

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Zora Ž. Stoiljković

ODREĐIVANJE AMLODIPINA I NIFEDIPINA
ELEKTROHEMIJSKIM I DRUGIM
ANALITIČKIM METODAMA

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Zora Ž. Stoiljković

DETERMINATION OF AMLODIPINE AND
NIFEDIPINE BY ELECTROCHEMICAL AND
OTHERS ANALYTICAL METHODS

Doctoral Disertation

Belgrade, 2013

MENTOR:

Dr Slobodan D. Petrović, redovni profesor
Tehnološko-metalurškog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Milka L. Avramov Ivić, naučni savetnik
IHTM Institut za elektrohemiju
Univerziteta u Beogradu

Dr Vlatka Vajs, redovni profesor
Hemijskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

Dr Sote Vladimirov, redovni profesor
Farmaceutskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

Dr Dušan Ž. Mijin, redovni profesor
Tehnološko-metalurškog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

DATUM ODBRANE: _____

Zahvalnica

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je na IHTM-u, u Institutu za elektrohemiju i Centru za hemiju IHTM, na katedri za Organsku hemiju Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Institutu za multidisciplinarna istraživanja u Beogradu, na Tehnološkom fakultetu u Leskovcu i laboratoriji za Analitički razvoj farmaceutsko-hemijske industrije Zdravlje A.D. Actavis Company u Leskovcu.

Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru dr Slobodanu Petroviću, redovnom profesoru Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu koji je predložio temu ove disertacije i svojim rukovođenjem i sugestijama u najvećoj meri doprineo uspešnoj realizaciji planiranih istraživanja.

Posebno se zahvaljujem dr Milka Avramov Ivić, naučnom savetniku IHTM za veliki doprinos u toku realizacije rada, kao i stručne sugestije i komentare tokom pisanja.

Svojim stručnim savetima mnogo su mi pomogli dr Vlatka Vajs, redovni profesor Hemijskog fakulteta, dr Sote Vladimirov, redovni profesor Farmaceutskog fakulteta i dr Dušan Mijin, redovni profesor Tehnološko-metalurškog fakulteta, na čemu se iskreno zahvaljujem.

Želim da izrazim svoju zahvalnost svima onima bez kojih ovaj rad ne bi bio kompletan. Svojim kolegama iz Sektora razvoja kompanije Zdravlje Actavis dugujem veliku zahvalnost za podršku pri izradi ovog rada. Posebno se zahvaljujem svojoj kolegatici dipl. inž. tehn. Svetlani Đurić, na pomoći pruženoj u eksperimentalnom radu.

Svojoj porodici, sinovima Milošu i Vladimiru, kao i suprugu Jovici hvala za svu njihovu ljubav i pažnju tokom pisanja ovog rada. Posebnu zahvalnost dugujem svojoj sestri Ljiljani za moralnu podršku u trenucima kada mi je bilo najteže. Veliko hvala i mojim roditeljima koji nažalost nisu više sa nama.

Određivanje amlodipina i nifedipina elektrohemijским i drugim analitičkim metodama

IZVOD

Predmet ove doktorske disertacije je ispitivanje elektrohemijske aktivnosti amlodipina i nifedipina odnosno proučavanje odabranih 1,4-dihidropiridinskih lekova koji se kao blokatori Ca^{2+} -kanala koriste u terapiji kardiovaskularnih oboljenja. Ispitivano je elektrohemijsko ponašanje amlodipina i nifedipina u čistim (kao aktivni farmaceutski ingredient) i različitim komercijalnim oblicima, kao i u kompleksima sa različitim ciklodekstrinima.

Elektrohemijske reakcije su praćene pomoću različitih elektrohemijskih metoda (prvenstveno ciklične voltometrije i voltometrije sa pravougaonim impulsima) na elektrodi od zlata i na elektrodi od zlata modifikovanoj o-MWCNT. Za analizu elektrolita korišćene su druge analitičke metode (HPLC, LC-MS) radi potvrde podataka dobijenih elektrohemijskim ispitivanjima. Takođe je ispitivana stabilnost ovih preparata, koji su radi toga bili podvrgnuti kiseloj i alkalnoj hidrolizi, oksidaciji, fotolizi i degradaciji pri zagrevanju kao i elektrohemijskoj degradaciji. U tom cilju, radi proučavanja povećanja stabilnosti sintetizovani su i analizirani ciklodekstrinski kompleksi amlodipina i nifedipina.

Naučni cilj ovog rada je da se ispitivanjem elektrohemijske aktivnosti i odgovarajućim transformacijama amlodipina i nifedipina razviju metode za njihovo kvalitativno i kvantitativno određivanje i da se analizom dobijenih smeša nakon određenih reakcija utvrdi priroda transformacija ispitivanih molekula.

Rezultati koji su proistekli iz istraživanja ove doktorske disertacije treba da doprinesu razvoju novih elektrohemijskih metoda za kvalitativno i kvantitativno određivanje amlodipina i nifedipina. Proučavana je elektrohemijska aktivnost inkluzionih kompleksa amlodipina i nifedipina sa ciklodekstrinima i uticaj strukture dobijenih ciklodekstrinskih kompleksa na elektrohemijsko ponašanje, što je od izuzetnog značaja pri ispitivanju aktivnih farmaceutskih supstanci i farmaceutskih preparata.

Ključne reči: amlodipin · nifedipin · ciklična voltometrija · voltometrija sa pravougaonim impulsima · elektroda od zlata · modifikovana elektroda Au/o-MWCNT · forsirana degradacija · HPLC-MS · ciklodekstrini · inkluzioni kompleksi

Naučna oblast: Hemija i hemijska tehnologija

Uža naučna oblast: Organska hemija i elektrohemija

UDK broj:

Determination of amlodipine and nifedipine by electrochemical and other analytical methods

ABSTRACT

The subject of this PhD thesis is examination of electrochemical activity of amlodipine and nifedipine, a 1,4-dihydropyridine type of Ca^{2+} channel blockers used in treatment of cardiovascular diseases. It was investigated the electrochemical behavior of amlodipine and nifedipine as active pharmaceutical ingredients, in different commercial pharmaceutical dosage forms as well as in complexes with different cyclodextrins.

Electrochemical reactions were followed by using of different electrochemical methods (primary cyclic voltammetry and square wave voltammetry) on gold electrode and Au/o-MWCNT. For analysis of the electrolytes other analytical methods (HPLC, LC-MS) were used in order to confirm the data obtained by electrochemical investigation. It was also investigated stability of these preparations which were therefore exposed to hydrolysis in acid and alkaline conditions, oxidation, photolysis, temperature degradation and electrochemical degradation. In order to study stability enhancement the appropriate cyclodextrin complexes of amlodipine and nifedipine were synthesized and analyzed.

The scientific aim of this study was to test the electrochemical activity and by appropriate transformations to develop methods for qualitative and quantitative determination of amlodipine and nifedipine as well as by analysis of the obtained mixture after certain reactions to determine the nature of transformations of examined molecules.

The results arising from the research of this PhD thesis should contribute to development of new electrochemical methods for qualitative and quantitative determination of amlodipine and nifedipine. The electrochemical activity of inclusion complexes of amlodipine and nifedipine with cyclodextrins and influence of the structure of the obtained complexes on electrochemical behavior were studied which is of great importance in the study of active pharmaceutical ingredients and pharmaceutical preparations.

Keywords: amlodipine · nifedipine · cyclic voltammetry · square wave voltammetry · gold electrode · modified electrode Au/o-MWCNT · forced degradation · HPLC-MS · cyclodextrin · inclusion complexes

Academic Expertise: Chemistry and chemical technology

Major in: Organic chemistry and electrochemistry

UDK number:

SKRAĆENICE

ACE	angiotensin-converting enzyme	inhibitori angiotenzin konvertaze
AFM	atomic force microscopy	mikroskopija atomskih sila
APCI	atmospheric-pressure chemical ionization	hemijska jonizacija na atmosferskom pritisku
APPI	atmospheric pressure photoionization	fotojonizaciju na atmosferskom pritisku
AV	atrioventricular (AV) node	atrioventrikularni (AV) čvor
BP	British pharmacopoeia	Britanska farmakopeja
β CD	β -cyclodextrin	β -ciklodekstrin
β CD-Aml	β -cyclodextrin-amlodipine	inkluzioni kompleks β -ciklodekstrina sa amlodipinom
β CD-Nif	β -cyclodextrin-nifedipine	inkluzioni kompleks β -ciklodekstrina sa nifedipinom
CCB	Ca channel blockers	blokatori kalcijumskih kanala
CI	chemical ionization	hemijska jonizacija
CV	cyclic voltammetry	ciklična voltometrija
CPE	carbon paste electrode	elektroda od ugljenične paste
DAD	diode array detector	
DDPV	double differential pulse voltammetry	dvostruka diferencijalna pulsna voltometrija
DHP	dihydropyridine	dihidropiridin
DNPV	differential normal pulse voltammetry	diferencijalna normalna pulsna voltometrija
DPP	differential pulse polarography	diferencijalna pulsna polarografija
DPV	differential pulse voltammetry	diferencijalna pulsna voltometrija
DPAdSV	differential pulse adsorptive stripping voltammetry	
DSC	differential scanning calorimetry	diferencijalna pretražna kalorimetrija
EI	electron impact ionization	jonizacija elektronskim udarom
EP	European pharmacopoeia	Evropska farmakopeja
ESI	electrospray ionization	elektrosprej jonizacija
FTIR	Fourier transformation infrared spectroscopy	Infracrvena spektroskopija sa Fourier-ovom transformacijom

GC	gas chromatography	gasna hromatografija
GCE	glassy carbon electrode	elektroda od staklastog ugljenika
HP β CD	(2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin	(2-hidroksipropil)- β -ciklodekstrin
HP β CD-Aml	(2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin-amlodipine	inkluzioni kompleks (2-hidroksipropil)- β -ciklodekstrina sa amlodipinom
HP β CD-Nif	(2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin-nifedipine	inkluzioni kompleks (2-hidroksipropil)- β -ciklodekstrina sa nifedipinom
HMDE	hanging mercury drop electrode	kapljuća živina elektroda
HPLC	high performance liquid chromatography	visokoeffikasna tečna hromatografija
HPTLC	high performance thin layer chromatography	visokoeffikasna tankoslojna hromatografija
ICH	International Conference on Harmonisation	Internacionalna konferencija o harmonizaciji
IGC	inverse gas chromatography	inverzna gasna hromatografija
LC	liquid chromatography	tečna hromatografija
LC-EC	liquid chromatography in combination with electrochemical detection	tečna hromatografija sa elektrohemijским detektorom
LC-MS	(high performance) liquid chromatography in combination with mass spectrometry	tečna hromatografija u kombinaciji sa masenom spektrometrijom
LC-MS-MS	(high performance) liquid chromatography in combination with tandem mass spectrometry	tečna hromatografija u kombinaciji sa tandemnom masenom spektrometrijom
LC-2D-NMR/LC-MS	Liquid chromatography-two dimensional nuclear magnetic resonance in combination with liquid chromatography-mass spectrometry	tečna hromatografija-dvodimenzionalna nuklearna magnetna rezonanca u kombinaciji sa tečnom hromatografijom i masenom spektrometrijom
LSV	linear sweep voltammetry	voltometrija sa linearnom promenom potencijala
MALDI	matrix-assisted laser desorption ionization	
MS	mass spectrometry	masena spektrometrija

