roksitromicin i njegovog određivanja u komercijalnoj formulaciji Runac[®].

5. ZAKLJUČAK

Antibiotici predstavljaju veliko otkriće u polju medicine i zahvaljujući njima spašeno je više od sedam miliona života. Međutim pored svojih dobrih osobina antibiotici mogu da izazovu i veliki broj neželjenih efekata. Žučne kiseline predstavljaju fiziološke deterdžente, kao i glavni put izbacivanja viška holesterola iz organizma, ali ukoliko se ne kontroliše njihova koncentracija mogu da budu citotoksične po organizam. Zbog toga, ova doktorska disertacije se bavila razvojem analitičkih metoda pre svega voltametrijskih metoda u kombinaciji sa jednostavnim i savremenim elektrodama/senzorima za određivanje odabranih analita od farmakološkog značaja doksorubicina (DOX), makrolidnih antibiotika (eritromicin-etilsukcinata (EES), azitromicina (AZI), klaritromicina (CLA) i roksitromicina (ROX)) i 3-dehidro-deoksiholne kiseline, kako u model rastvoru tako i u odabranim model i realnim uzorcima.

Voltametrijsko ponašanje i određivanje odabranih antibiotika primenom obnovljive srebro-amalgam film elektrode

Voltametrijska karakterizacija antracikličnog antibiotika doksorubicina, i njegovo određivanje primenom obnovljive srebro-amalgam film elektrode (Hg(Ag)FE) rađeno je direktnom katodnom voltametrijom sa pravougaonim talasima (SWV) i visoko osetljivom adsorptivnom voltametrijom sa pravougaonim talasima (SW-AdSV) u Briton-Robinson puferu (pH 2,0-8,0). Odgovor DOX-a primenom Hg(Ag)FE praćen je u intervalu potencijala od -0,20 do -0,80 V. Za analizu tragova, optimizacija metode ukazuje da su optimalni parametri za analitički pik na potencijalu (E_p) -0,57 V u odnosu na zasićenu kalomelovu elektrodu (ZKE): pH 6,0, potencijal akumulacije -0,20 V i vreme akumulacije 140 s. U model rastvoru, DOX je određivan u koncentracionom opsegu 4,99-59,64 ng mL⁻¹. Razvijena SW-AdSV metoda je primenjena za određivanje DOX-a u obogaćenom uzorku humanog urina. Niža koncentracija DOX-a 9,89 ng mL⁻¹ u voltametrijskoj ćeliji je određivana sa relativnom standardnom devijacijom (RSD) manjom od 6,0%. Takođe, primenom Hg(Ag)FE sprovedena je voltametrijska karakterizacija i određivanje polu-sintetičkih makrolidnih antibiotika azitromicina, klaritromicina i roksitromicina i eritromicin-etilsukcinata (široko korišćena esterifikovana forma antibiotika eritromicina) u Briton-Robinsonovom puferu kao pomoćnom elektrolitu u opsegu od pH 4,0 do pH 11,9. Sva četiri makrolida pokazuju redukcionni pik u

dalekoj negativnoj oblasti potencijala. Ispitivanja direktnom katodnom SWV rađena su u opsegu potencijala od -0,75 V do -2,00 V u odnosu na ZKE, pri čemu su dobijena jedan ili dva redukciona pika u opsegu potencijala od -1,5 V do -1,9 V. Oblik i intenzitet signala zavisi od primenjene pH vrednosti u širokoj pH oblasti. Za analitičke svrhe, radi razvoja direktne katodne SWV i adsorptivne inverzne/stripping SWV metode, pogodnim su se pokazale neutralna i slabo alkalna sredina tj. pH 7,0 sa E_p na -1,67 V u odnosu na ZKE za ROX i EES i pH 7,2 sa E_p na -1,85 V u odnosu na ZKE za AZI i pH 7,4 sa E_p na -1,64 V u odnosu na ZKE za CLA. Na osnovu snimljenih cikličnih voltamograma na optimalnim pH vrednostima, može se predložiti adsorptivno-kontrolisan kinetički proces na elektrodi u slučaju sva četiri ispitivana jedinjenja. Takođe, ^1H NMR merenja uz potiskivanje signala vode u pH oblasti između pH 6,0 i 10,5 ukazuju na to da su makrolidni molekuli pri optimalnim analitičkim uslovima predominantno u protonovanoj formi preko tercijerne amino grupe što potpomaže, u sva četiri slučaja, njihovu adsorpciju na odgovarajuće polarizovanoj Hg(Ag)FE. Optimizovane direktne katodne SWV metode pokazuju dobru linearnost u koncentracionom opsegu 4,81-23,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 4,53-29,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 1,96-28,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i 1,48-25,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za AZI, EES, CLA odnosno ROX. Razvijene SW-AdSV metode rezultiraju u linearnom odgovoru pri nižim koncentracionim intervalima 1,0-2,46 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 0,69-2,44 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 0,05-0,99 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i 0,10-0,99 $\mu\text{g mL}^{-1}$, za AZI, EES, CLA i ROX. RSD za sve razvijene metode nije veća od 1,5% izuzev SWV metode u slučaju AZI-a gde je 4,5% što se može objasniti oblikom i potencijalom redukcionog pika AZI-a. U slučaju sva četiri ispitivana makrolidna antibiotika protonovana forma tercijerne amino grupe(a) na odgovarajućem potencijalu i vremenu akumulacije favorizuje adsorpciju jonskog oblika ispitivanih molekula čime se omogućava razvijanje SW-AdSV metode za određivanje tragova analita na Hg(Ag)FE. Direktna katodna SWV metoda je uspešno primenjena za određivanje EES-a u farmaceutskom proizvodu Eritromicin[®] i pronađen sadržaj iznosi 251,2 mg/tableti sa RSD 0,95% (deklarisan sadržaj je 250 mg/tableti) dok SW-AdSV metoda je primenjena u slučaju određivanja EES-a u obogaćenom uzorku humanog urina i pronađen sadržaj je 1,39 $\mu\text{g mL}^{-1}$ sa RSD 5,3% (dodata koncentracija je 1,37 $\mu\text{g mL}^{-1}$) i za određivanje ROX-a u farmaceutskom proizvodu Runac[®] i pronađen sadržaj je 149,52 mg/tableti sa RSD 0,5% (deklarisan sadržaj je 150 mg/tableti). U svim pomenutim slučajevima, primenjena je metoda standardnog dodatka. Pouzdanost i tačnost elaboriranih procedura u slučaju određivanja EES-a u model sistemu i

farmaceutskom proizvodu Eritromicin[®] su potvrđena poređenjem sa rezultatima dobijenim primenom HPLC-DAD metode sa pronađenim sadržajem 250,5 mg/tableti i RSD 1,1%.

Imajući u vidu da Hg(Ag)FE sadrži amalgam umesto visoko toksične žive, ova elektroda se može smatrati primenljivijom i ekološki prihvatljivom. Takođe, zbog adsorptivnog efekta koji se prepoznaje u slučaju sva četiri ispitivana makrolida, pod različitim okolnostima usled razlike u osnovnoj strukturi ispitivanih jedinjenja, osetljivost njihovog određivanja pri optimalnim akumulacionim uslovima je uporediva sa vrednostima dobijenim primenom Hg na osovu literaturnih podataka. Sve ove činjenice pokazuju da je Hg(Ag)FE pogodna za brzu i pouzdanu analizu pomenutih ispitivanih antibiotika.

Voltametrijsko ponašanje 3-dehidro-deoksiholne kiseline i njeno određivanje u model rastvoru primenom ex situ pripremljene bizmut-film elektrode

Nakon preliminarnih studija 3-dehidro-deoksiholne kiseline/3-dehidro-deoksiholata primenom elektrode od staklastog ugljenika (GCE), gde je uočeno da ne dolazi do formiranja redukcionog signala u Briton-Robinson puferu između pH 5,0 i 11,8 primenom direktne katodne SWV, bizmut-film je izdvojen *ex situ* na površini iste elektrode od staklastog ugljenika (BiF-GCE) iz uobičajeno korišćenog rastvora za elektrodepoziciju koji sadrži 0,02 mol L⁻¹ rastvor Bi(NO₃)₃, 1,0 mol L⁻¹ HCl i 0,5 mol L⁻¹ KBr i tako pripremljena elektroda je primenjena za karakterizaciju i određivanje pomenutog jedinjenja u alkalnoj sredini u kojoj je ispitivani analit prisutan u obliku 3-dehidro-deoksiholata. Redukcioni signal ispitivanog analita od analitičkog značaja je uočen jedino primenom BiF-GCE u Briton-Robinson puferu sa pH vrednostima između 9,5 i 11,8 u režimu adsorptivne inverzne/stripping voltametrije sa pravougaonim talasima, dok u slučaju direktnih katodnih SWV eksperimentalnih uslova uočen je slab redukcioni pik sa niskom strujom maksimuma pika koji je razvučenog i asimetričnog oblika što otežava primenu pika za analitičke svrhe. Optimizovani eksperimentalni uslovi za određivanje 3-dehidro-deoksiholata obuhvataju odgovarajuće kondicioniranje elektrode uključujući kondicioniranje *ex situ* pripremljene BiF-GCE u Briton-Robinson pomoćnom elektrolitu pH 11,8 do stabilizacije struje bazne linije elektrohemijskim cikliranjem potencijala radne elektrode u potencijalskom opsegu između -1,00 i -2,00 V u odnosu na ZKE (blizu 15 puta) i primenu dva ključna parametara adsorptivne voltametrije sa pravougaonim talasima: vreme akumulacije od 30 s i

potencijal akumulacije -1,00 V u odnosu na ZKE. Zbog relativne asimetričnosti dobijenih redukcionih signala ispitivanog analita sa E_p na -1,35 V u odnosu na ZKE, što je takođe prisutno i u slučaju primene SW-AdSV ali ne u tako izraženoj formi kao što je to u slučaju direktnih SWV merenja, određivanje 3-dehidro-deoksiholne kiseline/3-dehidro-deoksiholata je zasnovano na linearnoj zavisnosti između površine pika redukcionog signala ispitivanog analita i njegove odgovarajuće koncentracije i postignuta granica detekcije je $1,43 \mu\text{g mL}^{-1}$ sa dva linearna opsega kalibracione krive od $4,76 \mu\text{g mL}^{-1}$ do $13,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ i od $13,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ do $23,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ za razvoj analitičke metode. RSD metode je 3,22%. Pored toga proučavana je elektroliza ispitivanog analita na potencijalu -1,55 V (blizu maksimuma pika ciljnog analita) u odnosu na ZKE koja su sprovedena primenom GCE u obliku ploče (površina $33,52 \text{ cm}^2$) modifikovane sa *ex situ* pripremljenim bizmut-filmom. Rastvor od interesa uzorkovan je na početku eksperimenta, nakon 2,5 h i nakon 4,5 h tretmana. Ovakvi uzorci su analizirani primenom ^1H NMR merenja uz potiskivanje signala vode u puferskom rastvoru pH 11,8. Može se pretpostaviti da tokom elektrolize 3-dehidro-deoksiholata dolazi do redukcije keto grupe prisutne u strukturi ispitivanog analita.

Na osnovu gore navedenih eksperimenata BiF-GCE, kao ekološki prihvatljiva, savremena voltametrijska radna elektroda, omogućava osetljivu i pouzdanu analitičku metodu za određivanje 3-dehidro-deoksiholne kiseline u obliku 3-dehidro-deoksiholata u niskoj $\mu\text{g mL}^{-1}$ koncentracionoj oblasti preko njegovog redukcionog signala. Pored toga, BiF-GCE služi kao radna elektroda za elektrolizu ispitivanog analita pri konstantnom potencijalu. Na taj način, pripremljeni uzorci nakon analize primenom nekih drugih tehnika kao što je npr. ^1H NMR merna tehnika uz potiskivanje signala vode mogu da daju bolji uvid u ispitivani sistem.