MS-MS	mass spectrometry in combination with mass spectrometry (tandem mass spectrometry)	tandemna masena spektrometrija
MWCNT	multi-wall carbon nanotubes	višeslojne ugljenične nanocevi
NMR	nuclear magnetic resonance	nuklearna magnetna rezonanca
NPAAdSV	normal pulse adsorptive stripping voltammetry	
NPP	normal pulse polarography	normalna pulsna polarografija
NPV	normal pulse voltammetry	normalna pulsna voltometrija
o-MWCNT	oxidized multi-wall carbon nanotubes	oksidovane višeslojne ugljenične nanocevi
PTFE	polytetrafluoroethylene	politetrafluoroetilen
PVP	polyvinylpyrrolidone	polivinilpirolidon
raw-MWCNT	raw multi-wall carbon nanotubes	sirove višeslojne ugljenične nanocevi
RH	relative humidity	relativna vlažnost
RP LC	reversed-phase liquid chromatography	reverzno-fazna tečna hromatografija
RP HPLC	reversed-phase high performance liquid chromatography	reverzno-fazna visokoeffikasna tečna hromatografija
RPV	reverse pulse voltammetry	reversna pulsna voltometrija
SA	sinoatrial (SA) node	sinoatrijalni (SA) čvor
SCE	saturated calomel electrode	zasičena kalomelova elektroda
SFC	supercritical fluid chromatography	superkritična tečna hromatografija
SWV	square wave voltammetry	voltometrija sa pravougaonim impulsima
SWAdSV	square wave adsorptive stripping voltammetry	
SWCSV	square wave cathodic stripping voltammetry	
TEM	transmission electron microscopy	transmisiona elektronska mikroskopija
TG	thermogravimetry	termogravimetrija
TGA	thermal gravimetric analysis	termogravimetrijska analiza
TSP	thermospray ionization	termosprej jonizacija
TMFE	thin mercury film electrode	elektroda presvučena tankim filmom žive

UPLC	ultra performance liquid chromatography	ultra tečna hromatografija
UPLC-MS-MS	ultra performance liquid chromatography in combination with tandem mass spectrometry	ultra tečna hromatografija u kombinaciji sa tandemnom masenom spektrometrijom
USP	United states pharmacopoeia	Američka farmakopeja
UV	ultraviolet	ultraljubičast
VIS	visible	vidljiv
v/v	volume by volume	
XR	X-ray	rentgenski zraci
XRD	X-ray diffraction	difrakcija rentgenskih zraka

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DEO	3
2.1. Kalcijumski antagonisti (podela, farmakologija)	3
2.2. Pregled 1,4-dihidropiridinskih lekova (pregled, farmakologija, mehanizam dejstva i sl.)	10
2.2.1 Nifedipin.....	10
2.2.2. Amlodipin.....	12
2.2.2.1. Amlodipin-bezilat.....	14
2.3. Elektrohemijske metode	17
2.3.1. Voltometrija.....	17
2.3.1.1. Voltometrija sa linearnom promenom potencijala	20
2.3.1.2. Ciklična voltometrija	20
2.3.1.3. "Stripping" voltometrija (anodna, katodna i adsorpciona)	28
2.3.1.4. Pulsne metode	29
2.3.1.4.1. Voltometrija sa pravougaonim impulsima (SWV, square-wave voltammetry). 30	
2.3.1.4.2. Normalna pulsna voltometrija i diferencijalna pulsna voltometrija.....	31
2.3.1.4.3. Ostale pulsne metode.....	34
2.3.2. Metode elektrohemijskog određivanja amlodipina i nifedipina opisane u literaturi	34
2.3.2.1. Elektrohemijsko određivanje amlodipina.....	34
2.3.2.2. Elektrohemijsko određivanje nifedipina.....	34
2.4. Pregled odabranih hromatografskih i spektrometrijskih metoda u analitici lekova	36
2.4.1. Tečna hromatografija (LC).....	36
2.4.2. Masena spektrometrija (MS).....	37
2.4.3. Tečna hromatografija-masena spektrometrija (LC-MS)	38
2.4.4. Primena LC-MS	39

2.4.4.1. Primena hromatografskih i spektrometrijskih metoda za određivanje amlodipina ..	40
2.4.4.2. Primena hromatografskih i spektrometrijskih metoda za određivanje nifedipina	44
2.5. Proučavanje stabilnosti lekova	45
2.6. Osnovi inkluzionih kompleksa ciklodekstrina sa lekovima (primena, dobijanje, karakterizacija).....	50
3. EKSPERIMENTALNI DEO.....	53
3.1. Materijali.....	53
3.1.1. Pripremanje standardnih rastvora i uzoraka amlodipin-bezilata	54
3.1.2. Pripremanje standardnih rastvora i uzoraka nifedipina	55
3.1.3. Pripremanje inkluzionih kompleksa ciklodekstrina sa lekovima, koprecipitacijom	56
3.1.3.1. Pripremanje inkluzionih kompleksa ciklodekstrina sa amlodipin-bezilatom.....	56
3.1.3.2. Pripremanje inkluzionih kompleksa ciklodekstrina sa nifedipinom.....	56
3.1.4. Pripremanje različitih elektrodnih površina	57
3.1.4.1. Priprema elektrode od zlata.....	57
3.1.4.2. Priprema modifikovane elektrode	57
3.1.5. Postupci forsirane (ubrzane degradacije) amlodipin-bezilata	58
3.1.5.1. Priprema uzoraka za ispitivanje forsirane degradacije tečnom hromatografijom (HPLC).....	58
3.1.5.1.1. Alkalna degradacija.....	58
3.1.5.1.2. Degradacija sa $0,05 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaHCO}_3$	59
3.1.5.1.3. Oksidativna degradacija	59
3.1.5.1.4. Fotodegradacija	59
3.1.5.1.5. Elektrohemijska degradacija	60
3.1.5.2. Priprema uzoraka za ispitivanje forsirane degradacije metodom LC-MS.....	60
3.2. Aparati i uređaji.....	61
3.3. Metode.....	62

3.3.1. Ciklična voltometrija (CV).....	62
3.3.2. Voltometrija sa pravougaonim impulsima (SWV).....	62
3.3.3. Tečna hromatografija	62
3.3.4. LC-MS tehnika.....	64
3.3.5. AFM tehnika (atomic force microscopy)	65
4. REZULTATI I DISKUSIJA	66
4.1. Elektrohemijsko ponašanje amlodipin-bezilata.....	67
4.1.1. Proučavanje elektrohemijske aktivnosti amlodipin-bezilata standarda i u Alopres tabletama cikličnom voltametrijom, bez akumulacije.....	67
4.1.2. Proučavanje elektrohemijske aktivnosti amlodipin-bezilata u Alopres tabletama cikličnom i voltametrijom sa pravougaonim impulsima, sa akumulacijom.....	76
4.2. Ispitivanje forsirane (ubrzane) degradacije amlodipin-bezilata primenom tečne hromatografije i tečne hromatografije – masene spektrometrije.....	81
4.3. Elektrohemijsko ispitivanje inkluzionih kompleksa nifedipina i amlodipina sa β -ciklodekstrinom i (2-hidroksiopril)- β -ciklodekstrinom.....	90
4.3.1. Ciklična voltometrija i voltometrija sa pravougaonim impulsima kompleksa ciklodekstrina sa nifedipinom u fosfatnom puferu.....	93
4.3.2. Ciklična voltometrija i voltometrija sa pravougaonim impulsima kompleksa ciklodekstrina sa nifedipinom u $0,05 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaHCO}_3$	97
4.3.3. Ciklična voltometrija i voltometrija sa pravougaonim impulsima kompleksa ciklodekstrina sa amlodipinom u fosfatnom puferu	99
5. ZAKLJUČAK	103
6. LITERATURA.....	106
7. BIOGRAFIJA KANDIDATA.....	117
8. IZJAVA O AUTORSTVU	120
9. IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE.....	121
10. IZJAVA O KORIŠĆENJU.....	122

1. UVOD

Lekovi koji se nazivaju "antagonisti kalcijuma" su dugi niz godina predmet analitičkih i spektroskopskih ispitivanja u cilju proširenja saznanja o njihovom mehanizmu delovanja, stabilnosti kao i razvoju metoda za njihovo kvalitativno i kvantitativno određivanje. Termin "antagonisti kalcijuma" koristi se jer ovi lekovi blokiraju ulazak Ca^{2+} u ćeliju kroz kalcijumske kanale izazivajući dilataciju arterija i arteriola snižavajući na taj način krvni pritisak. Za ove lekove često se koristi termin blokatori ulaska Ca^{2+} ili blokatori kalcijumskih kanala (Ca channel blockers, CCB). Terapijski značajni antagonisti kalcijuma deluju na kanale L-tipa, i mogu se podeliti u tri hemijski različite klase: fenilalkilamine, dihidropiridine i benzotiazepine.

Najznačajniji predstavnici dihidropiridinskih antagonista kalcijuma su amlodipin i nifedipin, koji bez obzira na to što su dugo prisutni u terapiji različitih kardiovaskularnih oboljenja, i dalje pobuđuju pažnju istraživača u svetu.

Predmet ovog rada je ispitivanje elektrohemijske aktivnosti kao i razvoj elektroanalitičkih metoda za kvalitativno i kvantitativno određivanje amlodipina i nifedipina u čistom obliku, kao i u komercijalnim farmaceutskim oblicima (tablete), uključujući i njihove inkluzione komplekse sa ciklodekstrinima.

Za ispitivanje elektrohemijske aktivnosti amlodipina i nifedipina u ovom radu su korišćene ciklična voltometrija i voltometrija sa pravougaonim impulsima. Katalitička svojstva elektrode od zlata su testirana za ispitivanje amlodipina i nifedipina u različitim elektrolitima, a analiza elektrolita posle odvijanja elektrohemijskih reakcija urađena je visokoefikasnom tečnom hromatografijom (HPLC) i masenom spektrometrijom (MS).

U svetu se poslednjih desetak godina radi na razvoju elektrohemijskih metoda za kvalitativno i kvantitativno određivanje različitih lekova, kao i amlodipina i nifedipina na elektrodama od različitih materijala (staklasti ugljenik, modifikovane elektrode) i u različitim tipovima elektrolita. Poznato je da su 1,4-dihidropiridinski derivati relativno

nestabilni molekuli i zato se u svetu stalno ulažu naporu u cilju pronalaženja novih metoda za njihovo kvalitativno i kvantitativno određivanje.

Prednost elektrohemijskih metoda je što su brze, jednostavne, ekonomski pogodne i što u kombinaciji sa rutinski primenjivanim metodama daju rezultate koji su izvanredna dopuna postojećim klasičnim hromatografskim metodama ispitivanja u farmaceutskim kompanijama kao i u kliničkim centrima u kojima se rade farmakokinetička određivanja biološki važnih molekula u telesnim tečnostima (krv, urin, plazma).

U ovom radu je ispitano elektrohemijsko ponašanje amlodipina i nifedipina u čistim (kao aktivni farmaceutski ingredient) i komercijalnim oblicima (tablete). Takođe je ispitana stabilnost ovih molekula, prvenstveno amlodipin-bezilata u uslovima forsirane i potpune degradacije. Amlodipin-bezilata u rastvoru je podvrgnut kiselj i alkalnoj hidrolizi, hemijskoj i fotodegradaciji, degradaciji pri zagrevanju kao i elektrohemijskoj degradaciji. Radi proučavanja povećanja stabilnosti supstituisani su i analizirani kompleksi amlodipina i nifedipina sa ciklodekstrinima i upoređeni sa molekulima u čistom obliku.

2. TEORIJSKI DEO

Kardiovaskularni lekovi

U terapiji kardiovaskularnih bolesti došlo je do značajnih pomaka počev od 50-tih godina prošlog veka. Podaci pokazuju da je počev od 1968. godine i nadalje došlo do značajnog napretka u kontroli bolesti srca pre svega zahvaljujući boljem razumevanju stanja bolesti, zatim razvoju efikasnih lekova i inovatnim medicinskim tehnikama u tretiranju problema kardiovaskularnog sistema [1].

Lekovi koji utiču na srčanu funkciju mogu se podeliti u tri grupe:

- a) **Lekovi koji direktno utiču na ćelije miokarda**, gde spadaju
 - autonomni neurotransmiteri i srodni lekovi
 - antiaritmijski lekovi
 - kardi tonični glikozidi i drugi inotropni lekovi
 - ostali lekovi i endogene supstance [2]
- b) **Lekovi koji indirektno utiču na funkciju srca**, odnosno koji deluju na drugim mestima u vaskularnom sistemu. Tu spadaju neki antianginozni lekovi (npr. nitrati) kao i većina lekova koji se koriste u terapiji srčane insuficijencije (npr. diuretici i inhibitori angiotenzin konvertaze – ACE inhibitori) [2]
- c) **Kalcijumski antagonisti**, koji utiču na funkciju srca direktnim dejstvom na ćelije miokarda, ali i indirektno – relaksacijom arteriola [2].

2.1. Kalcijumski antagonisti (podela, farmakologija)

Komore srca normalno se kontrahuju koordinirano, pumpajući efikasno krv putanjom koju određuju zalisci. Podsticaj srčanih ćelija inicira proces pobuđivanja, koji je povezan sa jonskim strujama kroz ćelijske membrane [1, 2].

Jonski kanali i kalcijum

Kalcijumovi joni imaju važnu ulogu u regulaciji mnogih ćelijskih procesa, kao što su sinaptička transmisija i kontrakcija mišića. Kalcijum u ćelijskim funkcijama ima ulogu

"drugog glasnika" kod, na primer regulisanja enzima i jonskih kanala. Ulazak vanćelijskog Ca^{2+} u citozole ćelija miokarda i oslobađanje Ca^{2+} iz ćelijskih skladišta je važno za iniciranje kontrakcija miokarda. Normalno, koncentracija Ca^{2+} u vanćelijskoj tečnosti je u milimolarnoj oblasti, dok su unutar ćelijske koncentracije slobodnog Ca^{2+} jona manje od $10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$, mada ukupne ćelijske koncentracije mogu biti $10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ili veće. Najviše Ca^{2+} se čuva u ćelijskim organelama ili je vezan za ćelijske proteine. Slobodni Ca^{2+} potreban da zadovolji zahteve kontrakcija usled podsticaja može nastati usled aktiviranja kalcijumovih kanala na ćelijskim membranama i (ili) oslobađanja kalcijuma iz unutar ćelijski vezanih mesta. Svaka od ovih metoda povećanja slobodnog citozolnog Ca^{2+} uključuje kanale koji su osetljivi na kalcijumov jon. Blokatori kalcijumovih kanala smanjuju ili sprečavaju povećanje slobodnih citozolnih kalcijumovih jona tako što utiču na transport kalcijumovih jona kroz ove pore [1].

Kalcijum je jedan od najraprostranjenijih elemenata na zemlji. Najčešće se u biološkim sistemima nalazi u obliku hidroksiapatita, u obliku stabilne strukture slične kao ona koja je nađena u kostima. Preostali kalcijum je jonski (Ca^{2+}). Jonski kalcijum funkcioniše kao biohemijski regulator, najčešće u ćeliji. Značaj jonskog kalcijuma u fiziološkim funkcijama prvi je otkrio Ringer, koji je 1883. godine zapazio ulogu Ca^{2+} u srčanoj kontraktilnosti [1].

U zavisnosti od mehanizma otvaranja postoje sledeći tipovi kalcijumskih kanala:

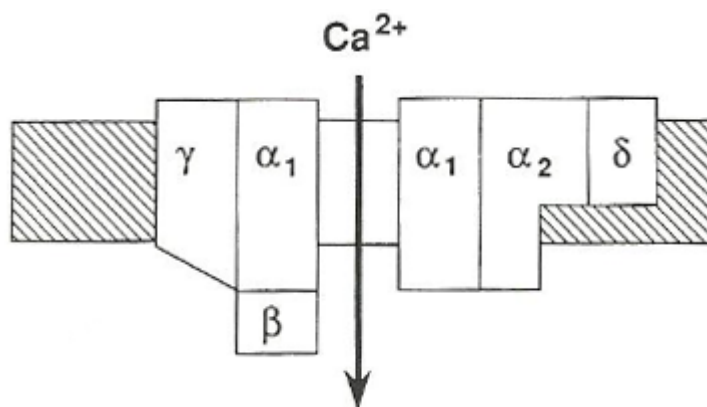
- Voltažno-zavisni kalcijumski kanali,
- Receptorski odnosno ligand zavisni kalcijumski kanali i
- Depo zavisni kalcijumski kanali [2]

U zavisnosti od lokalizacije i funkcije postoje četiri tipa voltažno-zavisnih kalcijumskih kanala:

- a) L-tip, koji se nalazi u kostima, srčanom i glatkim mišićima, i izaziva kontrakciju mišićnih ćelija,
- b) T-tip, koji izaziva ulazak Ca^{2+} i nalazi se u pejsmejker ćelijama,
- c) N-tip, koji se nalazi u neuronima i učestvuje u oslobađanju neurotransmitera,

d) P-tip, koji se nalazi u Perkinje ćelijama, ali čija je funkcija za sada nepoznata [1]

Terapijski značajni antagonisti kalcijuma deluju na kanale L-tipa u cilju njihovog farmakološkog delovanja. Kanali L-tipa su dobili naziv po tome što kada se membrana jednom depolarizuje, njihovo delovanje je dugotrajno (*long lasting*). Kada se membrana depolarizuje, L-kalcijumovi kanali moraju se fosforilovati da bi se otvorili. L-tip kalcijumovih kanala sastoji se od pet različitih podjedinica, označenih kao α_1 , α_2 , β , γ i δ . Podjedinica α_1 obezbeđuje centralnu poru kanala (slika 1) [1].



Slika 1. Šematski prikaz L-tipa Ca^{2+} kanala [1]

Antagonisti kalcijuma L-tipa mogu se podeliti u tri različite hemijske klase:

- Fenilalkilamini (verapamil)
- 1,4-Dihidropiridini (nifedipin)
- Benzotiazepini (diltiazem) [1, 2]

Navedeni molekuli često se nazivaju "prvom generacijom" blokatora kalcijumovih kanala zato što su dve grupe kasnije proširene tzv. "drugom generacijom" lekova (tabela 1) [1].

Tabela 1. Prva i druga generacija blokatora kalcijumovih kanala [1]

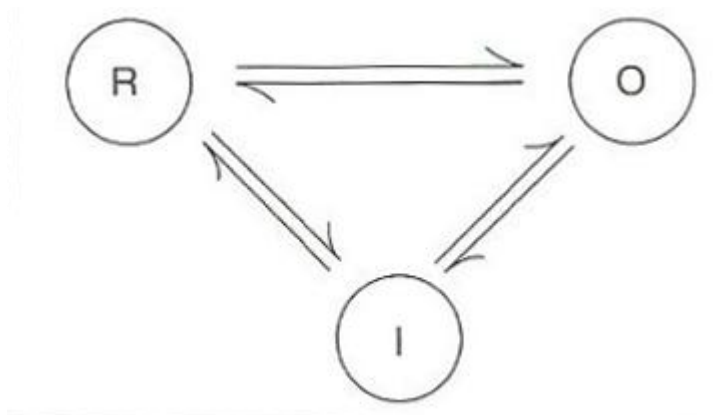
Hemijska klasifikacija	Prva generacija	Druga generacija
Fenilalkilamini	Verapamil	Anipamil Bepridil
1,4-Dihidropiridini	Nifedipin	Amlodipin Felodipin Isradipin Nikardipin Nimodipin
Benzotiazepini	Diltiazem	-

Prema nekim autorima antagonistima kalcijuma pripadaju i sledeće dve hemijske klase jedinjenja:

- Difenilpiperazini
- Diarilaminopropilamini (*bepridil*, kao diarilaminopropilaminetar) [3]

Mehanizam delovanja

Antagonisti Ca^{2+} kanala verapamil, nifedipin i diltiazem vezuju se na specifičnim mestima na proteinu kalcijumovog kanala, ali ne zatvaraju kanal fizički, zbog čega dovode do aktivacije s jedne strane i antagonizma s druge strane. Afinitet ka vezivnim mestima zavisi od toga da li se kanal nalazi u otvorenom stanju (O), stanju odmaranja (R) ili neaktivnom stanju (I), a ravnoteža između ovih stanja je određena podsticajem frekvencija i membranskim potencijalom (slika 2) [1].



Slika 2. Šematski prikaz ravnoteže tri konformaciona stanja jonskog kanala [1]

Lekovi iz svake od tri navedene hemijske klase vezuju se za α_1 -subjedinicu srčanog kalcijumskog kanala L-tipa, ali na različitim mestima, stupajući u međusobne alosteričke interakcije i interakcije sa mehanizmom zatvaranja kanala, i tako indirektno sprečavaju difuziju Ca^{2+} kroz pore u otvoreni kanal. Većina kalcijumskih antagonista izaziva blokadu kanala zavisnu od upotrebe (*use-dependence*) odnosno blokada je efikasnija u ćelijama u kojima su kalcijumski kanali najaktivniji. Iz istog razloga, njihovo blokatorsko dejstvo je voltažno-zavisno, i deluju mnogo jače kada je membrana depolarisana, što izaziva otvaranje i inaktivaciju kalcijumskih kanala [2].

Farmakološko delovanje

Osnovno farmakološko delovanje kalcijumskih antagonista, kod terapijske primene, usmereno je na srčani i glatki mišić [2].

Delovanje na vaskularno tkivo

Svi Ca^{2+} antagonisti su vazodilatatori. Vazodilatacija je rezultat kontraktilnog mehanizma vaskularnih glatkih mišića, koji zahtevaju Ca^{2+} . Vazodilatatorno delovanje ovih lekova je osnova za njihovu upotrebu u kontroli angine i hipertenzije [1, 4].

Depolarizacija ćelija vaskularnih glatkih mišića primarno zavisi od influksa Ca^{2+} [3, 5]. Najmanje tri mehanizma delovanja su odgovorna za kontrakciju ćelija vaskularnih glatkih mišića:

Prvi, otvaranje voltažno-zavisnih Ca^{2+} kanala u odgovoru na depolarizaciju membrane, kada van ćelijski Ca^{2+} smanjuje elektrohemijski potencijal ćelije. Nakon zatvaranja Ca^{2+} kanala, određeni period vremena je potreban pre nego što se kanali ponovo otvore u odgovoru na podsticaj [3].

Drugi, agonistima izazvane kontrakcije, koje se dešavaju bez depolarizacije membrane kao rezultat hidrolize membranskog fosfatidil-inozitola sa nastankom inozitol-trifosfata, koji deluje kao "drugi glasnik" u cilju oslobađanja unutar ćelijskog Ca^{2+} iz sarkoplazmatskog retikuluma [3, 6]. Ovo oslobađanje unutar ćelijskog Ca^{2+} koje je posredovano receptorima može da pokrene dalji priliv vanćelijskog Ca^{2+} .

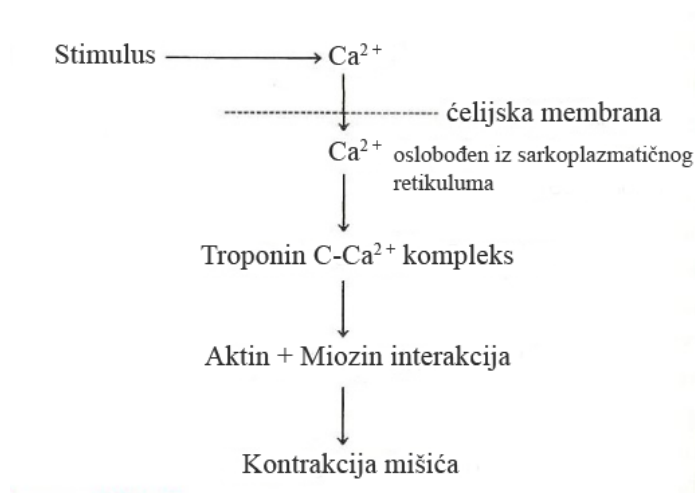
Treći, kada receptorima upravljani Ca^{2+} kanali (ili receptor-zavisni Ca^{2+} kanali) omogućavaju ulazak vanćelijskog Ca^{2+} u odgovoru na zauzimanje receptora [3].

Povećanje citozolnog Ca^{2+} dovodi do boljeg vezivanja Ca^{2+} na protein kalmodulin. Kompleks Ca^{2+} - kalmodulin zauzvrat aktivira miozin-kinazu, što dovodi do fosforilovanja slabo vezanog miozina. Proces fosforilovanja dalje dovodi do interakcije između aktina i miozina i kontrakcije glatkog mišića. Antagonisti Ca^{2+} kanala ili blokatori inhibiraju voltažno-zavisne Ca^{2+} kanale u vaskularnom glatkom mišiću na znatno nižim koncentracijama od onih koje su potrebne za oslobađanje unutar ćelijskog Ca^{2+} ili za blokadu receptor-zavisnih Ca^{2+} kanala. Svi blokatori Ca^{2+} kanala relaksiraju arterijski glatki mišić, ali sa malim uticajem na vene i tako ne utiču na srčano opterećenje [1, 3].

Delovanje na srčane ćelije

Inhibicija priliva Ca^{2+} jona u srčano tkivo pomoću Ca^{2+} antagonista je takođe osnova za njihovu upotrebu kao lekova sa antiaritmičkim delovanjem [1].