Voltametrijsko ponašanje i određivanje makrolidnih antibiotika primenom elektrode od ugljenične paste

Poznato je od ranije da neki od ciljnih makrolidnih antibiotika kao što je npr. azitromicin pokazuju oksidativno ponašanje na elektrodi od ugljenične paste i elektrodi od zlata. U okviru doktorske disertacije detaljna karakterizacija i određivanje makrolidnih antibiotika eritromicin-etilsukcinata, azitromicina, klaritromicina i roksitromicina zasnovano na njihovoj elektrohemijskoj oksidaciji rađeno je primenom jednostavne, lake za pripremu, ekološki

prihvatljive i primenljive, i ekonomski pristupačne elektrode od ugljenične paste (CPE) koja se sastoji samo od grafitnog praha i parafinskog ulja. Ovakva jednostavna elektroda u kombinaciji sa optimizovanim brzim, direktnim anodnim SWV metodama je primenjena za analizu sva četiri ispitivana makrolida. Pored toga, u slučaju EES-a i AZI-a diferencijalna pulsna voltometrija (DPV) je testirana za iste svrhe. Ključni parametar u slučaju razvoja analitičkih voltometrijskih metoda je odabir pH vrednosti pomoćnog elektrolita. Kao odgovarajuće pH vrednosti za voltometrijsko određivanje EES-a primenom SWV metode odabrana je pH 8,0 sa E_p na 0,83 V u odnosu na ZKE, dok u slučaju DPV metode pH 12,0 sa E_p na 0,55 V u odnosu na ZKE je bila najpogodnija za analitičke svrhe. Za određivanje AZI-a, u slučaju obe SWV i DPV metode pH 7,0 se pokazala najpogodnijom sa E_p analitičkog signala na 0,85 V odnosno 0,80 V u odnosu na ZKE, dok u slučaju CLA i ROX koji su ispitivani samo primenom SWV metode za analitičke svrhe pH 12,0 je bila najpogodnija sredina sa E_p analitičkog signala na 0,65 V odnosno na 0,63 V u odnosu na ZKE. U svim pomenutim slučajevima oblik/simetričnost i intenzitet oskidacionog pika je bio kriterijum za odabir pomoćnog elektrolita za analitičke svrhe. Postignute granice detkcije primenom nemodifikovane CPE i direktne anodne SWV su uglavnom u submikrogramskom koncentracionom opsegu $0,17 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,32 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $0,30 \mu\text{g mL}^{-1}$, u slučaju EES-a, AZI-a i ROX-a i u niskom mikrogramskom koncentracionom opsegu $1,43 \mu\text{g mL}^{-1}$ za CLA. Razvijena SWV metoda sa jednostavnom CPE pokazala se pogodnom za određivanje ROX-a u komercijalnom proizvodu Runac[®] tableti, gde je srednja vrednost sadržaja ROX-a za tri ponovljena merenja $150,89 \text{ mg/tableti}$ sa RSD 0,15%, što je veoma blizu deklarisanom sadržaju od strane proizvođača koji iznosi 150 mg/tableti . Dodatno, u slučaju optimizovanih DPV metoda postignute granice detekcije za EES i AZI su u niskom mikrogramskom koncentracionom opsegu $1,03 \mu\text{g mL}^{-1}$ odnosno $1,53 \mu\text{g mL}^{-1}$. U želji da se postigne niža granica detekcije za AZI, DPV metoda je testirana u kombinaciji sa CPE radnom elektrodom površinski modifikovanom sa zlatnim nanočesticama prečnika 10 nm (Au-CPE) i postignuta granica detekcije je $0,95 \mu\text{g mL}^{-1}$ sa E_p analitičkog signala na 0,80 V u odnosu na ZKE. RSD metode u slučaju Au-CPE je 3,5%, dok je u slučaju nemodifikovane CPE 6,0%. Linearnost analitičke metode zasnovane na primeni Au-CPE je dva puta šira nego u slučaju primene nemodifikovane CPE.

Razvijene analitičke metode za određivanje makrolidnih antibiotika imaju brz odgovor, primenljive su, i elektroda od ugljenične paste u svojoj klasičnoj i jednostavnoj formi je

primenljiva, ekološki prihvatljiva, ekonomski pristupačna i pouzdana radna elektroda pogodna za gore navedene svrhe. Primer određivanja AZI-a primenom DPV metode pokazuje da modifikacija CPE jednostavnom metodom kapi sa savremenim materijalom, kao što su Au nanočestice, poboljšava osetljivost i reproduktivnost, i proširuje linearni opseg metode.

6. CONCLUSION

Voltammetric methods based on simple and contemporary electrodes/sensors for the determination of selected analytes of pharmacological significance

Antibiotics present a great discovery in the field of medicine and thanks to them were saved more than seven million people. But in addition to their good characteristics antibiotics can cause a large number of side effects. Bile acids are physiological detergents, as well as the main route of ejection of excess cholesterol from the body, and if did not control their concentration can be cytotoxic to the body. Therefore, this Ph.D. thesis dealt with the development of analytical methods, primarily voltammetric methods in combination with simple and contemporary electrodes/sensors, for the determination of selected analytes of pharmacological significance as doxorubicin (DOX), macrolide antibiotics (erythromycin ethylsuccinate (EES), azithromycin (AZI), clarithromycin (CLA) and roxithromycin (ROX)) and 3-dehydro-deoxycholic acid in the model solution and in selected model and real samples.

Voltammetric behavior and determination of selected antibiotics by renewable silver-amalgam film electrode

Voltammetric characterization of the anthracycline antibiotic doxorubicin and its determination using a renewable silver-amalgam film electrode (Hg(Ag)FE) was performed by direct cathodic square-wave voltammetry (SWV) and by the highly sensitive adsorptive square-wave voltammetry (SW-AdSV) in aqueous Britton-Robinson buffer solutions as supporting electrolyte (pH 2.0-8.0). The Hg(Ag)FE response of DOX was monitored in the potential range between -0.20 and -0.80 V. For the trace level analysis the method optimization showed that the optimal conditions for the analytical peak with peak potential (E_p) at -0.57 V vs. saturated calomel electrode (SCE) were: the pH 6.0, the accumulation potential -0.20 V, and the accumulation time 140 s. In the model solutions, DOX was determined in the concentration range of 4.99-59.64 ng mL⁻¹. The developed SW-AdSV method was applied for the determination of DOX in spiked human urine sample. The lowest concentration of DOX of 9.89 ng mL⁻¹ in voltammetric vessel was determined with the relative standard deviation (RSD) less than 6%. Furthermore, the Hg(Ag)FE was applied for voltammetric characterization and

determination of semi-synthetic macrolide antibiotics azithromycin, clarithromycin and roxithromycin and erythromycin ethylsuccinate (a widely used esterified form of this antibiotic erythromycin) in the Britton-Robinson buffer as supporting electrolyte ranging the pH from 4.0 to 11.9. All four macrolides showed reduction signals in fairly negative potential range. During direct cathodic SWV investigations conducted over the potential range from -0.75 V to -2.00 V vs. SCE, either one or two reduction peaks were obtained in the potential range from -1.5 to -1.9 V. The shapes and intensities of the signals depend on the applied pH values in wider pH ranges. For analytical purposes concerning the development of direct cathodic SWV and adsorptive stripping SWV methods the neutral and slightly alkaline media were suitable as pH 7.0 with E_p at -1.67 V vs. SCE for ROX and EES and pH 7.2 and pH 7.4 with E_p at -1.85 V and E_p at -1.64 V vs. SCE for AZI and CLA, respectively. Based on the cyclic voltammograms recorded at these pH values, adsorption-controlled electrode kinetics process can be proposed for all four investigated compounds. Furthermore, the water suppressed ^1H NMR measurements in the pH range between 6.0 and 10.5 indicated that the macrolide molecules at the optimal analytical conditions are predominantly in protonated form via their tertiary amino groups which supported in all four cases their adsorption on the appropriately polarized Hg(Ag)FE electrode. The optimized direct cathodic SWV methods showed good linearity in concentration ranges $4.81\text{--}23.3\ \mu\text{g mL}^{-1}$, $4.53\text{--}29.8\ \mu\text{g mL}^{-1}$, $1.96\text{--}28.6\ \mu\text{g mL}^{-1}$, and $1.48\text{--}25.9\ \mu\text{g mL}^{-1}$ for AZI, EES, CLA and ROX, respectively. The development of the SW-AdSV methods resulted in the linear responses at lower concentration ranges as $1.0\text{--}2.46\ \mu\text{g mL}^{-1}$, $0.69\text{--}2.44\ \mu\text{g mL}^{-1}$, $0.05\text{--}0.99\ \mu\text{g mL}^{-1}$ and $0.10\text{--}0.99\ \mu\text{g mL}^{-1}$, for AZI, EES, CLA and ROX, respectively. The RSD for all developed methods was not higher than 1.5% except the SWV method for AZI with 4.7% which can be explained by the peak shape and peak potential of the target analyte. In the case of all four investigated macrolide antibiotics the protonated form of the tertiary amino group(s) at appropriate accumulation potential and time favored the adsorption of the ionic form of the target molecules offering the opportunity for the development of SW-AdSV methods for their trace level analysis on Hg(Ag)FE. The direct cathodic SWV method was successfully applied for the determination of EES in the pharmaceutical preparation Eritromicin[®] as 251.2 mg/tablet with RSD 0.95% (the decelerated amount is 250 mg/tablet), while SW-AdSV was applied in the case of the spiked human urine sample for EES determination with determined amount as $1.39\ \mu\text{g mL}^{-1}$ with RSD 5.3% (spiked amount is $1.37\ \mu\text{g mL}^{-1}$), and for determination of ROX in

pharmaceutical preparation Runac[®] as 149.52 mg/tablet with RSD 0.5% (the decelerated amount is 150 mg/tablet). In all mentioned cases, the standard addition method was used. The reliability and accuracy of the elaborated procedures in the case of EES determination in model system and pharmaceutical preparation Eritromicin[®] were validated by comparing them with those obtained by means of HPLC-DAD measurements with determined amount as 250.5 mg/tablet with RSD of 1.1%.

Having in mind that the Hg(Ag)FE contains amalgam instead of the highly toxic mercury, it can be considered as more user and environmental friendly. Furthermore, because of the adsorption effect which is recognized in the case of all four investigated macrolides, under different circumstances due to the different basic structure of the investigated compounds, the sensitivity of their determination under optimal accumulation conditions is comparable with the values obtained by Hg based on the literature data. All these facts demonstrate that the Hg(Ag)FE electrode is a suitable tool for rapid and reliable analysis of the mentioned target antibiotics analytes.

Voltammetric behavior of 3-dehydro-deoxycholic acid and its determination in model solution by ex situ prepared bismuth-film electrode.

After preliminary study of 3-dehydro-deoxycholic acid/3-dehydro-deoxycholate by glassy carbon electrode, where the absence of any reduction peak was observed in the Britton-Robinson buffer solutions between pH 5.0 and 11.8 by direct cathodic SWV, a bismuth-film was electrodeposited *ex situ* on the same glassy carbon electrode surface (BiF-GCE) from the usually used 0.02 mol L⁻¹ Bi(NO₃)₃, 1.0 mol L⁻¹ HCl and 0.5 mol L⁻¹ KBr containing plating solution and this electrode configuration was applied for the characterization and determination of the mentioned compound in alkaline media where the target analyte is presents in the form of 3-dehydro-deoxycholol. The reduction signal of analytical importance from the target analyte was observed only by BiF-GCE in Britton-Robinson buffer solutions with pH values between 9.5 and 11.8 in adsorptive stripping square-wave voltammetry working regime, while in the case of the direct cathodic SWV experimental protocol only a very poor reduction peak was obtained with low current maxima, and with lengthy and assymmetric peak with inconvenient shape for analytical proposes. The optimized experimental conditions for the 3-dehydro-deoxycholate determination

encompasses the appropriate electrode conditioning including the conditioning of the *ex situ* prepared BiF-GCE in the Britton-Robinson supporting electrolyte pH 11.8 till the stabilization of the baseline current by electrochemical cycling of the working electrode potentials in the potential span between -1.0 and -2.0 V vs. SCE (nearly 15 times), and the application of two key parameters of the adsorptive square-wave voltammetric protocol: the accumulation time as 30 s and accumulation potential as -1.0 V vs. SCE. Because of the relative asymmetry of the obtained reduction signals of the target analyte with E_p at -1.35 V vs. SCE, which is still present in the case of the SW-AdSV but not with such dominant form as it is case in direct SWV measurements, the quantification of 3-dehydro-deoxycholic acid/3-dehydro-deoxycholate was based on the linear correlation between peak area of the reduction signal of the target analyte and its appropriate concentrations, and reached limit of detection is $1.43 \mu\text{g mL}^{-1}$ and with two linear ranges of calibration curve from $4.76 \mu\text{g mL}^{-1}$ to $13.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ and from $13.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ to $23.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ for the development of analytical method. The RSD of the method was 3.22%. Additional experiments were performed applying GCE with rectangular form (area 35.32 cm^2) modified with *ex situ* prepared bismuth-film for the electrolysis of the target analyte which was performed at the potential -1.55 V (nearly the peak maxima of the target analyte) vs. SCE. The solution of interest was sampled at the beginning of the experiment, after 2.5 h and after 4.5 h of treatment. Such samples were analysed by simply water suppressing ^1H NMR measurements in the buffered solution at pH 11.8. It can be assumed that during electrolysis of 3-dehydro-deoxycholate the reduction of the keto group present in the structure of the target analyte can be occurred.

Based on the above experiments the BiF-GCE, as an environmental friendly, contemporary voltammetric working electrode, is offering a sensitive and reliable analytical method for the determination of 3-dehydro-deoxycholic acid in the 3-dehydro-deoxycholate form in lower $\mu\text{g mL}^{-1}$ concentration range via its reduction signal. Furthermore, BiF-GCE served as working electrode for electrolysis of target analyte at constant potential value. On such way prepared samples after their analysis by other experimental technique as eg. water suppressed ^1H NMR can give deeper insight into the investigated system.