Nasuprot glatkim vaskularnim mišićima, mehanizam kontrakcije srčanog mišića uključuje kompleks proteina (tropinini I, C i T i tropomiozin) vezanih za miozin, koji upravljaju interakcijom između aktina i miozina. Slobodni Ca^{2+} joni se vezuju za troponin C, time dolazi do gubitka njegovog inhibitornog delovanja na kontraktilni aparat i omogućava se interakcija aktina i miozina, što dovodi do kontrakcije mišića (slika 3) [1, 3].



Slika 3. Šematski prikaz mehanizma kontrakcije srčanog mišića [1]

Antagonisti kalcijuma takođe imaju negativan inotropni efekat, koji je posledica inhibicije spore ulazne struje tokom platoa akcionog potencijala. Uprkos tome, minutni volumen uglavnom ostaje neizmenjen ili se povećava zbog smanjenja perifernog otpora. Međutim, postoje klinički značajne razlike između različitih klasa lekova. Verapamil ima najizraženije negativno inotropno dejstvo i zbog toga je kontraindikovano kod srčane insuficijencije, kao i većina drugih kalcijumskih antagonista, iako amlodipin nije povećao stopu smrtnosti kod pacijenata sa teškom hroničnom srčanom insuficijencijom [2].

Farmakokinetika

Antagonisti kalcijuma u kliničkoj upotrebi dobro se resorbuju iz gastrointestinalnog trakta, i daju se *per os* osim nekih specifičnih indikacija, kao što je primena posle subarahnoidne hemoragije, gde se koriste intravenski preparati. Intenzivno se metabolišu. Amlodipin ima dugo poluvreme eliminacije i daje se jednom dnevno, dok nifedipin, diltiazem i verapamil imaju kraće poluvreme eliminacije i daju se češće ili se prave formulacije sa produženim dejstvom kako bi se omogućilo doziranje jednom dnevno. Klinička primena kalcijumskih antagonista je sledeća:

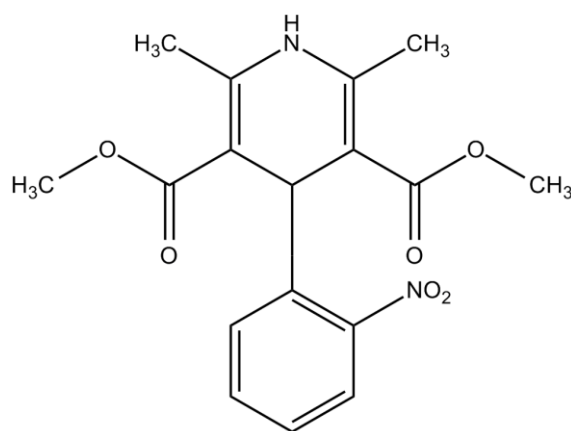
- Aritmije (verapamil)
- Hipertenzija (uglavnom, dihidropiridinski lekovi; npr. amlodipin)

- Profilaksa angine pektoris (uglavnom, dihidropiridin ili diltiazem) [2]

2.2. Pregled 1,4-dihidropiridinskih lekova (pregled, farmakologija, mehanizam dejstva i sl.)

2.2.1 Nifedipin

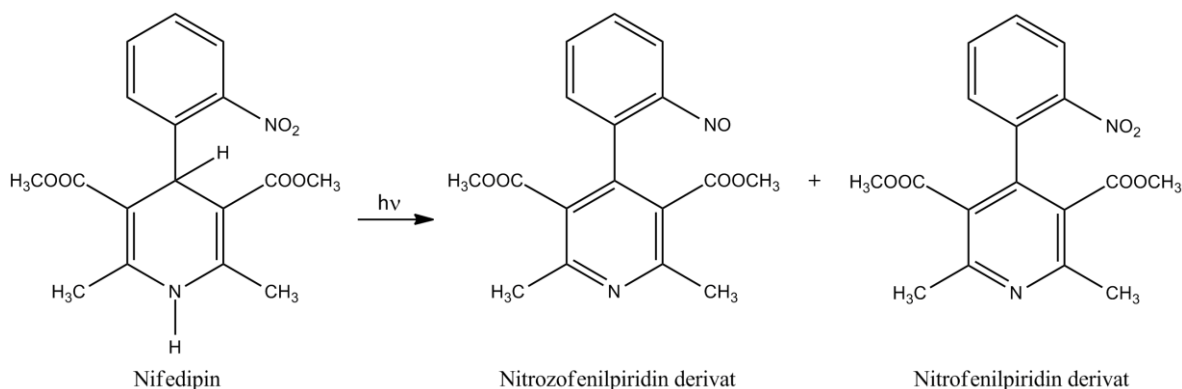
Nifedipin, dimetil 2,6-dimetil-4-(2-nitrofenil)-1,4-dihidropiridin-3,5-dikarboksilat (slika 4) [7]



Slika 4. Strukturna formula nifedipina [7]

<i>molarna masa</i>	<i>bruto formula</i>	<i>CAS broj</i>
346,3	$C_{17}H_{18}N_2O_6$	21829-25-4

Nifedipin je žuti, kristalni prašak. Praktično je nerastvoran u vodi, lako rastvoran u acetonu, delimično rastvoran u etanolu. Pod uticajem dnevnog ili veštačkog svetla različitih talasnih dužina, lako se konvertuje u nitrozofenilpiridinski derivat. Pod uticajem UV svetla dolazi do obrazovanja nitrofenilpiridinskog derivata (slika 5). Zbog toga, rastvori nifedipina treba da se pripremaju u mraku ili pod svetlom talasnih dužina koje su veće od 420 nm, neposredno pre upotrebe [7, 8].



Slika 5. Degradacija nifedipina pod uticajem svetlosti do nitrozofenilpiridin [dimetil 2,6-dimetil-4-(2-nitrozofenil)piridin-3,5-dikarboksilat] i nitrofenilpiridin derivata [dimetil 2,6-dimetil-4-(2-nitrofenil)piridin-3,5-dikarboksilat]

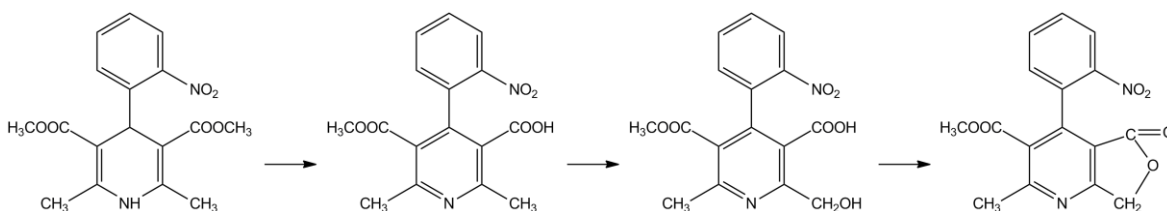
Nifedipin je 1,4-dihidropiridinski derivat koji nema strukturne sličnosti sa ostalim antagonistima kalcijuma. Nitro grupa u molekulu nifedipina je važna za njegovo antianginalno delovanje [1, 9]. Kao klasa hemijskih jedinjenja, dihidropiridini imaju centralni piridinski prsten koji je delimično zasićen. Položaji 2 i 6 su supstituisani alkil-grupom koja može uticati na vreme trajanja dejstva molekula leka. U položajima 3 i 5 su karboksilne grupe koje moraju da budu zaštićene estarskim funkcionalnim grupama. Tip estarske veze ima uticaj na distribuciju nifedipina u organizmu. Konačno, u položaju 4 nalazi se aromatični supstituent sa elektron akceptorskom grupom (NO_2) u *orto* i/ili *meta* položaju (slika 4) [1].

Farmakološko delovanje

Prototip dihidropiridinske klase jedinjenja, nifedipin, ima značajna periferna vazodilatatorna svojstva. Nifedipin inhibira voltažno-zavisne kalcijumove kanale vaskularnih glatkih mišića, sa malim ili bez direktnog depresornog uticaja na SA ili AV čvor. Nifedipin je naročito efikasan kod pacijenata kod kojih su anginozni napadi prouzrokovani vazospazmom i koristi se u lečenju vazospastične angine. Zbog jakog vazodilatatornog delovanja, nifedipin se koristi samo kod odabраниh pacijenata u lečenju hipertenzije [1].

Farmakokinetika

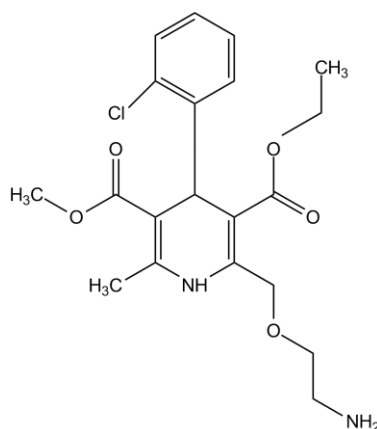
Nifedipin se brzo i skoro kompletno apsorbuje iz gastrointestinalnog trakta, ali podleže hepatičkom metabolizmu "prvog prolaza". Bioraspoloživost nakon oralne primene kapsula napunjenih tečnošću je između 45% i 75%, ali je niža za formulacije leka sa produženim oslobađanjem. Oko 92% do 98% nifedipina je vezano za proteine plazme. Podleže intenzivnom metabolizmu u jetri i 70% do 80% primenjene doze se izlučuje urinom kao inaktivni metaboliti [8]. Dva inaktivna metabolita su glavni proizvodi metabolizma nifedipina (slika 6) [1]. Samo tragovi nepromenjenog nifedipina su nađeni u urinu [1, 10]. Nifedipin ima kraće poluvreme eliminacije od amlodipina i daje se češće ili se prave formulacije sa produženim dejstvom kako bi se omogućilo doziranje jednom dnevno [2].



Slika 6. Metabolizam nifedipina [1]

2.2.2. Amlodipin

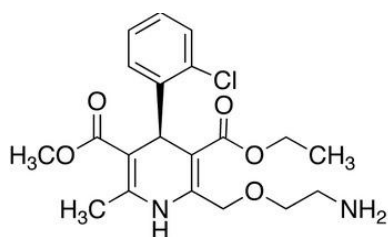
Amlodipin, 2-[(2-aminoetoksi)metil]4-(2-hlorofenil)-1,4-dihidro-6-metil-3,5-piridindikarboksilna kiselina 3-etil 5-metil estar (slika 7) [1]



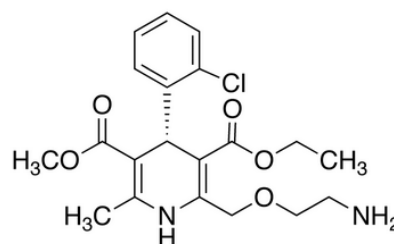
Slika 7. Strukturna formula amlodipina [11]

<i>molarna masa</i>	<i>bruto formula</i>	<i>CAS broj</i>
408,9	$C_{20}H_{25}ClN_2O_5$	88150-42-9

Stereoizomerija: Amlodipin je hiralni kalcijumov antagonist, koji se na tržištu i u upotrebi nalazi kao racemat odnosno smeša (R)-(+) i (S)-(-) enantiomera (slika 8) [12, 13]



R-(+)-amlodipin



S-(-)-amlodipin

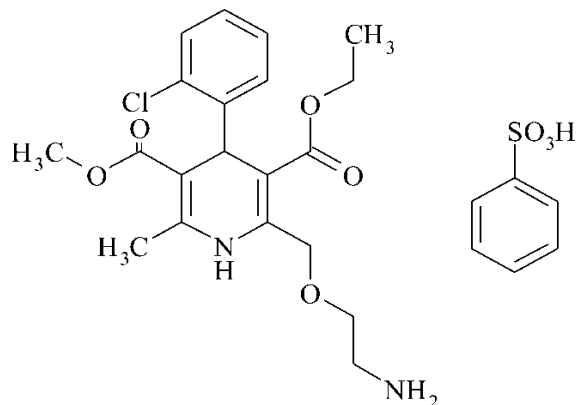
Slika 8. Enantiomeri amlodipina [13]

Amlodipin pripada drugoj generaciji 1,4-dihidropiridinskih derivata. Na tržištu se nalazi u obliku soli benzensulfonske kiseline, amlodipin-bezilata. Originalni lek u obliku tableta sa amlodipin-bezilatom (Norvasc) prvi je na tržište lansirao proizvođač Pfizer [14], a različiti farmaceutski proizvođači su u poslednjih desetak godina širom Evrope i sveta

lansirali generičke lekove sa različitim solima amlodipina. Amlodipin-bezilat je jedan od najviše prodavanih kardiovaskularnih lekova u svetu [15].