Voltammetric behavior and determination of macrolide antibiotics by carbon paste electrode

It is known from earlier that some of the target macrolide antibiotics as e.g. azithromycin showed oxidation behavior at a carbon paste and gold working electrodes. In the framework of the Ph.D. thesis the detailed characterization and determination of macrolide antibiotics erythromycin ethylsuccinate, azithromycin, clarithromycin and roxithromycin based on their electrochemical oxidation was performed by simply, easy to prepare, environmental and user friendly, and low cost carbon paste electrode (CPE) constituted only from graphite powder and paraffin oil. Such simply electrode in combination with the optimized rapid, direct anodic SWV methods was applied for the analysis of the target macrolides. Furthermore, in the cases of EES and AZI differential pulse voltammetric (DPV) methods were tested for the same purpose as well. The key parameter in the case of the development of the analytical voltammetric methods is the selection of the pH value of the supporting electrolyte. As the appropriate pH value for determination of EES by SWV method the pH 8.0 was selected with E_p at 0.83 V vs. SCE while in the case of the DPV method the pH 12.0 with E_p at 0.55 V vs. SCE was the most suitable for analytical purpose. As for AZI determination, in the case of both SWV and DPV methods the pH 7.0 was the most appropriate supporting electrolyte with the E_p of analytical signal at 0.85 V and 0.80 V vs. SCE, respectively, while in the case of CLA and ROX which were investigated only with SWV method for the analytical purposes the pH 12.0 was the most suitable with E_p at 0.65 V and at 0.63 V vs. SCE, respectively. In all mentioned cases the shape/symmetry and intensity of the oxidation peak were the criteria for the selection of the supporting electrolyte for analytical purpose. The obtained detection limits applying the bare CPE and the direct anodic SWV are mainly in submicrogram concentration range as $0.17 \mu\text{g mL}^{-1}$; $0.32 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $0.30 \mu\text{g mL}^{-1}$ for EES, AZI, and ROX and in the low microgram concentration range as $1.43 \mu\text{g mL}^{-1}$ for the CLA, respectively. The developed SWV method with the simply CPE have proven to be suitable for the determination of ROX in the commercial formulation, Runac[®] tablet, where the average value for three determination defined the ROX content as 150.89 mg/tablet with RSD of 0.15% which is very close to the content declared by the manufacturer as 150 mg/tablet. Additionally, in the case of the optimized DPV methods the obtained detection limits for EES and AZI are in the low microgram concentration range $1.03 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $1.53 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. In order to achieve a lower limit of detection for AZI the DPV method was tested in combination with a CPE working electrode surface modified with gold nanoparticles with

diameter of 10 nm (Au-CPE) and reached the limit of detection was $0.95 \mu\text{g mL}^{-1}$ at E_p of 0.80 V vs. SCE. The RSD of the method in the case of the Au-CPE is 3.5% while in the case of the native CPE 6.0%. The linearity of the Au-CPE based analytical method is twice wider than it is case with the bare CPE applying protocol.

The developed analytical methods for the macrolide determinations are with fast response time, they are user friendly, and the carbon paste electrode in its classical and simplest form is a useful, environmental friendly, low cost and reliable working electrode applicable for the above purpose. The example of AZI determination by DPV method showed that modification of the CPE with contemporary material as Au nanoparticles by simply drop coating method improved the sensitivity and reproducibility, and expands the linear range of the method.

7. LITERATURA

1. G. Lancini, F. Parenti, G.G. Gallo, *Antibiotics a multidisciplinary approach*, Plenum Press, New York (1995) str. 2, 5, 8-13
2. R. Himanshu, Antimicrobial resistance: the current trend, *National Journal of Medical Research*, 1 (2011) 21
3. M. Prokopijević, Istorija primene antibiotika, *Hemijski pregled*, 45 (2004) 87
4. V.M. Varagić, M.P. Milošević, *Farmakologija*, Elit Medica, Beograd (1999) str. 533, 537, 582, 583
5. T. Kažić, *Farmakologija*, Integra, Beograd (2011) str. 367-370, 384-385
6. M.N. Preobrazhenskaya, A.N. Tevyashova, E.N. Olsufyeva, K.-F. Huang, H.-S. Huang, Second generation drugs-derivatives of natural antitumor anthracycline antibiotics daunorubicin, doxorubicin and carminomycin, *Journal of Medical Sciences*, 26 (2006) 119
7. M.M. Cox, J.A. Doudna, M. O'Donnell, *Molecular biology: Principles and Practice*, W.H. Freeman and Company, New York (2012)
8. G. Aubel-Sardon, D. Londos-Gagliardi, Daunorubicin and doxorubicin, anthracycline antibiotics, a physicochemical and biological review, *Biochimie*, 66 (1984) 333
9. M. Wasowska, I. Oszczapowicz, J. Wietrzyk, A. Opolski, J. Madej, S. Dzimira, J. Oszczapowicz, Influence of the structure of new anthracycline antibiotics on their biological properties, *Anticancer Research*, 25 (2005) 2043
10. J. Vacek, L. Havran, M. Fojta, The reduction of doxorubicin at a mercury electrode and monitoring its interaction with DNA using constant current chronopotentiometry, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 74 (2009) 1727
11. Š. Komorsky-Lovrić, Redox kinetics of adriamycin adsorbed on the surface of graphite and mercury electrodes, *Bioelectrochemistry*, 69 (2006) 82
12. K. Kano, T. Konse, N. Nishimura, T. Kubota, Electrochemical properties of adriamycin adsorbed on a mercury electrode surface, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 57 (1984) 2383
13. P. Manisankar, A. Gomathi, D. Velayutham, Oxygen reduction at the surface of glassy carbon electrodes modified with anthraquinone derivatives and dyes, *Journal of Solid State Electrochemistry*, 9 (2005) 601
14. Z. Jemelková, J. Zima, J. Barek, Voltammetric and amperometric determination of doxorubicin using carbon paste electrodes, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 74 (2009) 1503
15. P.S. Guin, S. Das, P.C. Mandal, Electrochemical reduction of quinones in different media: A Review, *International Journal of Electrochemistry*, 2011 (2010) 1
16. S. Zhang, K. Wu, S. Hu, Carbon paste electrode based on surface activation for trace adriamycin determination by a preconcentration and voltammetric method, *Analytical Sciences*, 18 (2002) 1089
17. J. Hu, Q. Li, Voltammetric behavior of adriamycin and its determination at Ni ion-implanted electrode, *Analytical Sciences*, 15 (1999) 1215
18. R.D. Arnold, J.E. Slack, R.M. Straubinger, Quantification of doxorubicin and metabolites in rat plasma and small volume tissue samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectroscopy, *Journal of Chromatography B*, 808 (2004) 141

19. A. Kümmerle, T. Krueger, M. Dusmet, C. Vallet, Y. Pan, H.B. Ris, L.A. Decosterd, A validated assay for measuring doxorubicin in biological fluids and tissues in an isolated lung perfusion model: matrix effect and heparin interference strongly influence doxorubicin measurements, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 33 (2003) 475
20. R. Ricciarello, S. Pichini, R. Pacific , I. Altieri, M. Pellegrini, A. Fattorossi, P. Zuccaro, Simultaneous determination of epirubicin, doxorubicin and their principal metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography and electrochemical detection, *Journal of Chromatography B*, 707 (1998) 219
21. J. Retsema, W. Fu, Macrolides: structures and microbial targets, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 18 (2001) S3
22. I. Kanfer, M.F. Skinner, R.B. Walker, Analysis of macrolide antibiotics, *Journal of Chromatography A*, 812 (1998) 255
23. J.K. Aronson, *Meyler's Side Effects of Drugs: The International Encyclopedia of Adverse Drug Reactions and Interactions*, Elsevier Sciences, New York (2006) str. 2183
24. K. Kannan, N. Vázquez-Laslop, A.S. Mankin, Selective protein synthesis by ribosomes with a drug-obstructed exit tunnel, *Cell*, 151 (2012) 508
25. T. Kaneko, T.J. Dougherty, T.V. Magee, Macrolide antibiotics, *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering, Comprehensive Medicinal Chemistry II*, 7 (2007) 519
26. V. Munić, M. Banjanac, S. Koštrun, K. Nujić, M. Bosnar, N. Marjanović, J. Ralić, M. Matijašić, M. Hlevnjak, V. Eraković Haber, Intensity of macrolide anti-inflammatory activity in J774A.1 cells positively correlates with cellular accumulation and phospholipidosis, *Pharmacological Research*, 64 (2011) 298
27. V. Eraković Haber, Macrolides - More than antibiotics, *Infektološki glasnik*, 31 (2011) 29
28. R.A. Sayed, W.S. Hassan, M.Y. El-Mamml, A. Shalaby, New spectrophotometric and conductometric methods for macrolide antibiotics determination in pure and pharmaceutical dosage forms using rose bengal, *Journal of Spectroscopy*, 2013 (2013) 1
29. S. Jia, J. Li, S.-R. Park, Y. Ryu, I.H. Park, J.H. Park, S.-S. Hong, S.W. Kwon, J. Leeb, Combined application of dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of floating organic droplets and charged aerosol detection for the simple and sensitive quantification of macrolide antibiotics in human urine, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 86 (2013) 204
30. V. Vaiano, O. Sacco, D. Sannino, P. Ciambelli, Photocatalytic removal of spiramycin from wastewater under visible light with N-doped TiO₂ photocatalysts, *Chemical Engineering Journal*, 261 (2015) 3
31. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/erythromycin#section=Top> (25.12.2015.)
32. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/azithromycin#section=Top> (25.12.2015.)
33. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/roxithromycin#section=Top> (25.12.2015.)
34. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/clarithromycin#section=Top> (25.12.2015.)
35. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5284619#section=3D-Status> (25.12.2015.)
36. J.M. Zuckerman, Macrolides and ketolides: azithromycin, clarithromycin, telithromycin, *Infectious Disease Clinics of North America*, 18 (2004) 621
37. M.J. González de la Huebra, U. Vincent, Analysis of macrolide antibiotics by liquid chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 39 (2005) 376

38. Z. Wang, J. Wang, M. Zhang, L. Dang, Solubility of erythromycin A dihydrate in different pure solvents and acetone + water binary mixtures between 293 K and 323 K, *Journal of Chemical & Engineering Data*, 51 (2006) 1062
39. L.K. Bekele, G.G. Gebeyehu, Application of different analytical techniques and microbiological assays for the analysis of macrolide antibiotics from pharmaceutical dosage forms and biological matrices, *ISRN Analytical Chemistry*, 2012 (2012) 1
40. S. Pal, A journey across the sequential development of macrolides and ketolides related to erythromycin, *Tetrahedron*, 62 (2006) 3171
41. E.F. Fiese, S.H. Steffen, Comparison of the acid stability of azithromycin and erythromycin A, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 25 (1990) 39
42. D. Greenwood, R. Finch, P. Davey, M. Wilcox, *Antimicrobial chemotherapy*, fifth ed., Oxford University Press Inc., New York (2007) str. 47
43. W. Lian, S. Liu, J. Yu, X. Xing, J. Li, M. Cui, J. Huang, Electrochemical sensor based on gold nanoparticles fabricated molecularly imprinted polymer film at chitosan-platinum nanoparticles/graphene-gold nanoparticles double nanocomposites modified electrode for detection of erythromycin, *Biosensors and Bioelectronics*, 38 (2012) 163
44. B. Nigović, B. Šimunić, Voltammetric assay of azithromycin in pharmaceutical dosage forms, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32 (2003) 197
45. D.H. Peters, H.A. Friedel, D. McTavish, Azithromycin. A review of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and clinical efficacy, *Drugs*, 44 (1992) 750
46. M. Ben-Eltriki, V. Somayaji, R.S. Padwal, D.R. Brocks, A liquid chromatography–mass spectrometric method for the quantification of azithromycin in human plasma, *Biomedical Chromatography*, 27 (2013) 1012
47. P. Zubata, R. Ceresole, M.A. Rosasco, M.T. Pizzorno, A new HPLC method for azithromycin quantitation, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 27 (2002) 833 (i refernce u njemu)
48. T. Pene Dumitrescu, T. Anic-Milic, K. Oreskovic, J. Padovan, K.L.R. Brouwer, P. Zuo, V.D. Schmith, Development of a population pharmacokinetic model to describe azithromycin whole-blood and plasma concentrations over time in healthy subjects, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57 (2013) 3194
49. M. Blažeković, Clinical use of clarithromycin - can it be expanded, *Infektološki glasnik*, 23 (2003) 67
50. A. Golmajer, F. Kozjek, Macrolides and their pharmacodynamic properties, *Farmaceutski Vestnik*, 51 (2000) 561
51. L. Zhang, X. Duan, Y. Wen, J. Xu, Y. Yao, Y. Lu, L. Lu, O. Zhang, Electrochemical behaviors of roxithromycin at poly(3,4-ethylenedioxythiophene) modified gold electrode and its electrochemical determination, *Electrochimica Acta*, 72 (2012) 179
52. K.M. Drljević-Djurić, V.D. Jović, U.Č. Lacnjevac, M.L. Avramov Ivić, S.D. Petrović, D.Ž. Mijin, S.B. Djordjević, Voltammetric and differential pulse determination of roxithromycin, *Electrochimica Acta*, 56 (2010) 47 (i refernce u njemu)
53. J. Peng, X. Hu, A simple fluorescence quenching method for roxithromycin determination using CdTe quantum dots as probes, *Journal of Luminescence*, 131 (2011) 952 (i refernce u njemu)
54. S. Đorđević, K. Drljević, B. Jovanović, V. Kilibarda, Determination of roxithromycin in human urine by liquid chromatography with photo diode array detection, *MD-Medical data*, 3 (2011) 345