2.2.2.1. Amlodipin-bezilat

Amlodipin-bezilat, 3-etil-5-metil (4*RS*)-2-[(2-aminoetoksi)metil]-4-(2-hlorofenil)-6-metil-1,4-dihidropiridin-3,5-dikarboksilat benzensulfonat (slika 9) [7].



Slika 9. Strukturna formula amlodipin-bezilata [7]

<i>molarna masa</i>	<i>bruto formula</i>	<i>CAS broj</i>
567,1	C ₂₆ H ₃₁ ClN ₂ O ₈ S	111470-99-6

Amlodipin-bezilat je beli ili skoro beli prašak. Amlodipin-bezilat je slabo rastvoran u vodi, lako rastvoran u metanolu, delimično rastvoran u bezvodnom etanolu, slabo rastvoran u 2-propanolu [7].

Farmakološko delovanje

Amlodipin je antagonist kalcijuma dihidropiridinske strukture, druge generacije. On sprečava transmembranski inluks jona kalcijuma u srčani mišić, vaskularne i druge glatke mišiće kroz kalcijumske kanale L-tipa. Amlodipin ima veću selektivnost prema vaskularnim glatkim mišićima nego prema srčanom mišiću [1, 14]. Antihipertenzivno dejstvo je posledica relaksacije arteriola i arterija i snižavanja perifernog vaskularnog

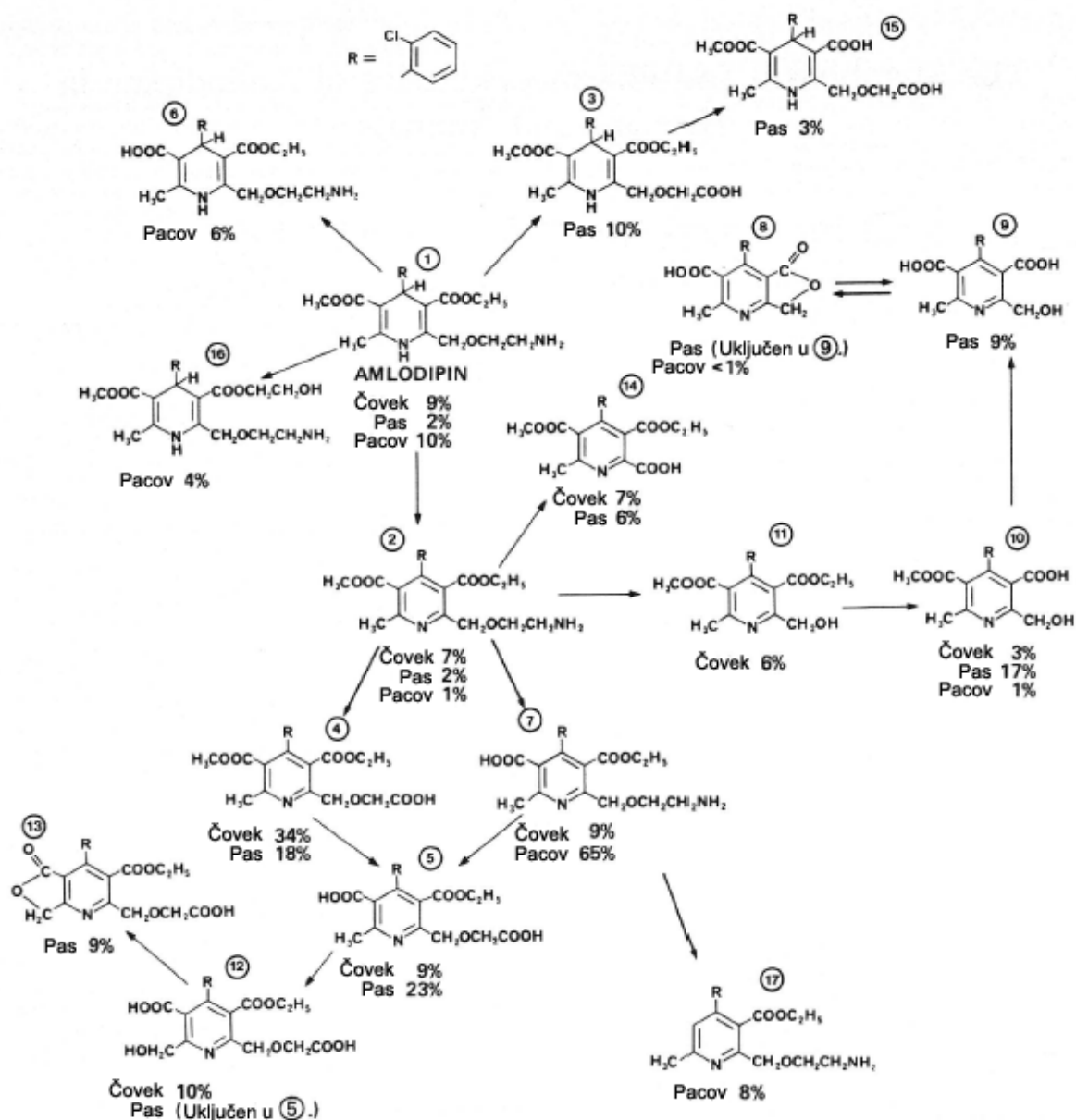
otpora. Mehanizam dejstva kod angine pektoris nije potpuno objašnjen, ali ublažavanje ishemijskih tegoba može nastupiti iz dva razloga:

- Vazodilatacije arteriola i smanjivanja ukupnog perifernog otpora, a zato što nema refleksne tahikardije nastaje rasterećenje srca koje smanjuje potrošnju kiseonika i potrebe srčanog mišića za energijom,
- Vazodilatacije glavnih koronarnih arterija i arteriola u ishemijskim i zdravim delovima srca. Ova regionalna vazodilatacija povećava dopremu kiseonika kod bolesnika sa spazmom koronarnih arterija (Prinzmetal-ova i druge vrste angine) [14].

Amlodipin se koristi u lečenju hronične stabilne angine i slabe do srednje hipertenzije [1, 8].

Farmakokinetika

Farmakokinetiku amlodipina odlikuje dobra i usporena resorpcija nakon oralne primene, sa najvećom koncentracijom u krvi nakon 6 do 12 sati i stabilno održavanje koncentracije u plazmi. Hrana ne utiče na resorpciju amlodipina. Stabilne terapijske koncentracije u plazmi se postižu posle 7-8 dana uzastopnog doziranja [8, 14]. Bioraspoloživost leka je oko 60-65 %. Za proteine plazme se vezuje 97,5 % amlodipina. Poluvreme eliminacije amlodipina iz plazme je 35-50 sati [8, 14]. Amlodipin ima manje negativno inotropno dejstvo od nifedipina [1]. Amlodipin se metaboliše u jetri do neaktivnih metabolita, koji se izlučuju urinom, zajedno sa oko 10 % neizmenjenog leka i 60 % metabolita [8, 14, 16]. Amlodipin se ne uklanja dijalizom [8, 17]. Metabolizam amlodipina je složen i ekstenzivan, i u saglasnosti je sa oksidacijom dihidropiridina do piridinskog analoga kao glavnog produkta metabolizma amlodipina (slika 10) [8, 18].



Slika 10. Šema metabolizma amlodipina. Metaboliti amlodipina nađeni u urinu pacova, psa i čoveka nakon oralne primene [^{14}C] amlodipina. Zastupljenost svakog metabolita je prikazana kao procenat ukupne radioaktivnosti urina [18]

2.3. Elektrohemijske metode

Elektrohemijske metode koje se koriste u elektroanalitici lekova su:

- Voltometrija sa linearnom promenom potencijala
- Ciklična voltometrija
- "Stripping" voltometrija sa taloženjem i rastvaranjem
- Diferencijalna pulsna voltometrija i normalna pulsna voltometrija
- "Square wave" voltometrija – voltometrija sa pravougaonim impulsima [19, 20]

Ilustracije radi, u daljem tekstu su prikazane osnove ovih metoda.

2.3.1. Voltometrija

Voltometrija obuhvata sve metode gde se koriste stacionarne ili fiksne radne elektrode, npr. Hanging mercury drop electrode - HMDE (kapljuća živina elektroda), Thin mercury film electrode - TMFE (elektroda presvučena tankim filmom žive), Glassy carbon electrode - GCE (elektroda od staklastog ugljenika), Carbon paste electrode - CPE (elektroda od ugljenične paste), *Pt* (platinska elektroda), *Ag* (elektroda od srebra), *Au* (elektroda od zlata) i dr. [19].

Voltometrija pored potenciometrije i kulometrije čini osnovu elektroanalitičke hemije. Obuhvata skup elektroanalitičkih metoda kod kojih se podaci o analitu dobijaju iz merenja jačine struje u zavisnosti od zadatog napona pri uslovima koji izazivaju polarizaciju stacionarne ili fiksirane radne elektrode. Voltometrija se razvila iz polarografije kod koje je radna elektroda kapljuća živina elektroda [20].

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

U voltometriji se promenjivi potencijal koji se naziva ekscitacijski signal dovodi na elektrohemijsku ćeliju koja sadrži radnu elektrodu. Ekscitacijski signal stvara odgovor struje (faradejske) koja protiče kroz ćeliju u toku reakcije analita na radnoj elektrodi [20]. Bliže posmatranje struje koja teče kroz radnu elektrodu pokazuje da se ona sastoji od dve komponente, faradejske struje, koja potiče od redukcije ili oksidacije analita i nefaradejske

(kapacitivne ili kondenzatorske struje) koja nastaje usled pražnjenja elektrohemijskog dvostrukog sloja na površini radne elektrode [20].

Kondenzatorska ili kapacitivna struja nastaje zbog toga što se radna elektroda ponaša kao kondenzator. Jednu ploču tog kondenzatora čini naelektrisanje na površini radne elektrode, a drugu suprotno naelektrisani joni ili dipoli rastvarača u rastvoru neposredno uz samu elektrodu. Ovo predstavlja električni ili elektrohemijski dvojni sloj [21].

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

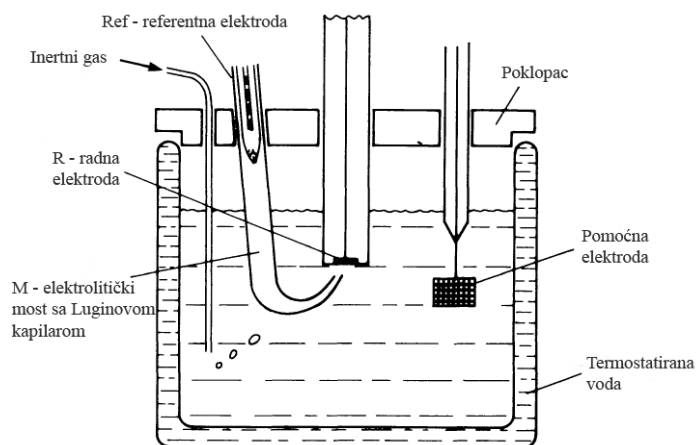
Voltametrijski sistem se sastoji od tri elektrode uronjene u rastvor analita i viška elektrolita koji ne reaguje, a zove se osnovni elektrolit. Jedna od tri elektrode je radna elektroda čiji se potencijal održava na određenoj poznatoj vrednosti ili se kao u voltimetriji sa linearnom promenom potencijala menja sa vremenom [20].

Radna elektroda je elektroda na kojoj se ispituje željena pojava [21]. Uglavnom je male površine čime se pojačava njena sklonost ka polarizaciji. Često je napravljena od inertnih metala kao što su plemeniti metali zlato, platina ili staklasti ugljenik i pirolitički grafit [20].