55. N.H.S. Ammida, G. Volpe, R. Draisci, F. delli Quadri, L. Palleschic, G. Palleschi, Analysis of erythromycin and tylosin in bovine muscle using disposable screen printed electrodes, *Analyst*, 129 (2004) 15
56. J. Barek, J. Fischer, T. Navrátil, K. Pecková, B. Yosypchuk, J. Zima, Nontraditional electrode materials in environmental analysis of biologically active organic compounds, *Electroanalysis*, 19 (2007) 2003
57. J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, second ed., Wiley-VCH, New York (2001) str. 3, 67-84, 114 (i refernce u njemu)
58. H. Wang, A. Zhang, H. Cui, D. Liu, R. Liu, Adsorptive stripping voltammetric determination of erythromycin at a pretreated glassy carbon electrode, *Microchemical Journal*, 64 (2000) 67
59. M.L. Avramov Ivić, S.D. Petrović, D.Ž. Mijin, A study of the electrochemical activity of some macrolide antibiotics on a gold electrode in a neutral electrolyte, *Journal of the Serbian Chemical Society*, 72 (2007) 1427
60. M.L. Avramov Ivić, S.D. Petrović, F. Vonmoos, D.Ž. Mijin, P.M. Živković, K.M. Drljević, The qualitative electrochemical determination of clarithromycin and spectroscopic detection of its structural changes at gold electrode, *Electrochemistry Communications*, 9 (2007) 1643
61. H. Wan, F. Zhao, W. Wu, B. Zeng, Direct electron transfer and voltammetric determination of roxithromycin at a single-wall carbon nanotube coated glassy carbon electrode, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 82 (2011) 427
62. Z. Zhang, H. Tuo, On the linear scanning polarographic method of erythromycin ethylsuccinate, *Journal of Yanan University (Natural Science Edition)* 26 (2007) 1
63. W. Li, H. Jia, K. Zhao, Determination of clarithromycin in rat plasma by HPLC–UV method with pre-column derivatization, *Talanta*, 71 (2007) 385
64. *European Pharmacopoeia*, fifth ed., Council of Europe, volume 2 (2005) str. 1039, 1309, 1518, 1521, 2379.
65. Y. Jiang, J. Wang, H. Li, Y. Wang, J. Gu, Determination of clarithromycin in human plasma by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43 (2007) 1460
66. P. Wang, M. Qi, X. Jin, Determination of roxithromycin in rat lung tissue by liquid chromatography–mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 39 (2005) 618
67. M.A. García-Mayor, R.M. Garcinuño, P. Fernández-Hernando, J.S. Durand-Alegría, Liquid chromatography–UV diode-array detection method for multi-residue determination of macrolide antibiotics in sheep's milk, *Journal of Chromatography A*, 1122 (2006) 76
68. G. Bahrami, S. Mirzaeei, A. Kiani, High performance liquid chromatographic determination of azithromycin in serum using fluorescence detection and its application in human pharmacokinetic studies, *Journal of Chromatography B*, 820 (2005) 277
69. A. Deubel, A.S. Fandio, F. Sörgel, U. Holzgrabe, Determination of erythromycin and related substances in commercial samples using liquid chromatography/ion trap mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1136 (2006) 39
70. S. Kevresan, K. Kuhajda, J. Kandrac, J.P. Fawcett, M. Mikov, "Biosynthesis of bile acids in mammalian liver", in: *Bile Acids, Chemistry, Biosynthesis, Analysis, Chemical and*

- Metabolic Transformations and Pharmacology* (Eds. Momir Mikov, J Paul Fawcett), Mediset publisher, Geneva (2007) str. 35-51
71. D. Stamp, G. Jenkins, "An overview of bile-acid synthesis, chemistry and function", in: *Issues in Toxicology, Bile Acids: Toxicology and Bioactivity* (Eds. Gareth Jenkins, Laura J. Hardie), Royal Society of Chemistry, London (2008) str. 2
 72. P. Lefebvre, B. Cariou, F. Lien, F. Kuipers, B. Staels, Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation, *Physiological Reviews*, 89 (2009) 147
 73. R.S. Islam, J.K. DiBaise, Bile acids: An underrecognized and underappreciated cause of chronic diarrhea, *Practical Gastroenterology*, 36 (2012) 32
 74. K. Bodin, U. Lindbom, U. Diczfalusy, Novel pathways of bile acid metabolism involving CYP3A4, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1687 (2005) 84
 75. K.-Y. Tserng, A convenient synthesis of 3-keto bile acids by selective oxidation of bile acids with silver carbonate-Celite, *Journal of Lipid Research*, 19 (1978) 501
 76. P.B. Hylemon, J. Harder, Biotransformation of monoterpenes, bile acids, and other isoprenoids in anaerobic ecosystems, *FEMS Microbiology Reviews*, 22 (1999) 475
 77. M. Poša, J. Csanádi, K.E. Kövér, V. Guzsány, G. Batta, Molecular interactions between selected sodium salts of bile acids and morphine hydrochloride, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 94 (2012) 317
 78. M. Poša, QSPR study of the effect of steroidal hydroxy and oxo substituents on the critical micellar concentration of bile acids, *Steroids*, 76 (2011) 85
 79. K. Saar, S. Müllner, *Bile acid/liquid chromatography*, Academic Press, Cambridge (2000) str. 2130-2135
 80. A.H. Rahier, S. Lunardi, F. Nicolle, S.M. George, Low-level determination of silicon in steels by anodic stripping voltammetry on a hanging mercury drop electrode, *Talanta*, 82 (2010) 1839
 81. U. Yilmaz, D. Uzun, H. Yilmaz, A new method for rapid and sensitive determination of cholic acid in gallbladder bile using voltammetric techniques, *Microchemical Journal*, 122 (2015) 159
 82. X. Zhang, M. Zhu, B. Xu, Y. Cui, G. Tian, Z. Shi, M. Ding, Indirect electrochemical detection for total bile acids in human serum, *Biosensors and Bioelectronics*, 85 (2016) 563
 83. S. Kamada, M. Maeda, A. Tsuji, Separation and determination of bile acids by high-performance liquid chromatography using immobilized 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase and an electrochemical detector, *Journal of Chromatography*, 239 (1982) 773
 84. C. John, P. Werner, A. Worthmann, K. Wegner, K. Tödter, L. Scheja, S. Rohn, J. Heeren, M. Fischer, A liquid chromatography-tandem mass spectrometry-based method for the simultaneous determination of hydroxy sterols and bile acids, *Journal of Chromatography A*, 1371 (2014) 184
 85. K. Minato, M. Suzuki, H. Nagao, R. Suzuki, H. Ochiai, Development of analytical method for simultaneous determination of five rodent unique bile acids in rat plasma using ultra-performance liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 1002 (2015) 399
 86. D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, *Foundamentals of Analytical Chemistry*, sixth ed., Saunders College Publishing, New York (1992) str. 453-456, 478, 480, 649, 669, 670

87. [http://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Analytical_Chemistry_Textbook_Maps/Ma3A_Analytical_Chemistry_2.0_\(Harvey\)/11_Electrochemical_Methods/11.4%3A_Voltammetric_Methods](http://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Analytical_Chemistry_Textbook_Maps/Ma3A_Analytical_Chemistry_2.0_(Harvey)/11_Electrochemical_Methods/11.4%3A_Voltammetric_Methods) (22.12.2016.)
88. P. Protti, *Introduction to Modern Voltammetric and Polarographic Analysis Techniques*, fourth ed., Amel Electrochemistry, New York (2001) str. 8
89. V. Mirceski, R. Gulaboski, M. Lovric, I. Bogeski, R. Kappl, M. Hoth, Square-wave voltammetry: A review on the recent progress, *Electroanalysis*, 25 (2013) 2411
90. C.M.A. Brett, A.M. Oliveira Brett, *Electrochemistry Principles, Methods, and Applications*, Oxford University Press Inc., New York (1993) str. 129
91. P. Chorti, J. Fischer, V. Vyskocil, A. Economou, J. Barek, Voltammetric determination of insecticide thiamethoxam on silver solid amalgam electrode, *Electrochimica Acta*, 140 (2014) 5
92. Y.-H. Lee, C.-C. Hu, *Encyclopedia of Applied Electrochemistry, title: Mercury Drop Electrodes*, Holder Springer Science+Business Media, New York (2014) str. 1233-1240
93. V. Guzsvány, J. Petrović, J. Krstić, Zs. Papp, M. Putek, L. Bjelica, A. Bobrowski, B. Abramović, Renewable silver-amalgam film electrode for voltammetric monitoring of solar photodegradation of imidacloprid in the presence of Fe/TiO₂ and TiO₂ catalysts, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 699 (2013) 33
94. B. Baś, Z. Kowalski, Preparation of silver surface for mercury film electrode of prolonged analytical application, *Electroanalysis*, 14 (2002) 1067
95. R. Piech, B. Baś, B. Paczosa-Bator, W.W. Kubiak, Adsorptive stripping voltammetric determination of vanadium(V) with chloranilic acid using cyclic renewable mercury film silver based electrode, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 633 (2009) 333
96. R. Piech, B. Baś, W.W. Kubiak, The cyclic renewable mercury film silver based electrode for determination of uranium(VI) traces using adsorptive stripping voltammetry, *Electroanalysis*, 19 (2007) 2342
97. B. Baś, S. Baś, Rapidly renewable silver amalgam annular band electrode for voltammetry and polarography, *Electrochemistry Communications*, 12 (2010) 816
98. W. Opoka, B. Baś, W. Reczyński, M. Płonka, D. Drozdowicz, Z. Śliwowski, T. Brzozowski, Applicability of the silver amalgam electrode in voltammetric determination of zinc and copper in gastric juice and gastric mucosa of rats, *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 68 (2011) 481
99. P. Kapturski, A. Bobrowski, Silver amalgam film electrode of prolonged application in stripping chronopotentiometry, *Electroanalysis*, 19 (2007) 1863
100. P. Kapturski, A. Bobrowski, The silver amalgam film electrode in catalytic adsorptive stripping voltammetric determination of cobalt and nickel, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 617 (2008) 1
101. M. Brycht, O. Vajdle, J. Zbiljić, Zs. Papp, V. Guzsvány, S. Skrzypek, Renewable silver-amalgam film electrode for direct cathodic SWV determination of clothianidin, nitenpyram and thiacloprid neonicotinoid insecticides reducible in a fairly negative potential range, *International Journal of Electrochemical Science*, 7 (2012) 10652
102. M. Putek, V. Guzsvány, B. Tasić, Zs. Papp, J. Zarębski, A. Bobrowski, Renewable silver-amalgam film electrode for rapid square-wave voltammetric determination of thiamethoxam insecticide in selected samples, *Electroanalysis*, 24 (2012) 2258

103. S. Skrzypek, S. Smarzewska, W. Ciesielski, Determination of blasticidin S in spiked rice using SW voltammetry with a renewable silver amalgam film electrode, *Electroanalysis*, 24 (2012) 1153
104. S. Skrzypek, Electrochemical study of moroxydine and its voltammetric determination with a silver amalgam film electrode, *Electroanalysis*, 23 (2011) 2781
105. B. Baś, M. Jakubowska, Ł. Górski, Application of renewable silver amalgam annular band electrode to voltammetric determination of vitamins C, B₁ and B₂, *Talanta*, 84 (2011) 1032
106. S. Smarzewska, S. Skrzypek, W. Ciesielski, Renewable silver amalgam film electrode for the determination of dinotefuran in spiked carrot juice samples using SW Voltammetry, *Electroanalysis*, 24 (2012) 1591
107. B. Baś, Refreshable mercury film silver based electrode for determination of chromium(VI) using catalytic adsorptive stripping voltammetry, *Analytica Chimica Acta*, 570 (2006) 195
108. D. Guziejewski, S. Smarzewska, M. Skowron, W. Ciesielski, A. Nosal-Wiercińska, S. Skrzypek, Rapid and sensitive voltammetric determination of aclonifen in water samples, *Acta Chimica Slovenica*, 63 (2016) 1
109. M. Brycht, S. Skrzypek, J. Robak, V. Guzsvány, O. Vajdle, J. Zbiljić, A. Nosal-Wiercińska, D. Guziejewski, G. Andrijewski, Ultra trace level determination of fenoxanil by highly sensitive square wave adsorptive stripping voltammetry in real samples with a renewable silver amalgam film electrode, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 738 (2015) 69
110. I. Švancara, K. Kalcher, A. Walcarius, K. Vytrás, *Electroanalysis with Carbon Paste Electrodes*, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton (2012) str. 1-13, 21, 23, 24, 50, 73-76
111. I. Švancara, K. Vytrás, K. Kalcher, A. Walcarius, J. Wang, Carbon paste electrodes in facts, numbers, and notes: A review on the occasion of the 50-years jubilee of carbon paste in electrochemistry and electroanalysis, *Electroanalysis*, 21 (2009) 7
112. V. Guzsvány, Z. Papp, I. Švancara, K. Vytrás, "Insecticides - Advances in integrated pest management", in: *Insecticides – Advances in Integrated Pest Management* (Ed. Dr. Farzana Perveen), In Tech Europe, Rijeka (2012) str. 547
113. https://www.google.rs/search?q=carbon+paste+electrodes+images&rlz=1C2DVCD_enRe495RS495&biw=1422&bih=776&site=webhp&tbm=isch&tbo=u&source=univ&ss=X&ved=0CB8QsARqFQoTCK3znKyWo8gCFcYLLAodhyYBrw&dpr=0.9#imgcr=y4V9yI9GBT_tNM%3A (04.01.2016.)
114. K. Kalcher, I. Švancara, R. Metelka, K. Vytrás, A. Walcarius, "Heterogeneous carbon electrochemical sensors", in: *Encyclopedia of sensors 4*, (Eds. C.A. Grimes, E.C. Dickey, M. V. Pishko), American Scientific Publishers Valencia (2006) str. 283-429
115. J. Đorđević, Z. Papp, V. Guzsvány, I. Švancara, T. Trtić-Petrović, M. Purenović, K. Vytrás, Voltammetric determination of the herbicide linuron using a tricresyl phosphate-based carbon paste electrode, *Sensors*, 12 (2012) 148
116. Z. Papp, I. Švancara, V. Guzsvány, K. Vytrás, F. Gaál, Voltammetric determination of imidacloprid insecticide in selected samples using a carbon paste electrode, *Microchim Acta*, 166 (2009) 169
117. O.A. Farghaly, N.A. Mohamed, Voltammetric determination of azithromycin at the carbon paste electrode, *Talanta*, 62 (2004) 531

118. A.M. Ashrafi, J. Dorđević, V. Guzsvány, I. Švancara, T. Trtić-Petrović, M. Purenović, K. Vytřas, Trace determination of carbendazim fungicide using adsorptive stripping voltammetry with a carbon paste electrode containing tricresyl phosphate, *International Journal of Electrochemical Science*, 7 (2012) 9717
119. J. Wang, Electroanalysis and Biosensors, *Analytical Chemistry*, 65 (1993) 450R
120. J. Wang, J. Lu, S.B. Hočevár, P.A.M. Farias, Bismuth-coated carbon electrodes for anodic stripping voltammetry, *Analytical Chemistry*, 72 (2000) 3218
121. E.A. Hutton, B. Ogorevc, S.B. Hocevar, F. Weldon, M.R. Smyth, J. Wang, An introduction to bismuth electrode for use in cathodic electrochemical detection, *Electrochemistry Communications*, 3 (2001) 707
122. C. Alves de Lima, A. Spinelli, Electrochemical behavior of progesterone at an ex situ bismuth film electrode, *Electrochimica Acta*, 107 (2013) 542
123. G.G. Gerent, C.Q. Gonçalves, P.S. da Silva, A. Spinelli, In situ bismuth-film electrode for square-wave cathodic voltammetric detection of pendimethalin at nanomolar level, *Electrochimica Acta*, 168 (2015) 379
124. S. Cerovac, V. Guzsvány, Z. Kónya, A.M. Ashrafi, I. Švancara, S. Rončević, Á. Kukovecz, B. Dalmacija, K. Vytřas, Trace level voltammetric determination of lead and cadmium in sediment pore water by a bismuth-oxychloride particle-multiwalled carbon nanotube composite modified glassy carbon electrode, *Talanta*, 134 (2015) 640
125. V. Guzsvány, Bismuth-film electrode for voltammetric analysis, *Journal of Flow Injection Analysis*, 24 (2007) 126
126. C. Kokkinos, A. Economou, Stripping analysis at bismuth-based electrodes, *Current Analytical Chemistry*, 4 (2008) 183
127. I. Švancara, K. Vytřas, Electroanalysis with bismuth electrodes: State of the art and future prospects, *Chemické listy*, 100 (2006) 90
128. V. Guzsvány, M. Kádár, F. Gaál, L. Bjelica, K.Tóth, Bismuth film electrode for the cathodic electrochemical determination of thiamethoxam, *Electroanalysis*, 18 (2006) 1363
129. V. Guzsvány, M. Kádár, Z. Papp, L. Bjelica, F. Gaál, K.Tóth, Monitoring of photocatalytic degradation of selected neonicotinoid insecticides by cathodic voltammetry with a bismuth film electrode, *Electroanalysis*, 20 (2008) 291
130. B. Nigovic, B. Simunic, S. Hocevar, Voltammetric measurements of aminos-alicylate drugs using bismuth film electrode, *Electrochimica Acta*, 54 (2009) 5678
131. G.L. Kreft, O.C. de Braga, A. Spinelli, Analytical electrochemistry of vitamin B₁₂ on a bismuth-film electrode surface, *Electrochimica Acta*, 83 (2012) 125
132. É.S. Sá, P.S. da Silva, C.L. Jost, A. Spinelli, Electrochemical sensor based on bismuth-film electrode for voltammetric studies on vitamin B₂ (riboflavin), *Sensors and Actuators B*, 209 (2015) 423
133. A. Levent, A. Altun, S. Taş, Y. Yardım, Z. Şentürk, Voltammetric behavior of testosterone on bismuth film electrode: Highly sensitive determination in pharmaceuticals and human urine by square-wave adsorptive stripping voltammetry, *Electroanalysis*, 27 (2015) 1219
134. V. Guzsvány, Z. Papp, J. Zbiljić, O. Vajdle, M. Rodić, Bismuth modified carbon-based electrodes for the determination of selected neonicotinoid insecticides, *Molecules*, 16 (2011) 4451

135. M. Grabarczyk, J. Wasąg, Determination of trace amounts of Ga(III) by adsorptive stripping voltammetry with in situ plated bismuth film electrode, *Talanta*, 144 (2015) 1091
136. R.A. De Graaf, *In vivo NMR Spectroscopy-2nd edition Principles and Techniques*, John Wiley and Sons Ltd, Chichester (2007) str. 1
137. J. Mišović, T. Ast, *Instrumentalne Metode Hemijske Analize*, Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd (1978) str. 162, 165, 167, 178
138. SM. Milosavljević, *Strukturne Instrumentalne Metode, Hemijski fakultet*, Beograd (1994) str. 189, 190, 201, 203
139. R.J. Brennan, J. Barber, Full assignments of the ^{13}C and ^1H NMR spectra of azithromycin in buffered D_2O and DMSO-d_6 , *Magnetic Resonance in Chemistry*, 30 (1992) 327
140. A. Awan, J. Barber, R.J. Brennan, J.A. Parkinson, Structural studies on clarithromycin (6-O-Methylerythromycin A): assignments of the ^1H and ^{13}C NMR spectra in organic and aqueous Solutions, *Magnetic Resonance in Chemistry*, 30 (1992) 1241
141. J. Gharbi-Benarous, M. Delaforge, I. Artaud, J.-P. Girault, Analysis of the ^1H and ^{13}C NMR spectra of the novel macrolide antibiotic roxithromycin. Structure and conformation in solution, *Magnetic Resonance in Chemistry*, 28 (1990) 846
142. A. Weston, P.R. Brown, *HPLC and CE Principles and Practise*, W. B. Saunders Company, Philadelphia (1997) str. 1
143. R. DiFrancesco, J.J. Griggs, J. Donnelly, R. DiCenzo, Simultaneous analysis of cyclophosphamide, doxorubicin and doxorubicinol by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 852 (2007) 545
144. B. Barrett, V. Bořek-Dohalský, P. Fejt, S. Vaingátová, J. Huclová, B. Němec, I. Jelínek, Validated HPLC–MS–MS method for determination of azithromycin in human plasma, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 383 (2005) 210
145. S. Castiglioni, R. Bagnati, D. Calamari, R. Fanelli, E. Zuccato, A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters, *Journal of Chromatography A*, 1092 (2005) 206
146. K. Nödler, T. Licha, K. Bester, M. Sauter, Development of a multi-residue analytical method, based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry, for the simultaneous determination of 46 micro-contaminants in aqueous samples, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 6511
147. C. Nebot, S.W. Gibb, K.G. Boyd, Quantification of human pharmaceuticals in water samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 598 (2007) 87
148. M.L. Gómez Pérez, R. Romero-González, J.L. Martínez Vidal, A. Garrido Frenich, Analysis of veterinary drug residues in cheese by ultra-high-performance LC coupled to triple quadrupole MS/MS, *Journal of Separation Science*, 36 (2013) 1223
149. D.L. Chin, B.L. Lum, B.I. Sikic, Rapid determination of PEGylated liposomal doxorubicin and its major metabolite in human plasma by ultraviolet–visible high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 779 (2002) 259
150. S. Ahmed, N. Kishikawa, K. Ohyama, M. Wada, K. Nakashima, N. Kuroda, Selective determination of doxorubicin and doxorubicinol in rat plasma by HPLC with

- photosensitization reaction followed by chemiluminescence detection, *Talanta*, 78 (2009) 94
151. J. Sastre Toraño, H.-J. Guchelaar, Quantitative determination of the macrolide antibiotics erythromycin, roxithromycin, azithromycin and clarithromycin in human serum by high-performance liquid chromatography using pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride and fluorescence detection, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 720 (1998) 89
152. T. Hori, H. Hashimoto, M. Konishi, Determination of erythromycin A in rat plasma and urine by high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection using Tris(2,2-bipyridine) ruthenium(II), *Biomedical Chromatography*, 20 (2006) 917
153. F. Kees, S. Spangler, M. Wellenhofer, Determination of macrolides in biological matrices by high performance liquid chromatography with electrochemical detection, *Journal of Chromatography A*, 812 (1998) 287
154. J.I. Goldstein, D.E. Newbury, P. Echlin, D. C. Joy, A.D. Romig, Ch.E. Lyman, Ch. Fiori, E. Lifshin, *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*, second ed., Plenum Press, New York (1992) str. 1
155. http://www.nanolab.ucla.edu/pdf/Introduction_to_EM_booklet_July_10.pdf (23.12.2016.)
156. G. Hu, Y. Ma, Y. Guo, S. Shao, Electrocatalytic oxidation and simultaneous determination of uric acid and ascorbic acid on the gold nanoparticles-modified glassy carbon electrode, *Electrochimica Acta*, 53 (2008) 6610
157. E. Majid, S. Hrapovic, Y. Liu, K.B. Male, J.H.T. Luong, Electrochemical determination of arsenite using a gold nanoparticle modified glassy carbon electrode and flow analysis, *Analytical Chemistry*, 78 (2006) 762
158. I. Švancara, R. Metelka, K. Vyřas, "Piston-driven carbon paste electrode holders for electrochemical measurements", in: *Sensing in Electroanalysis* (Eds. K. Vyřas, K. Kalcher), University of Pardubice, Pardubice (2005) str. 7-18.
159. V. Guzsvány, J. Csanádi, F. Gaál, NMR study of the influence of pH on the persistence of some neonicotinoids in water, *Acta Chimica Slovenica*, 53 (2006) 52
160. O. Vajdle, J. Zbiljić, B. Tasić, D. Jović, V. Guzsvány, A. Djordjevic, Voltammetric behavior of doxorubicin at a renewable silver-amalgam film electrode and its determination in human urine, *Electrochimica Acta*, 132 (2014) 49
161. R.J. Forster, Kinetic separation of amperometric sensor responses, *Analyst*, 121 (1996) 733
162. G.M. Rao, J.W. Lown, J.A. Plambeck, Electrochemical studies of antitumor antibiotics. III. Daunorubicin and adriamycin, *Journal of the Electrochemical Society*, 25 (1978) 534
163. P. He, R.M. Crooks, L.R. Faulkner, Adsorption and electrode reactions of disulfonated anthraquinones at mercury electrodes, *Journal of Physical Chemistry*, 94 (1990) 1135
164. F. Arcamone, "Association and dissociation equilibria in solution", in: *Doxorubicin: Anticancer Antibiotics* (Ed. F. Arcamone), Academic Press, Inc., New York (1981) str. 96-97
165. O. Vajdle, V. Guzsvány, D. Škorić, J. Anojčić, P. Jovanov, M. Avramov-Ivić, J. Csanádi, Z. Kónya, S. Petrović, A. Bobrowski, Voltammetric behavior of erythromycin ethylsuccinate at a renewable silver-amalgam film electrode and its determination in urine and in a pharmaceutical preparation, *Electrochimica Acta*, 191 (2016) 44