Druga elektroda je *referentna elektroda* čiji potencijal je poznat i stabilan [20]. Referentna elektroda se u ćeliju uvodi preko *Luginove kapilare*. Vrh kapilare treba da se postavi na što je moguće kraće rastojanje od radne elektrode kako bi otpornost elektrolita između elektrode i vrha kapilare mogla da se svede na zanemarljivu vrednost, s obzirom na to da kada teče struja javlja se pad potencijala na tom rastojanju koji se sabira sa potencijalom elektrode, te mereni potencijal ne odgovara vrednosti elektrodnog potencijala koji se želi meriti ili nametnuti elektrodi. Referentna elektroda treba da se odvoji od

rastvora koji se nalazi u ćeliji pomoću elektrolitičkog mosta, da elektrolit iz ćelije ne bi prodirao u elektrolit referentne elektrode i obrnuto [21].

Treća elektroda je *kontra elektroda (pomoćna elektroda)* koja je često platinska žica, žica od zlata ili posuda sa živom koja omogućava tok struje od izvora kroz rastvor do radne elektrode [19, 20]. Kontra elektroda obično ima veliku površinu u odnosu na radnu elektrodu. Kontra elektroda se stavlja na veću ili manju udaljenost od radne elektrode. Na slici 11 prikazan je sistem za merenje u kinetici elektrodnih procesa gde R- predstavlja radnu elektrodu, M- elektrolitički most sa Luginovom kapilaram, a Ref je referentna elektroda [19].



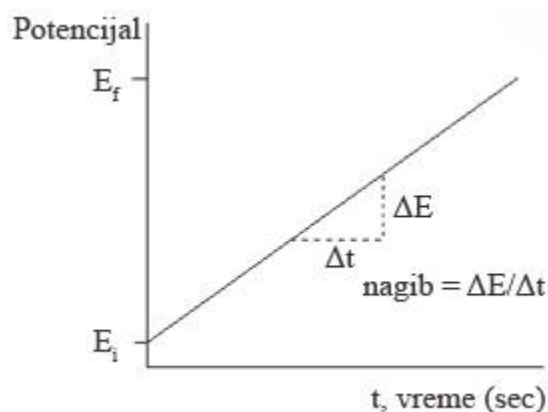
Slika 11. Šematski prikaz ćelije za elektrohemijska ispitivanja sa tri elektrode [19]

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

U toku preliminarnih istraživanja elektrohemijskog ponašanja ispitivanog sistema, voltametrijske tehnike su upravo one koje se koriste jer dobijeni voltamogram predstavlja "elektrohemijski spektar" koji pokazuje potencijale na kojima se dešavaju oksidacioni i redukcionni procesi, učešće homogenih reakcija u ukupnom elektrohemijskom procesu, adsorpciju elektroaktivnih vrsta i slične informacije o ponašanju ispitivanog sistema [21].

2.3.1.1. Voltametrija sa linearnom promenom potencijala

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



Slika 12. Promena potencijala sa vremenom kod linearne voltametrije [22]

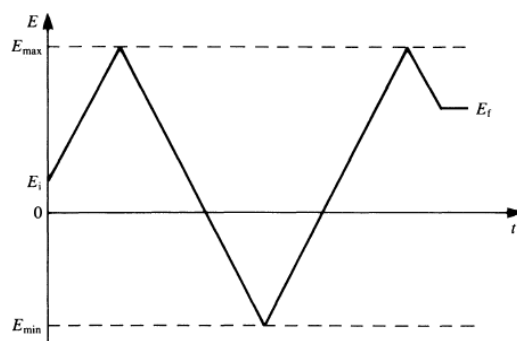
Primena ovih metoda je za dokazivanje i određivanje hemijskih jedinjenja na izlazu iz hromatografske kolone, za rutinsko određivanje glukoze, saharoze i laktoze i za određivanje završnih tačaka kulometrijskih i volumetrijskih titracija [19, 20].

2.3.1.2. Ciklična voltametrija

Ciklična voltametrija predstavlja metodu koja se koristi za sagledavanje elektrohemijskog sistema u celini, svih procesa koji se u njemu odigravaju u širokom

opsegu potencijala. To se postiže jednostrukim korišćenjem ili višestrukim ponavljanjem trougaonog pulsa potencijala, tako što se potencijal menja linearno u opsegu potrebnom da se sagledaju svi procesi.

Kada se dostigne potencijal na kome određeni proces može da se odigrava primetnom brzinom, struja počinje naglo eksponencijalno da raste. Sa nastupanjem difuzione polarizacije dolazi do usporavanja tog porasta, da bi se dostigao maksimum posle koga struja za taj proces opada na nulu, ali registrovana struja zadržava neku minimalnu vrednost (određenu kapacitetom elektrohemijskog dvosloja koji se puni usled stalne promene potencijala) ukoliko se nije dostigao potencijal započinjanja sledećeg procesa [21].



Slika 13. Promena potencijala sa vremenom kod ciklične voltametrije, E_i početni potencijal, E_f krajnji potencijal, E_{min} najmanji potencijal, E_{max} najveći potencijal [19]

Snimanje cikličnih voltamograma se sastoji od reversne promene potencijala od vrednosti E_{max} do vrednosti E_{min} pa ponovo do vrednosti E_{max} odgovarajućom brzinom skeniranja (sweep rate, $|dE/dt|=v$) (slika 13) [19].

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

a elektrodni potencijal se menja prema negativnijim vrednostima. Elektrodni potencijal u određenom trenutku ima vrednost:

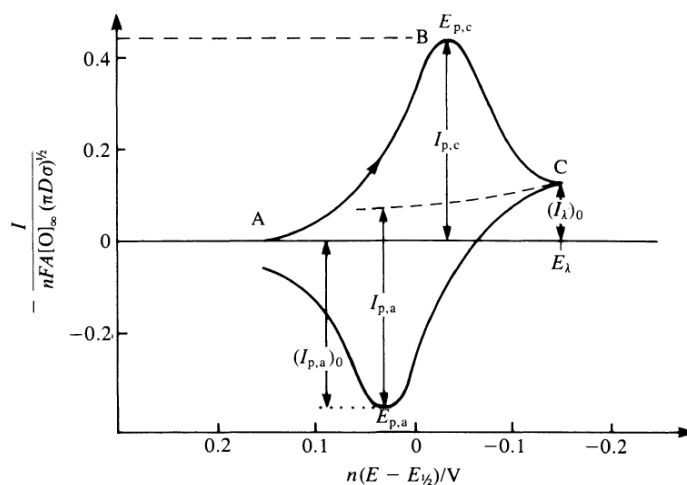
$$E(t) = E_i + vt \quad (1)$$

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

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

Prilikom povratka potencijala redukuje se deo vrste koja je oksidovana u direktnom snimanju. Brzina promene potencijala v , brzina polarizacije ili brzina skeniranja kao i kod linearne voltametrije kreće se od nekoliko mV/s do nekoliko miliona V/s. Primena brzina od nekoliko miliona volti u sekundi zahteva upotrebu mikroelektroda i posebnih instrumenata [19].

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



Slika 14. Izgled cikličnog voltamograma reverzibilnog procesa [19]

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

Svaki proces karakterišu potencijal vrha maksimuma struje i strujni vrh (peak current) na voltamogramu. Za ciklične voltamograme tj. za mnoge reakcije koje se ispituju cikličnom voltametrijom karakteristična je veća ili manja naspramnost pikova. U tome se razlikuju povratni (reversible) i nepovratni (irreversible) procesi [21].

Reverzibilni (Nernstovski) sistemi

Povratnim procesom smatra se proces koji ima dovoljnu vrednost konstante brzine da se za korišćenu brzinu promene potencijala (sweep rate) na svakom postignutom potencijalu uspostavlja ravnoteža između reaktanta i produkta u prielektrodnom sloju čija je koncentracija određena isključivo difuzijom. U takvom slučaju moglo se izvesti da je rastojanje anodnog i katodnog vrha određeno isključivo brojem elektrona razmenjenih u svakom pojedinačnom događaju elektrohemijske reakcije [21].

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



Za izvođenje matematičke formule cikličnih voltamograma polazi se od drugog Fick-ovog zakona difuzije za oksidovani A i redukovani B oblik elektroaktivne vrste. Izraz za krivu struja-potencijal se dobija rešavanjem diferencijalnih jednačina:

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

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

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

Na početku je $t = 0$, $x > 0$, $C_A = C_0$ i $C_B = 0$.

Kada je $t > 0$:

1. Odnos koncentracija oba oblika na elektrodi ($x \geq 0$) se može predstaviti Nernstovom jednačinom:

$$C_A/C_B = \exp [nF/RT(E-E^{\circ})] \quad (4)$$

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

$$C_A/C_B = \exp [nF/RT(E_i-E^{\circ})]\exp[nF/RT(-vt)]$$

2. Suma tokova oksidovane i redukovane vrste na površini elektrode ($x=0$) jednaka je nuli:

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

Kao rešenje diferencijalne jednačine:

$$\frac{\partial C_A}{\partial t} = D_A \frac{\partial^2 C_A}{\partial x^2} \text{ pod pretpostavkom da je difuzija linearna dobija se:}$$

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

Ovaj izraz se naziva **Randles-Ševčikovom** jednačinom. Kada je $T=25$ °C, jednačina dobija oblik:

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

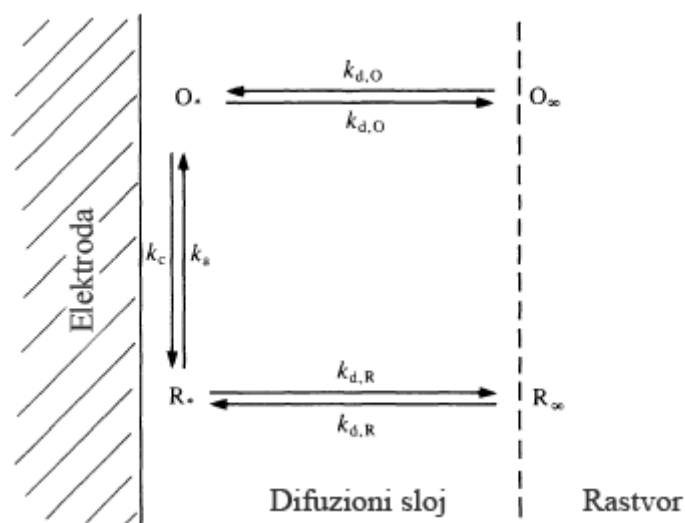
gde je i_p struja pika izražena u amperima, n broj elektrona, A površina elektrode (cm^2), D difuzioni koeficijent ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$), v brzina promene potencijala (V s^{-1}) i C_0 koncentracija oksidovanog oblika (mol cm^{-3}) [19, 23, 24].

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

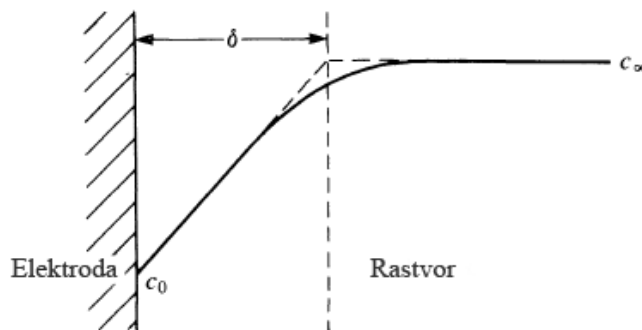
- koncentracije elektroaktivne vrste
- difuzionog koeficijenta
- broja izmenjenih elektrona
- veličine površine elektrode

- brzine promene potencijala

Na slici 15 je dat šematski prikaz reakcije oksido-redukcije na površini elektrode. Glavna elektrohemijska reakcija se odigrava u tankom sloju uz samu elektrodu, debljine reda veličine 10^{-10} m (0,1 nm). U rastvoru (bulk solution) elektrodni proces više ne utiče na koncentraciju elektroaktivne vrste. Razlog tome je što potencijal opada sa povećanjem udaljenosti od elektrode. Difuzioni sloj je područje kroz koje elektroaktivna vrsta difunduje prema elektrodi zbog koncentracionog gradijenta između rastvora i površine elektrode (slika 16) [19, 25].