166. Z. Zhang, H. Tuo, On the linear scanning polarographic method of erythromycin ethylsuccinate, *Journal of Yanan University (Natural Science Edition)*, 26 (2007) 1
167. P. Zuman, Aspects of electrochemical behavior of aldehydes and ketones in protic media, *Electroanalysis*, 18 (2006) 131
168. A. Bard, R.L. Faulkner, "Introduction and overview of electrode processes", in: *Electrochemical Methods. Fundamentals and Application*, second ed. (Eds. David Harris, Elizabeth Swain, Eugene Aiello), John Wiley & Sons, Inc., New York (2001) str. 31-32
169. A. Osol, J.E. Hoover, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, fifth ed., Mack Publishing Co., Easton (1975) str. 1123
170. *European Pharmacopoeia*, eighth ed., Council of Europe, Strasbourg, 2, (2014)
171. Z. Mandić, Voltammetric study of the partitioning of macrolide antibiotics at the water/nitrobenzene interface. Relationship to the pharmacokinetic profiling of macrolides, *ADMET and DMPK*, 2 (2014) 168
172. J. Feitosa-Felizzola, S. Chiron, Occurrence and distribution of selected antibiotics in a small Mediterranean stream (Arc River, Southern France), *Journal of Hydrology*, 364 (2009) 50
173. Z. Mandić, Z. Weitner, M. Ilijaš, Electrochemical oxidation of azithromycin and its derivatives, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 33 (2003) 647
174. R. Yanamandra, A. Chaudhary, S. Rao Bandar, B. Patro, Y.L.N. Murthy, P.A. Ramaiah, C.S.P. Sastry, UPLC method for simultaneous separation and estimation of secnidazole, fluconazole and azithromycin in pharmaceutical dosage forms, *E-Journal of Chemistry*, 7 (2010) S363
175. Y. Nakagawa, S. Itai, T. Yoshida, T. Nagai, Physicochemical properties and stability in the acidic solution of a new macrolide antibiotic, clarithromycin, in comparison with erythromycin, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 40 (1992) 725
176. J.W. McFarland, C.M. Berger, S.A. Froshauer, S.F. Hayashi, S.J. Hecker, B.H. Jaynes, M.R. Jefson, B.J. Kamicker, C.A. Lipinski, K.M. Lundy, C.P. Reese, C.B. Vu, Quantitative structure–activity relationships among macrolide antibacterial agents: In vitro and in vivo potency against *pasteurella multocida*, *Journal of Medicinal Chemistry*, 40 (1997) 1340
177. Clarithromycin, *Tuberculosis*, 88 (2008) 92
178. M. Zrnčić, S. Babić, D. Mutavdžić Pavlović, Determination of thermodynamic pKa values of pharmaceuticals from five different groups using capillary electrophoresis, *Journal of Separation Science*, 38 (2015) 1232
179. J. Gharbi-Benarous, P. Ladam, M. Delaforge, J.-P. Girault, Conformational analysis of major metabolites of macrolide antibiotics roxithromycin and erythromycin A with different biological properties by NMR spectroscopy and molecular dynamics, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*, 2 (1993) 2303
180. F. Kees, A. Holstege, K.P. Ittner, M. Zimmermann, G. Lock, J.S. Lmerich, H. Grobecker, Pharmacokinetic interaction between proton pump inhibitors and roxithromycin in volunteers, *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 14 (2000) 407
181. K. Togami, S. Chono, T. Seki, K. Morimoto, Distribution characteristics of telithromycin, a novel ketolide antimicrobial agent applied for treatment of respiratory infection, in lung epithelial lining fluid and alveolar macrophages, *Drug Metabolism Pharmacokinetics*, 24 (2009) 411

-
182. S. Suárez, M. Carballa, F. Omil, J.M. Lema, How are pharmaceutical and personal care products (PPCPs) removed from urban wastewaters?, *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 7 (2008) 125
183. O. Vajdle, V. Guzsvány, D. Škorić, J. Csanádi, M. Petković, M. Avramov-Ivić, Z. Kónya, S. Petrović, A. Bobrowski, Voltammetric behavior and determination of the macrolide antibiotics azithromycin, clarithromycin and roxithromycin at a renewable silver – amalgam film electrode, *Electrochimica Acta*, 229 (2017) 334
184. F.F. Gaál, V.J. Guzsvány, L.J. Bjelica, Determination of various insecticides and pharmaceuticals using differently modified glassy carbon electrodes, *Journal of the Serbian Chemical Society*, 72 (2007) 1465

8. BIOGRAFIJA



Olga Vajdle je rođena 05.12.1987. godine u Bečeju. Osnovnu školu "Sever Đurkić" u Bečeju je upisala 1994. godine i završila je 2002. godine sa odličnim uspehom i primernim vladanjem kao nosilac Vukove diplome. Srednju školu, gimnaziju u Bečeju, upisala je 2002. godine i završila 2006. godine sa odličnim uspehom i primernim vladanjem kao nosilac Vukove diplome i specijalne diplome iz oblasti Hemije. Nakon završene srednje škole, 2006. godine upisala je hemiju na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu. Osnovne akademske studije završila je 2010. godine sa prosekom 8,96 i stekla akademski naziv Hemičar. Iste godine je upisala master akademske studije hemije na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu. Temu master rada "Primenljivost antimon-film elektrode za određivanje insekticida klotianidina" predložila je, mentor, prof. dr Valerija Gužvanj, vanredni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu. Master studije je završila 2011. godine sa prosečnom ocenom 9,6 i ocenom master rada 10, i stekla akademski naziv Master Hemičar. Oktobra 2011. godine upisala je doktorske akademske studije hemije na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu i sve ispite predviđene planom i programom doktorskih akademskih studija položila je sa ocenom 10. Status stipendiste Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije stiće 27.03.2012. godine. Kao stipendista angažovana je na projektu Ministarstva Republike Srbije pod nazivom "Ispitivanje nanostrukturnih materijala kao potencijalnih heterogenih katalizatora za neke razvojno održive procese", broj 172059, a od marta 2015. godine zaposlena je na istom projektu Ministarstva Republike Srbije kao istraživač saradnik. U zvanje istraživača pripravnika za užu naučnu oblast Analitička hemija izabrana je 06.12.2011. godine, a u zvanje istraživača saradnika izabrana je 01.10.2014. godine. Bila je angažovana na jednogodišnjem projektu

Pokrajinskog sekretarijata za nauku i tehnološki razvoj, Autonomna pokrajina Vojvodina, pod nazivom "Razvoj hemijskih metoda analize insekticida acetamiprida", broj projekta 114-451-4418/2013. Od školske 2011/2012. godine angažovana je na Departmanu za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, kao asistent na vežbama iz predmeta Instrumentalna analiza, Bioanalitička hemija, Praktikum iz instrumentalne analize, od školske 2013/2014. godine na predmetu Analitička voltometrija, a školske 2015/2016. godine i na predmetu Senzori u hemiji. Školske 2013/2014. godine bila je angažovana kao asistent na predmetu Opšta hemija. Kao CMEPIUS stipendista bila je na jednomesečnom stručnom usavršavanju u Novoj Gorici, Slovenija, a u okvirima CEEPUS III projekta bila je na jednomesečnoj specijalizaciji u Pardubicama, Češka i u Gracu, Austrija. Angažovana je na jednogodišnjem bilateralnom projektu Srbija-Slovenija (2016/2017. godine). Oblasti interesovanja su joj analitička hemija, instrumentalna analiza, hemijski senzori i tečna hromatografija. Bila je član organizacionog odbora međunarodne 23. YISAC (Young Investigators' Seminar on Analytical Chemistry) konferencije održane 28.06-01.07.2016. godine u Novom Sadu. Osvojila je treće mesto sa usmenim izlaganjem pod nazivom "Voltammetric determination of selected macrolide antibiotics by renewable silver-amalgam film electrode" autora O. Vajdle, V. Guzsány, D. Škorić, M. Avramov-Ivić, J. Csanádi, Z. Kónya, S. Petrović, A. Bobrowski na međunarodnoj 23. YISAC konferenciji (Young Investigators' Seminar on Analytical Chemistry) održanoj 28.06-01.07.2016. godine u Novom Sadu. Autor i koautor je deset naučnih radova u međunarodnim časopisima sa SCI liste (8xM21; 2xM22; ukupna citiranost je 95 (SCOPUS, 05.05.2017.)), preko dvadeset saopštenja na međunarodnim i domaćim naučnim skupovima, kao i jednog poglavlja u knjizi. Član je Srpskog hemijskog društva-Hemijskog društva Vojvodine.

U Novom Sadu

Olga Vajdle

9. SPISAK NAUČNIH RADOVA

Publikacije u međunarodnim časopisima sa SCI liste proistekle iz doktorske disertacije:

1. **Olga Vajdle**, Jasmina Zbiljić , Bojan Tasić, Danica Jović, Valéria Guzsvány, Aleksandar Djordjevic, Voltammetric behavior of doxorubicin at a renewable silver-amalgam film electrode and its determination in human urine, *Electrochimica Acta*, 132 (2014) 49-57 **M21**
2. **Olga Vajdle**, Valéria Guzsvány, Dušan Škorić, Jasmina Anojčić, Pavle Jovanov, Milka Avramov-Ivić, János Csanádi, Zoltán Kónya, Slobodan Petrović, Andrzej Bobrowski, Voltammetric behavior of erythromycin ethylsuccinate at a renewable silver-amalgam film electrode and its determination in urine and in a pharmaceutical preparation, *Electrochimica Acta*, 191 (2016) 44-54 **M21**
3. **Olga Vajdle**, Valéria Guzsvány, Dušan Škorić, János Csanádi, Miloš Petković, Milka Avramov-Ivić, Zoltán Kónya, Slobodan Petrović, Andrzej Bobrowski, Voltammetric behavior and determination of the macrolide antibiotics azithromycin, clarithromycin and roxithromycin at a renewable silver – amalgam film electrode, *Electrochimica Acta*, 229 (2017) 334-344 **M21**

Ostale publikacije u međunarodnim časopisima sa SCI liste:

1. Valéria Guzsvány, Zsigmond Papp, Jasmina Zbiljić, **Olga Vajdle**, Marko Rodić, Bismuth modified carbon-based electrodes for the determination of selected neonicotinoid insecticides, *Molecules*, 16 (2011) 4451-4466 **M22**
2. Mariola Brycht, **Olga Vajdle**, Jasmina Zbiljić, Zsigmond Papp, Valéria Guzsvány, Sławomira Skrzypek, Renewable silver-amalgam film electrode for direct cathodic SWV determination of clothianidin, nitenpyram and thiacloprid neonicotinoid insecticides reducible in a fairly negative potential range, *International Journal of Electrochemical Science*, 7 (2012) 10652-10665 **M22**
3. Jasmina Zbiljić, **Olga Vajdle**, Valéria Guzsvány, Jelena Molnar, Jasmina Agbaba, Božo Dalmacija, Kurt Kalcher, Hydrodynamic chronoamperometric method for the determination

- of H₂O₂ using MnO₂-based carbon paste electrodes in groundwater treated by Fenton and Fenton-like reagents for natural organic matter removal, *Journal of Hazardous Materials*, 283 (2015) 292-301 **M21**
4. Mariola Brycht, Sławomira Skrzypek, Justyna Robak, Valéria Guzsivány, **Olga Vajdle**, Jasmina Zbiljić, Agnieszka Nosal-Wiercińska, Dariusz Guziejewski, Grzegorz Andrijewski, Ultra trace level determination of fenoxanil by highly sensitive square wave adsorptive stripping voltammetry in real samples with a renewable silver amalgam film electrode, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 738 (2015) 69-76 **M21**
 5. Jasmina Zbiljić, Valéria Guzsivány, **Olga Vajdle**, Biljana Prlina, Jasmina Agbaba, Božo Dalmacija, Zoltán Kónya, Kurt Kalcher, Determination of H₂O₂ by MnO₂ modified screen printed carbon electrode during Fenton and visible light-assisted photo-Fenton based removal of acetamidrid from water, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 755 (2015) 77-86 **M21**
 6. Jasmina Anojčić, Valéria Guzsivány, **Olga Vajdle**, Dániel Madarász, Andrea Rónavári, Zoltán Kónya, Kurt Kalcher, Hydrodynamic chronoamperometric determination of hydrogen peroxide using carbon paste electrodes coated by multiwalled carbon nanotubes decorated with MnO₂ or Pt particles, *Sensors and Actuators B*, 233 (2016) 83-92 **M21**
 7. Valéria Guzsivány, Jasmina Anojčić, Emil Radulović, **Olga Vajdle**, Igor Stanković, Dániel Madarász, Zoltán Kónya, Kurt Kalcher, Screen-printed enzymatic glucose biosensor based on a composite made from multiwalled carbon nanotubes and palladium containing particles, *Microchimica Acta*, DOI 10.1007/s00604-017-2188-1 (Publikovano online 30.03.2017)

Poglavlje u istaknutoj monografiji međunarodnog značaja:

1. Jasmina Zbiljić, **Olga Vajdle**, Valéria Guzsivány, Zoltán Kónya, Ákos Kukovecz, Božo Dalmacija, Kurt Kalcher, "Carbon Paste Electrodes Bulk-Modified with Carbon Nanotubes and Chemically Oxidized Carbon Nanotubes for the Determination of Hydrogen Peroxide" in K. Kalcher, R. Metelka, I. Švancara, K. Vytřas (Eds.) "Sensing in Electroanalysis" Vol 8, pp. 195–211, University Press Centre, Pardubice, Czech Republic, 2013/2014, ISBN 978-80-7395-782-7 (print); ISBN 978-80-7395-783-4 (pdf) **M14**

UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO–MATEMATIČKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj:
RBR

Identifikacioni broj:
IBR

Tip dokumentacije: Monografska dokumentacija
TD

Tip zapisa: Tekstualni štampani materijal
TZ

Vrsta rada: Doktorska disertacija
VR

Autor: Olga Vajdle
AU

Mentor: Prof. dr Valerija Gužvanj, Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu
MN

Naslov rada: Voltometrijske metode na bazi jednostavnih i savremenih elektroda/senzora za određivanje odabranih analita od farmakološkog značaja
NR

Jezik publikacije: Srpski (latinica)
JP

Jezik izvoda: S/E
JI

Zemlja publikovanja: Republika Srbija
ZP

Uže geografsko područje: Vojvodina
UGP

Godina: 2017.
GO

Izdavač: Autorski reprint

IZ

Mesto i adresa: Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine,

Prirodno-matematički fakultet

Trg Dositeja Obradovića 3, Novi Sad

MA

Fizički opis rada: poglavlja 9; strana 201; literaturnih citata 184; tablica 15; slika 106; šema 0

FO

Naučna oblast: Analitička hemija

NO

Ključne reči: Antibiotici, doksorubicin, eritromicin-etilsukcinat, azitromicin, klaritromicin, roksitromicin, žučne kiseline, 3-dehidro-deoksiholna kiselina, obnovljiva srebro-amalgam film elektroda, elektroda od staklastog ugljenika modifikovana bizmut-filmom, elektroda od ugljenične paste, voltometrija sa pravougaonim talasima, adsorptivna inverzna voltometrija sa pravougaonim talasima, diferencijalno pulsna voltometrija, realni uzorci, određivanje

PO

Čuva se: U biblioteci Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, PMF, Novi Sad,

Trg Dositeja Obradovića 3

ČU

Važna napomena: Nema

VN

Izvod:

IZ

Danas, u raznim analitičkim laboratorijama postoji veći broj analitičkih protokola, zasnovanih bilo na izuzetno sofisticiranim ili jednostavnijim tehnikama, koji služe za određivanje različitih ciljnih analita od farmakološkog značaja. Među tim grupama ciljnih analita pripadaju i antibiotici koji predstavljaju veliko otkriće u oblasti medicine i zahvaljujući njima spašeno je više od sedam miliona života, ali pored navedenih koristi, antibiotici mogu da izazovu veliki broj neželjenih efekata i žučne kiseline zajedno sa svojim derivatima, koji su fiziološki deterdženti, mogu biti citotoksične za organizam ako se njihova koncentracija ne kontroliše. U ovoj doktorskoj disertaciji prikazan je razvoj analitičkih metoda pre svega voltometrijskih

metoda u kombinaciji sa jednostavnim i savremenim elektrodama/senzorima za određivanje odabranih analita kao što je antraciklični antibiotik doksorubicin (DOX), makrolidni antibiotici eritromicin-etilsukcinata (EES), azitromicina (AZI), klaritromicina (CLA) i roksitromicina (ROX) i 3-dehidro-deoksiholne kiseline.

Voltometrijska karakterizacija i određivanje gore navedenih antibiotika primenom obnovljive srebro-amalgam film elektrode (Hg(Ag)FE) rađena je direktnom katodnom voltametrijom sa pravougaonim talasima (SWV) i visoko osetljivom adsorptivnom voltametrijom sa pravougaonim talasima (SW-AdSV) u Briton-Robinson puferu, kao pomoćnom elektrolitu, obuhvatajući širok opseg pH vrednosti. Odgovor DOX-a primenom Hg(Ag)FE praćen je u intervalu potencijala od -0,20 do -0,80 V. Za analizu tragova, optimizacija metode ukazuje da su optimalni parametri za analitički pik na potencijalu (E_p) -0,57 V u odnosu na zasićenu kalomelovu elektrodu (ZKE): pH 6,0, potencijal akumulacije -0,20 V i vreme akumulacije 140 s. U model rastvoru, DOX je određivan u koncentracionom opsegu 4,99-59,64 ng mL⁻¹. Razvijena SW-AdSV metoda je primenjena za određivanje DOX-a u obogaćenom uzorku humanog urina. Niža koncentracija DOX-a 9,89 ng mL⁻¹ u voltometrijskoj ćeliji je određivana sa relativnom standardnom devijacijom (RSD) manjom od 6,0%. Što se ispitivanih makrolida tiče oni su pokazali redukcione signale u dalekoj negativnoj oblasti potencijala. Ispitivanja direktnom katodnom SWV rađena su u opsegu potencijala od -0,75 V do -2,00 V u odnosu na ZKE, pri čemu su dobijena jedan ili dva redukciona pika u opsegu potencijala od -1,5 V do -1,9 V. Oblik i intenzitet signala zavisi od primenjene pH vrednosti u širokoj pH oblasti. Za analitičke svrhe, radi razvoja direktne katodne SWV i adsorptivne inverzne/stripping SWV metode, pogodnim su se pokazale neutralna i slabo alkalna sredina tj. pH 7,0 sa E_p na -1,67 V u odnosu na ZKE za ROX i EES i pH 7,2 sa E_p na -1,85 V u odnosu na ZKE za AZI i pH 7,4 sa E_p na -1,64 V u odnosu na ZKE za CLA. Na osnovu snimljenih cikličnih voltamograma na optimalnim pH vrednostima, može se predložiti adsorptivno-kontrolisan kinetički proces na elektrodi u slučaju sva četiri ispitivana jedinjenja. Takođe, ¹H NMR merenja uz potiskivanje signala vode u pH oblasti između pH 6,0 i 10,5 ukazuju na to da su makrolidni molekuli pri optimalnim analitičkim uslovima predominantno u protonovanoj formi preko tercijerne amino grupe što potpomaže, u sva četiri slučaja, njihovu adsorpciju na odgovarajuće polarizovanoj Hg(Ag)FE. Optimizovane direktne katodne SWV metode pokazuju dobru linearnost u koncentracionom opsegu 4,81-23,3 μg mL⁻¹, 4,53-29,8 μg mL⁻¹, 1,96-28,6 μg mL⁻¹ i 1,48-25,9

$\mu\text{g mL}^{-1}$ za AZI, EES, CLA odnosno ROX. Razvijene SW-AdSV metode rezultiraju u linearnom odgovoru pri nižim koncentracionim intervalima $1,0\text{-}2,46 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,69\text{-}2,44 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,05\text{-}0,99 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $0,10\text{-}0,99 \mu\text{g mL}^{-1}$, za AZI, EES, CLA i ROX. RSD za sve razvijene metode nije veća od 1,5% izuzev SWV metode u slučaju AZI-a gde je 4,5%. Direktna katodna SWV metoda je uspešno primenjena za određivanje EES-a u farmaceutskom proizvodu Eritromicin[®] dok SW-AdSV metoda je primenjena u slučaju određivanja EES-a u obogaćenom uzorku humanog urina i za određivanje ROX-a u farmaceutskom proizvodu Runac[®]. U svim pomenutim slučajevima, primenjena je metoda standardnog dodatka. Pouzdanost i tačnost elaboriranih procedura u slučaju određivanja EES-a u model sistemu i farmaceutskom proizvodu Eritromicin[®] su potvrđena poređenjem sa rezultatima dobijenim primenom HPLC-DAD metode.

Nakon preliminarnih studija 3-dehidro-deoksiholne kiseline/3-dehidro-deoksiholata primenom elektrode od staklastog ugljenika (GCE), gde je uočeno da ne dolazi do formiranja redukcionog signala u Briton-Robinson puferu između pH 5,0 i 11,8 primenom direktne katodne SWV, bizmut-film je izdvojen *ex situ* na površini iste elektrode od staklastog ugljenika (BiF-GCE) iz uobičajeno korišćenog rastvora za elektrodepoziciju ($0,02 \text{ mol L}^{-1} \text{ Bi(NO}_3)_3$, $1,0 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$ i $0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ KBr}$) i tako pripremljena elektroda je primenjena za karakterizaciju i određivanje pomenutog jedinjenja u alkalnoj sredini. Redukcioni signal ispitivanog analita od analitičkog značaja je uočen jedino primenom BiF-GCE u Briton-Robinson puferu sa pH vrednostima između 9,5 i 11,8 u režimu adsorptivne inverzne/stripping voltametrije sa pravougaonim talasima, dok u slučaju direktnih katodnih SWV eksperimentalnih uslova uočen je slab redukcioni pik sa niskom strujom maksimuma pika. Optimizovani eksperimentalni uslovi za određivanje 3-dehidro-deoksiholata obuhvataju odgovarajuće kondicioniranje elektrode uključujući kondicioniranje *ex situ* pripremljene BiF-GCE u Briton-Robinson pomoćnom elektrolitu pH 11,8 do stabilizacije struje bazne linije elektrohemijskim cikliranjem potencijala radne elektrode u potencijalskom opsegu između $-1,00$ i $-2,00 \text{ V}$ u odnosu na ZKE (blizu 15 puta) i primenu dva ključna parametara adsorptivne voltametrije sa pravougaonim talasima: vreme akumulacije od 30 s i potencijal akumulacije $-1,00 \text{ V}$ u odnosu na ZKE. Zbog relativne asimetričnosti dobijenih redukcionih signala ispitivanog analita sa E_p na $-1,35 \text{ V}$ u odnosu na ZKE, što je takođe prisutno i u slučaju primene SW-AdSV, određivanje ispitivanog analita je zasnovano na linearnoj zavisnosti između površine pika redukcionog signala ispitivanog analita i njegove odgovarajuće koncentracije i postignuta granica detekcije je $1,43 \mu\text{g mL}^{-1}$ sa dva

linearna opsega kalibracione krive od $4,76 \mu\text{g mL}^{-1}$ do $13,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ i od $13,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ do $23,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ za razvoj analitičke metode. RSD metode je 3,22%. Dodatni eksperimenti, elektroliza ispitivanog analita na potencijalu -1,55 V (blizu maksimuma pika ciljnog analita) u odnosu na ZKE su rađeni primenom GCE u obliku ploče (površina $33,52 \text{ cm}^2$) modifikovane sa *ex situ* pripremljenim bizmut-filmom. Rastvor od interesa uzorkovan je na početku eksperimenta, nakon 2,5 h i nakon 4,5 h tretmana. Ovakvi uzorci su analizirani primenom ^1H NMR merenja uz potiskivanje signala vode u puferskom rastvoru pH 11,8. Može se pretpostaviti da tokom elektrolize 3-dehidro-deoksiholata dolazi do redukcije keto grupe prisutne u strukturi ispitivanog analita.

Na osnovu literaturnih podataka da neki od ciljnih makrolidnih antibiotika kao što je npr. azitromicin pokazuju oksidativno ponašanje na elektrodi od ugljenične paste i elektrodi od zlata detaljna karakterizacija i određivanje četiri makrolidna antibiotika rađena je primenom klasične elektrode od ugljenične paste (CPE) koja se sastoji samo od grafitnog praha i parafinskog ulja sa optimizovanih direktnih anodnih SWV metoda. U slučaju EES-a i AZI-a diferencijalna pulsna voltometrija (DPV) je testirana za iste svrhe. Ključni parametar u slučaju razvoja analitičkih voltometrijskih metoda je odabir pH vrednosti pomoćnog elektrolita gde je oblik/simetričnost i intenzitet oskidacionog pika glavni kriterijum prilikom odabira. Kao odgovarajuće pH vrednosti za voltometrijsko određivanje EES-a primenom SWV metode odabrana je pH 8,0 sa E_p na 0,83 V u odnosu na ZKE, dok u slučaju DPV metode pH 12,0 sa E_p na 0,55 V u odnosu na ZKE je bila najpogodnija za analitičke svrhe. Za određivanje AZI-a, u slučaju obe SWV i DPV metode pH 7,0 se pokazala najpogodnijom sa E_p analitičkog signala na 0,85 V odnosno 0,80 V u odnosu na ZKE, dok u slučaju CLA i ROX koji su ispitivani samo primenom SWV metode za analitičke svrhe pH 12,0 je bila najpogodnija sredina sa E_p analitičkog signala na 0,65 V odnosno na 0,63 V u odnosu na ZKE. Postignute granice detkcije primenom nemodifikovane CPE i direktne anodne SWV su uglavnom u submikrogramskom koncentracionom opsegu $0,17 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,32 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $0,30 \mu\text{g mL}^{-1}$, u slučaju EES-a, AZI-a i ROX-a i u niskom mikrogramskom koncentracionom opsegu $1,43 \mu\text{g mL}^{-1}$ za CLA. Razvijena SWV metoda sa jednostavnom CPE pokazala se pogodnom za određivanje ROX-a u komercijalnom proizvodu Runac[®] tableti. U slučaju optimizovanih DPV metoda postignute granice detekcije za EES i AZI su u niskom mikrogramskom koncentracionom opsegu $1,03 \mu\text{g mL}^{-1}$ odnosno $1,53 \mu\text{g mL}^{-1}$. U želji da se postigne niža granica detekcije za AZI, DPV metoda je testirana u kombinaciji sa CPE radnom

elektrodom površinski modifikovanom sa zlatnim nanočesticama prečnika 10 nm (Au-CPE) i postignuta granica detekcije je $0,95 \mu\text{g mL}^{-1}$ sa E_p analitičkog signala na 0,80 V u odnosu na ZKE. RSD metode u slučaju Au-CPE je 3,5%, dok je u slučaju nemodifikovane CPE 6,0%. Linearnost analitičke metode zasnovane na primeni Au-CPE je dva puta šira nego u slučaju primene nemodifikovane CPE.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da odgovarajuće kombinacije optimizovanih voltametrijskih tehnika sa ekološki prihvatljivim i lako primenljivim radnim elektrodama, kao što su Hg(Ag)FE, BiF-GCE i CPE zajedno sa Au-CPE, rezultuju razvojem pouzdanih analitičkih metoda, kako u oksidacionim tako i u redukcionim proučavanjima, koje često omogućuju određivanje tragova analita od farmakološkog značaja u jednostavnim, a u nekim slučajevima i u složenim sistemima.