Slika15. Šematski prikaz reakcije oksido-redukcije na površini elektrode, k_d je koeficijent prenosa mase [19]

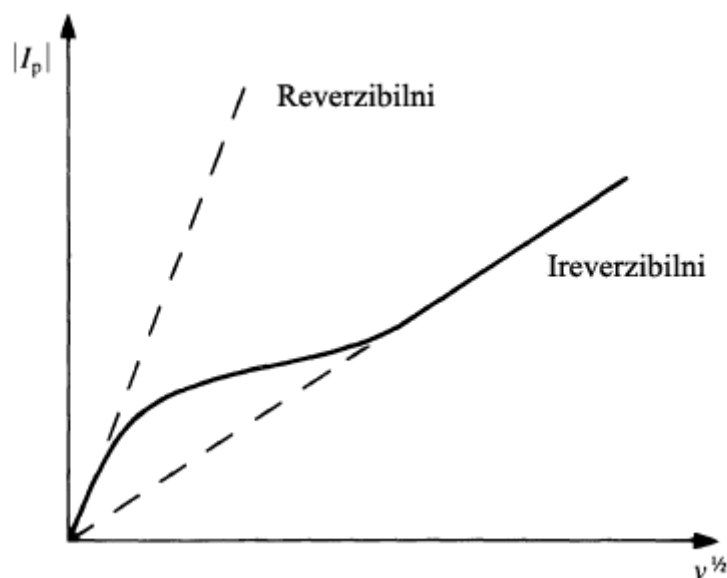


Slika 16. Difuzioni sloj δ , $(dc/dx)_o$ je koncentracioni gradijent na površini elektrode [19]

Ciklična voltametrija je veoma dobra metoda za proučavanje kinetike elektrohemijskih reakcija. Prethodno opisane karakteristike cikličnih voltamograma odnose se na elektrohemijske reakcije ograničene samo difuzijom (tzv. reverzibilni sistem), dok ciklični voltamogram za ireverzibilni (potpuno ograničen kinetikom prenosa naelektrisanja) i kvazireverzibilni sistem (delimično ograničen) ima nešto drugačiji izgled [21].

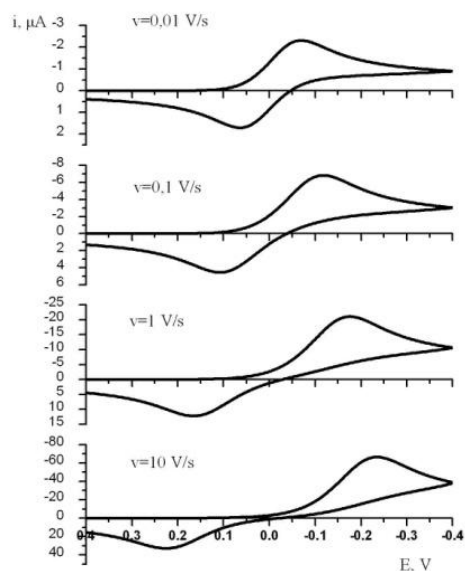
Ireverzibilni sistemi

Kada je brzina prenosa elektrona nedovoljna da omogući površinsku ravnotežu i oblik cikličnih voltamograma se menja. Pri tom oblik voltamograma zavisi od brzine polarizacije. Pri nižim vrednostima brzine polarizacije prenos elektrona je brži od masenog transporta elektroaktivne vrste što se manifestuje dobijanjem cikličnog voltamograma kao za reverzibilni proces. Međutim, sa porastom brzine polarizacije raste i brzina masenog transporta tako da ove dve veličine postaju uporedive i dolazi do poremećaja ravnoteže na površini elektrode (slika 17) [19].



Slika 17. Prelazak iz reverzibilnog u ireverzibilni sistem sa porastom brzine polarizacije (sweep rate) [19]

Najvidljiviji efekat ovakvog ireverzibilnog ponašanja je povećanje razlike potencijala katodnog i anodnog pika sa povećanjem brzine polarizacije (slika 18) [21].



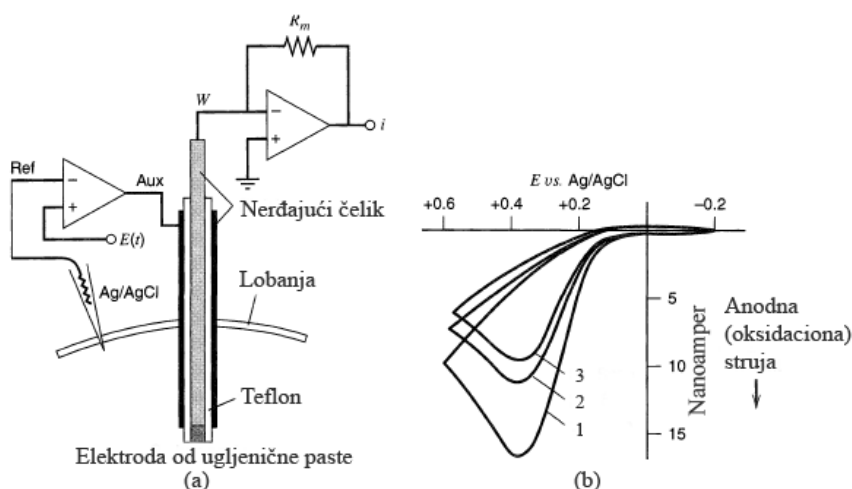
Slika 18. Ciklični voltamogrami ireverzibilnog procesa za različite brzine promene potencijala [21]

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

Ciklična voltimetrija je moćna metoda za izučavanje mehanizama elektrodnih reakcija, homogenih reakcija, katalize i adsorpcije. Pomenuti mehanizmi predstavljaju osnovu ovih istraživanja. Treba primetiti da je broj mogućih elektrohemijskih ishoda veoma veliki jer elektrodne reakcije mogu biti reverzibilne, ireverzibilne i kvazireverzibilne, mogu biti sa višestrukim (uzastopnim) prenosom naelektrisanja, zatim mogu uključivati hemijske

reakcije (reverzibilne i ireverzibilne), a elektroaktivne vrste mogu da se adsorbuju na elektrodama.

Ciklična voltometrija je metoda koja može da se primeni u brojnim proučavanjima elektrohemijskih sistema kao i u analitičke svrhe. Na primer, ciklična voltometrija može da se koristi za određivanje nekih supstanci *in vivo*. Tipičan primer u kome je primenjena elektroda od ugljениčne paste je ispitivanje askorbinske kiseline u mozgu pacova (slika 19) [24].



Slika 19. Primena ciklične voltometrije za analizu tkiva mozga *in vivo*, a) aparatura za cikličnu voltometriju, b) ciklični voltamogram oksidacije askorbinske kiseline [24]

2.3.1.3. "Stripping" voltometrija (anodna, katodna i adsorpciona)

Ove voltometrijske metode su najefikasnije elektrohemijske tehnike za analizu ultra mikro količina supstanci (tragova).

Neuobičajeno visoka osetljivost i selektivnost se baziraju na činjenici da se određivana supstanca akumulira pre svog određivanja i da su i akumulacija i određivanje elektrohemijski procesi čije se odigravanje može kontrolisati.

Određivanja "stripping" voltametrijom su generalno osetljivija, tako da su granice detekcije između 10^{-9} - 10^{-11} mol dm⁻³, a u nekim slučajevima čak i 10^{-12} mol dm⁻³. To znači

da ove metode spadaju među najosetljivije instrumentalne metode analize. One su takođe superiorne u odnosu na druge tehnike analize tragova po korektnosti izmerenih vrednosti. Pošto se i akumulacija i određivanje odigravaju na istoj elektrodi bez promene posude, to znači da se pojava sistematskih grešaka zbog kontaminacije ili isparavanja može držati na niskom nivou.

Rastvaranje u toku određivanja akumuliranih proizvoda je njihovo uklanjanje sa radne elektrode odakle potiče termin skidanje (engl. *stripping*). Ovaj proces se može pratiti voltametrijski i otuda potiče naziv voltimetrija sa rastvaranjem (*stripping voltammetry*). Akumulacija se uvek odigrava na konstantnom potencijalu (E_{ac} potencijal akumulacije) na stacionarnoj živinoj elektrodi, filmu žive ili elektrodi od plemenitog metala i u kontrolisanom vremenskom periodu (t_{ac} akumulaciono vreme). Analit se taloži elektrolitički kao metal, kao slabo rastvorno Hg(I) jedinjenje ili adsorptivno kao kompleksno jedinjenje. Uklanjanje akumuliranog analita sa radne elektrode, zasniva se na procesu oksidacije ili redukcije.

Kod anodnog rastvaranja elektroda se tokom taloženja ponaša kao katoda, a tokom rastvaranja kao anoda. Kod katodnog rastvaranja je obrnuto. Taloženjem se analit elektrohemijski koncentruje. To znači da je koncentracija analita na površini elektrode mnogo veća nego u samom rastvoru [19, 23, 24].

2.3.1.4. Pulsne metode

Nedostaci nekih voltametrijskih metoda izbegnuti su primenom novih pulsnihih metoda kao što je voltimetrija sa pravougaonim impulsima, normalna i diferencijalna pulsna voltimetrija. Povećanje osetljivosti određivanja može se postići poboljšanjem odnosa signala i šuma tj. odnosa faradejske i kondenzatorske struje (I_F/I_C). To se postiže delimičnim eliminisanjem kondenzatorske struje I_C (uglavnom izazvane periodičnim punjenjem i pražnjenjem dvostrukog sloja).

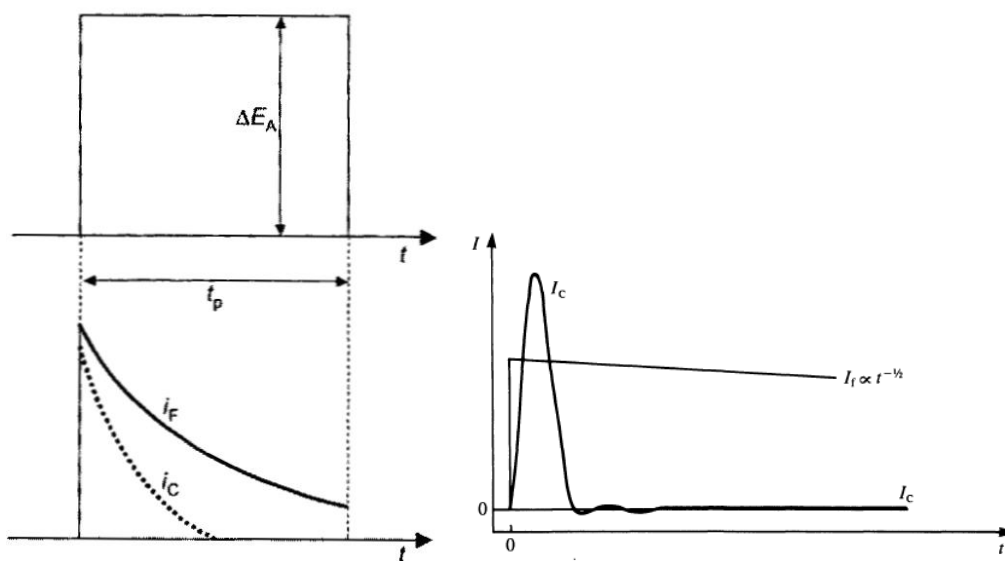
Pristup koji se odnosi na smanjenje kondenzatorskih struja doveo je do pojave pulsnihih metoda.

Opšta karakteristika ovih metoda je da se elektrodni procesi pobuđuju na različite načine pri periodičnim promenama potencijala pravougaonih talasa sa konstantnom ili rastućom amplitudom ΔE_A . Rezultat toga je da se pri kraju trajanja impulsa (t_p) uglavnom meri faradejski doprinos, dok je istovremeno kapacitivna struja skoro potpuno izčezla (slika 20) [19].