Datum prihvatanja teme od strane NN veća: 28.05.2015.

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:

KO

Predsednik: dr Biljana Abramović, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu

Mentor: dr Valerija Gužvanj, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu

Član: dr Janoš Čanadi, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu

Član: dr Aleksandar Đorđević, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu

Član: dr Slobodan Petrović, redovni profesor Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu

Član: dr Sławomira Skrzypek, vanredni profesor Departmana za neorgansku i analitičku hemiju Univerziteta u Lođu, Poljska

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCES

KEYWORDS DOCUMENTATION

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Document type: Monograph type

DT

Type of record: Printed text

TR

Contents code: Doctoral thesis

CC

Author: Olga Vajdle

AU

Mentor: Prof. dr Valéria Guzsvány, Faculty of Sciences, University of Novi Sad

MN

Title: Voltammetric methods based on simple and contemporary electrodes/sensors for the determination of selected analytes of pharmacological significance

TI

Language of text: Serbian (Latin alphabet)

L

Language of abstract: S/E

LA

Country of publication: Republic of Serbia

CP

Locality of publication: Vojvodina

LP

Publication year: 2017.

PY

Publisher: Author's reprint

PU

Pub. Place: Novi Sad, Department for Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection

Faculty of Sciences,

Trg Dositeja Obradovića 3

PP

Physical description: 9-201-184-15-106-0

PD

Scientific discipline: Analytical Chemistry

SD

Keywords: Antibiotics, doxorubicin, erythromycin ethylsuccinate, azithromycin, clarithromycin, roxithromycin, bile acids, 3-dehydro-deoxicholic acid, renewable silver-amalgam film electrode, glassy carbon electrode modified with bismuth-film, carbon paste electrode, square wave voltammetry, adsorptive stripping square wave voltammetry, defferential pulse voltammetry, real samples, determination

UC

Holding data: In the library of Department for Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection, Faculty of Sciences, Trg Dositeja Obradovića 3

HD

Note: None

N

Abstract:

AB

Nowadays in different analytical laboratories there is the increasing number of analytical protocols, either based on highly sophisticated or simpler measurements techniques, which serving for determination of different target analytes of pharmacological importance. Among such target groups of the analyte belongs the antibiotics which present a great discovery in the field of medicine and thanks to them were saved more than seven million people but beside to the mentioned great benefits, antibiotics can cause a large number of side effects and bile acids together with their derivatives which are physiological detergents but if their concentration is not

controlled they can be cytotoxic to the body. In the present doctoral dissertation the development of analytical methods, primarily analytical voltammetric methods in combination with simple and contemporary electrodes/sensors, for the determination of selected analytes as antracycline antibiotic doxorubicin (DOX), macrolide antibiotics erythromycin ethylsuccinate (EES), azithromycin (AZI), clarithromycin (CLA) and roxithromycin (ROX) and 3-dehydro-deoxycholic acid were performed.

Voltammetric characterization and determination of the above mentioned antibiotics using a renewable silver-amalgam film electrode (Hg(Ag)FE) was performed by direct cathodic square-wave voltammetry (SWV) and by highly sensitive adsorptive square-wave voltammetry (SW-AdSV) in aqueous Britton-Robinson buffer solutions as supporting electrolyte covering the wider pH range. The Hg(Ag)FE response of DOX was monitored in the potential range between -0.20 and -0.80 V. For the trace level analysis the method optimization showed that the optimal conditions for the analytical peak with peak potential (E_p) at -0.57 V vs. SCE were: the pH 6.0, the accumulation potential -0.20 V, and the accumulation time 140 s. In the model solutions, DOX was determined in the concentration range of 4.99-59.64 ng mL⁻¹. The developed SW-AdSV method was applied for the determination of DOX in spiked human urine sample. The lowest concentration of DOX of 9.89 ng mL⁻¹ in voltammetric vessel was determined with the relative standard deviation (RSD) less than 6%. As for the investigated macrolides, they showed reduction signals in fairly negative potential range. During direct cathodic SWV investigations conducted over the potential range from -0.75 V to -2.00 V vs. SCE, either one or two reduction peaks were obtained in the potential range from -1.5 to -1.9 V. For analytical purposes concerning the development of direct cathodic SWV and adsorptive stripping SWV methods the neutral and slightly alkaline media were suitable as pH 7.0 with E_p at -1.67 V vs. SCE for ROX and EES and pH 7.2 and pH 7.4 with E_p at -1.85 V and -1.64 V vs. SCE for AZI and CLA, respectively. Based on the cyclic voltammograms recorded at these pH values, adsorption-controlled electrode kinetics process can be proposed for all four investigated compounds. The water suppressed ¹H NMR measurements in the pH range between 6.0 and 10.5 indicated that the macrolide molecules at the optimal analytical conditions are predominantly in protonated form via their tertiary amino groups which supported in all four cases their adsorption on the appropriately polarized Hg(Ag)FE electrode. The optimized direct cathodic SWV methods showed good linearity in concentration ranges 4.81-23.3 µg mL⁻¹, 4.53-29.8 µg mL⁻¹, 1.96-28.6

$\mu\text{g mL}^{-1}$, and 1.48-25.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for AZI, EES, CLA and ROX, respectively. The SW-AdSV methods resulted in the linear responses at lower concentration ranges as 1.0-2.46 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 0.69-2.44 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 0.05-0.99 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 0.10-0.99 $\mu\text{g mL}^{-1}$, for AZI, EES, CLA and ROX, respectively. The RSD for all developed methods was not higher than 1.5% except the SWV method for AZI with 4.7%. The direct cathodic SWV method was successfully applied for the determination of EES in the pharmaceutical preparation Eritromicin[®], while SW-AdSV was tested in the case of the spiked urine sample and for determination of ROX in pharmaceutical preparation Runac[®]. In all above cases, the standard addition method was used. The reliability and accuracy of the above procedures in the case of EES determination in model system and pharmaceutical preparation Eritromicin[®] were validated by comparing them with those obtained by means of HPLC-DAD measurements.

After initial study of 3-dehydro-deoxycholic acid/3-dehydro-deoxycholate by glassy carbon electrode, where the absence of any reduction peak was observed in the Britton-Robinson buffer solutions between pH 5.0 and 11.8 by direct cathodic SWV, a bismuth-film was electrodeposited *ex situ* on the same glassy carbon electrode surface (BiF-GCE) from the usually used plating solution (0.02 mol L⁻¹ Bi(NO₃)₃, 1.0 mol L⁻¹ HCl and 0.5 mol L⁻¹ KBr) and such prepared film-electrode was applied for the characterization and determination of the target analyte in alkaline media. The reduction signal of analytical importance was observed only by BiF-GCE in Britton-Robinson buffer solutions with pH values between 9.5 and 11.8 in adsorptive stripping square-wave voltammetry working regime, while in the case of the direct cathodic SWV experimental protocol only a very poor reduction peak was obtained. The optimized experimental conditions for the 3-dehydro-deoxycholate determination consist of the optimized electrode conditioning including the electrochemical cycling of the *ex situ* prepared BiF-GCE potentials in the potential span between -1.0 and -2.0 V vs. SCE (nearly 15 times) in the Britton-Robinson supporting electrolyte pH 11.8 till the stabilization of the baseline current, and the application of two key parameters of the adsorptive square-wave voltammetric protocol: the accumulation time as 30 s and accumulation potential as -1.0 V vs. SCE. Because of the relative asymmetry of the obtained reduction signals of the target analyte with peak E_p at -1.35 V vs. SCE, which is still present in the case of the SW-AdSV, the quantification of the target analyte was based on the linear correlation between peak area of the reduction signal and its appropriate concentrations, and reached limit of detection is 1.43 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and with two linear

ranges of calibration curve from $4,76 \mu\text{g mL}^{-1}$ to $13,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ and from $13,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ to $23,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ for the development of analytical method. The RSD of the method was 3.22%. Additional experiments were performed applying GCE with rectangular form (area 35.32 cm^2) modified with *ex situ* prepared bismuth-film for the electrolysis of the target analyte which was performed at the potential -1.55 V (nearly the peak maxima of the target analyte) vs. SCE. The solution of interest was sampled at the beginning of the experiment, after 2.5 h and after 4.5 h of treatment. Such samples were analysed by simply water suppressing ^1H NMR measurements in the buffered solution at pH 11.8. It can be assumed that during electrolysis of 3-dehydrodeoxycholate the reduction of the keto group present in the structure of the target analyte can be occurred.

Driven by earlier literature data about the fact that some of the target macrolide antibiotics as e.g. azithromycin showed oxidation behavior at a carbon paste and gold working electrodes detailed characterization and determination of four target macrolide antibiotics were performed on classical carbon paste electrode (CPE) constituted only from graphite powder and paraffin oil with optimized direct anodic SWV methods. In the cases of EES and AZI differential pulse voltammetric (DPV) methods were tested for the same purpose as well. The key parameter in the case of the development of the analytical voltammetric methods is the selection of the pH value of the supporting electrolyte where the shape/simmetry and intensity of the oxidation peak were the criteria. As the appropriate pH value for determination of EES by SWV method the pH 8.0 was selected with E_p at 0.83 V vs. SCE while in the case of the DPV method the pH 12.0 with E_p at 0.55 V vs. SCE was the most suitable for analytical purpose. As for AZI determination, in the case of both SWV and DPV methods the pH 7.0 was the most appropriate supporting electrolyte with the E_p of analytical signal at 0.85 V and 0.80 V vs. SCE, respectively, while in the case of CLA and ROX which were investigated only with SWV method for the analytical purposes the pH 12.0 was the most suitable with E_p at 0.65 V and at 0.63 V vs. SCE. The obtained detection limits applying the bare CPE and the direct anodic SWV are mainly in submicrogram concentration range as $0.17 \mu\text{g mL}^{-1}$; $0.32 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $0.30 \mu\text{g mL}^{-1}$ for EES, AZI, and ROX and in the low microgram concentration range as $1.43 \mu\text{g mL}^{-1}$ for the CLA, respectively. The developed method succesfully tested for the determination of ROX in the commercial formulation, Runac[®] tablet. In the case of the optimized DPV methods the obtained detection limits for EES and AZI are in the low microgram concentration range $1.03 \mu\text{g mL}^{-1}$ and

1.53 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. For the improvement of the sensitivity for AZI the DPV method was tested in combination with a CPE working electrode surface modified with gold nanoparticles with diameter of 10 nm (Au-CPE) and reached the limit of detection was 0.95 $\mu\text{g mL}^{-1}$ at E_p of 0.80 V vs. SCE. The RSD of the method in the case of the Au-CPE is 3.5% while in the case of the native CPE 6.0%. The linearity of the Au-CPE based analytical method is twice wider than it is case with the bare CPE applying protocol.

Based on the obtained results it can be concluded that the appropriate combination of the optimized voltammetric pulse techniques and the environmentally friendly and easy to use working electrodes as Hg(Ag)FE, BiF-GCE and CPE together with Au-CPE resulted in the development of a reliable analytical method either in the oxidation or reduction studies, often allowing trace level determination of pharmacologically important target analytes in simpler and in some cases complex systems.

Accepted by the Scientific Board on: 28.05.2015.

AC

Defended:

DE

Thesis defend board:

DB

President: dr Biljana Abramović, Full Professor at Faculty of Sciences, University of Novi Sad

Mentor: dr Valéria Guzsvány, Full Professor at Faculty of Sciences, University of Novi Sad

Member: dr János Csanádi, Full Professor at Faculty of Sciences, University of Novi Sad

Member: dr Aleksandar Đorđević, Full Professor at Faculty of Sciences, University of Novi Sad

Member: dr Slobodan Petrović, Full Professor at Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade

Member: dr Sławomira Skrzypek, Associate Professor at Department of inorganic and analytical chemistry, University of Łódź, Poland