Zavisnost kapacitivne struje tokom vremena impulsa [19] je data relacijom:

$$I_C = \frac{\Delta E_A}{R} \exp(-t/RC) \quad (7)$$

gde je I_C - kapacitivna struja, ΔE_A - amplituda impulsa, R - otpor pražnjenja, t - vreme posle primene impulsa, C - kapacitet dvostrukog sloja radne elektrode

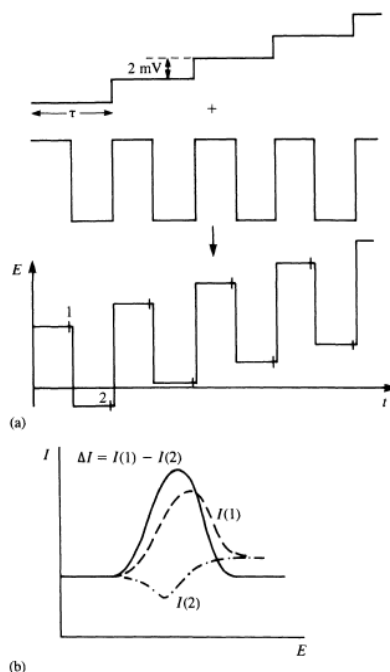


Slika 20. Promena struja sa vremenom primenom stepena potencijala na stacionarnoj elektrodi, I_F faradejska i I_C kapacitivna struja [19]

2.3.1.4.1. Voltometrija sa pravougaonim impulsima (SWV, square-wave voltammetry)

Metoda poznata pod imenom voltometrija sa pravougaonim impulsima je metoda kod koje se celokupan postupak merenja odigrava na jednoj živinoj kapi sa relativno velikom amplitudom $\Delta E_A = 50$ mV i sa brzom promenom potencijala. Trajanje potencijalnog stepena je identično sa dužinom trajanja pulsa pravougaonog talasa i iznosi 5-

10 ms tj. na svaki stepen potencijala dodata je samo jedna oscilacija potencijala pravougaonog talasa sa relativnom velikom amplitudom (slika 21) [19].



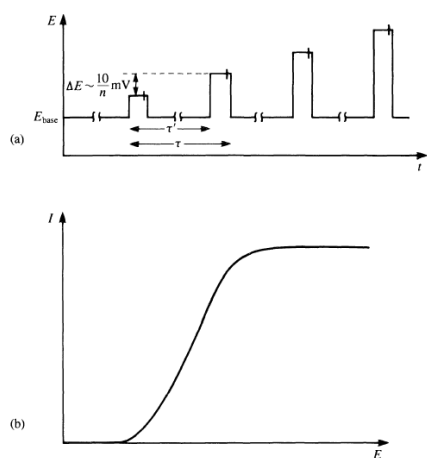
Slika 21. Voltametrija sa pravougaonim impulsima: a) Šema primene potencijala b) Zavisnost struja-potencijal: $E_{st} \sim 2\text{mV}$; $t_{min} = 2\text{ ms}$ [19]

Razlika između izmerenih vrednosti struja u tačkama 1 i 2 (za vrlo kratka vremena merenja) prikazuje se u zavisnosti od potencijala i dobija se kriva struja-potencijal. Jedna od značajnih primena voltametrije sa pravougaonim talasom je u elektrohemijskoj detekciji kod HPLC [23].

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

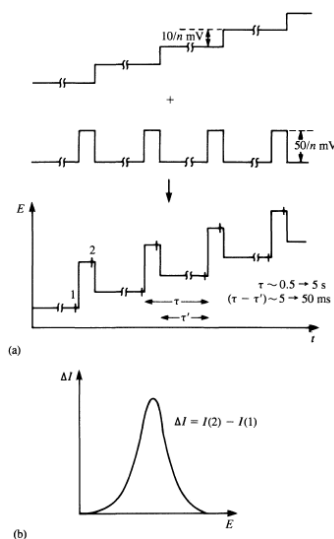
U normalnoj pulsnoj voltametriji (NPV) potencijal se ne menja linearno rastućim potencijalom nego sa pulsevima potencijala pravougaonih talasa sa rastućom visinom (amplitude pulsa ΔE_A) superponiranjem na konstantan početni potencijal. Superponiranje pulsa je sinhronizovano sa nastajanjem kapi na kapljućoj živinoj elektrodi, pri čemu svaka kap ima jedan puls potencijala sa vremenom pulsa od oko 50 ms primenjen na nju.

Amplituda raste od jedne kapi do sledeće za konstantnu veličinu i postiže maksimum od 1000 mV. Struja se meri na kraju života kapi oko 10 do 15 ms pre završetka impulsa t_p . Pošto je promena potencijala na svakoj kapi relativno velika, a vreme trajanja pulsa kratko, nastaje veliki koncentracioni gradijent i kao rezultat velika faradejska struja. Obrnuto, kondenzatorska struja ostaje mala, jer se merenje vrši kada je površina živine kapi konstantna i I_C praktično nestaje za vreme merenja. Izmerena struja se snima do sledećeg merenja (na sledećoj kapi). Ako se pojedine vrednosti struje prikažu u zavisnosti od promene potencijala pulsa dobijaju se krive struja-potencijal stepenastog oblika. Krive su oblika pika ako se struja svakog prethodnog pulsa oduzme od sačuvane izmerene vrednosti sledećeg [23]. Osetljivost koja se može postići je oko 10^{-7} mol dm⁻³. Slika 22 pokazuje ekscitacioni signal i krivu struja-potencijal za NPV [19].



Slika 22. Ekscitacioni signal i kriva struja-potencijal kod normalne pulsne voltametrije [19]

Najefikasnija pulsna metoda je diferencijalna pulsna voltametrija (DPV). Kod digitalnih instrumenata pobuđujući signal se sastoji od stepenastog povećanja jednosmernog potencijala (potencijal stepena ΔE_{step}) na koji se primenjuju mali pulsevi pravougaonih talasa konstantnog potencijala (amplitude impulsa ΔE_A). Superponiranje je sinhronizovano sa vremenom kapanja i odigrava se kada se površina elektrode dalje ne menja. Slika 23 prikazuje mernu tehniku DPV [19].



Slika 23. Diferencijalna pulsna voltametrija: a) Šema primene potencijala, b) Kriva struja-potencijal [19]

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

Struja pika u DPV je data relacijom:

$$I_p = \frac{n^2 F^2}{4RT} A C_a E_A \sqrt{\frac{D}{\pi t_p}} \quad (8)$$

gde je I_p -struja pika, n -broj razmenjenih elektrona u reakciji, F -Faradejeva konstanta, R -gasna konstanta, T -apsolutna temperatura, A -površina elektrode, C_a -koncentracija određivane supstance, ΔE_A -amplituda pulsa, D -difuzioni koeficijent određivane supstance, t_p -vreme trajanja pulsa.

Prema jednačini za reverzibilne elektrodne procese visina pika I_p u voltamogramima je proporcionalna koncentraciji analita C_a i određena je amplitudom ΔE_A pulsa pravougaonih talasa, kao i vremenom trajanja pulsa t_p .

Granica detekcije u DPV iznosi $\sim 10^{-7} - 10^{-8}$ mol dm⁻³.

Jedna od prednosti ove metode je što se pojedinačni maksimum krive može dobiti za supstance sa polutalasnim potencijalom koji se razlikuje za 0,04 V-0,05 V. Nasuprot tome normalna pulsna voltometrija zahteva razliku potencijala od najmanje 0,2 V za razlikovanje talasa. Derivativni voltamogrami daju maksimume pogodne za kvalitativnu analizu [23].

2.3.1.4.3. Ostale pulsne metode

- Reversna pulsna voltometrija (RPV-Reverse Pulse Voltammetry)
- Diferencijalna normalna pulsna voltometrija (DNPV-Differential Normal Pulse Voltammetry)
- Dvostruka diferencijalna pulsna voltometrija (DDPV-Double Differential Pulse Voltammetry) [19]

2.3.2. Metode elektrohemijskog određivanja amlodipina i nifedipina opisane u literaturi

2.3.2.1. Elektrohemijsko određivanje amlodipina

Voltometrijske metode se mogu koristiti kao efikasno sredstvo u analitici važnih biomolekula, uključujući aktivne supstance u farmaceutskim formulacijama i humanim telesnim tečnostima zbog svoje osjetljivosti i jednostavnosti, niske cene i relativno kratkog vremena analize u poređenju sa drugim analitičkim tehnikama. Različite analitičke elektrohemijske metode, kao što su ciklična voltometrija, diferencijalna pulsna voltometrija i voltometrija sa pravougaonim impulsima za određivanje amlodipina u lekovima ili biološkim tečnostima na elektrodi od staklastog ugljenika, elektrodi od ugljenične paste ili elektrodi modifikovanoj nanocevima su saopštene u literaturi [26-30].

Određivanje amlodipina na elektrodi od zlata nije saopšteno u literaturi do sada.

2.3.2.2. Elektrohemijsko određivanje nifedipina

Nifedipin je elektrohemijski aktivno jedinjenje. Redukcija 2-nitrofenil grupe na kapljućoj živinoj elektrodi omogućila je određivanje nifedipina polarografijom.

Diferencijalnom pulsnom polarografijom (DPP) mogu se odrediti nifedipin i njegovi degradacioni proizvodi (aromatični nitro i nitrozo derivati). Činjenica da se 1,4-dihidropiridinski derivati mogu oksidovati omogućila je voltametrijsko određivanje nifedipina na elektrodama od grafita i platine i njegovu elektrohemijsku detekciju u tačnoj hromatografiji [31]. Glavni fotodegradacioni proizvod nifedipina, dimetil-2,6-dimetil-4-(2-nitrozofenil)piridin-3,5-dikarboksilat ispitivan je diferencijalno pulsnom (DPV) i cikličnom voltametrijom (CV) na kapljućoj živinoj elektrodi (HMDE) [32].

Elektrohemijsko ispitivanje nifedipina u tabletama i kapsulama na elektrodi od staklastog ugljenika primenom voltametrije sa linearnom promenom potencijala (LS) i ciklične voltametrije (CV) [33, 34] kao i voltametrijom sa pravougaonim impulsima i rastvaranjem (SWAdSV) na kapljućoj živinoj elektrodi za ispitivanje nifedipina u humanoj plazmi [35] ili voltametrijom sa pravougaonim impulsima i katodnim rastvaranjem (SWCSV) na kapljućoj živinoj elektrodi za ispitivanje nifedipina u sirovini, farmaceutskim preparatima i humanom serumu su takođe rađeni [36].

Za elektrohemijsko proučavanje nifedipina u lekovima, urinu i humanom serumu koriste se i druge voltametrijske metode, npr. DPAdSV, NPAdSV i voltametrijom sa pravougaonim impulsima (SWV) uz korišćenje kapljuće živine elektrode, elektrode od ugljenične paste ili različitih modifikovanih elektroda.

Određivanje nifedipina na elektrodi od zlata nije saopšteno u literaturi do sada.

2.4. Pregled odabranih hromatografskih i spektrometrijskih metoda u analitici lekova

Hromatografija je analitička metoda razdvajanja u kojoj su komponente koje se razdvajaju selektivno raspodeljene između dve faze od kojih je jedna nepokretna (stacionarna) faza, a druga je pokretna (mobilna) faza [37]. Hromatografske tehnike se, u zavisnosti od mobilne faze, mogu podeliti na: gasnu hromatografiju (GC), tečnu hromatografiju (LC) i superkritičnu tečnu hromatografiju (SFC). Hromatografski proces se odigrava kao rezultat ponovljenih stepena sorpcije i desorpcije tokom kretanja analita duž nepokretne faze [38].

2.4.1. Tečna hromatografija (LC)

Tečna hromatografija je varijanta hromatografije u kojoj je pokretna faza tečna, a nepokretna faza je granulovana čvrsta faza, ili tečnost nanescna na granule čvrstog nosača, nerastvorna u tečnosti koja predstavlja pokretnu fazu. Tečnom hromatografijom se mogu kvalitativno i kvantitativno analizirati manje ili više složene smese hemijskih jedinjenja rastvorenih u rastvaraču koji predstavlja pokretnu fazu. Razdvajanje komponenti smese se postiže zbog različitih koeficijenata raspodele između pokretne i nepokretne faze. Zahvaljujući vrlo širokom izboru parova pokretna/nepokretna faza, širok je i izbor smesa koje se mogu analizirati ovom metodom. Važna karakteristika savremenih uređaja za tečnu hromatografiju je mogućnost da se analiza izvrši sa vrlo malim količinama uzorka, u maloj količini rastvarača reda mililitra. Kod visokoeffikasne tečne hromatografije (HPLC, High performance liquid chromatography) pokretna faza se pod visokim pritiskom (do 4×10^7 Pa) uvodi u hromatografski sistem tako da obezbedi stalan protok i na taj način ponovljivost rezultata, dok je nepokretna faza koja se nalazi u koloni u mogućnosti da izdrži tako visok pritisak neophodan za razdvajanje. Hromatografski sistem se sastoji od četiri glavne komponente: komponente za unošenje uzorka (injektor), nepokretne faze, pokretne faze i detektora [37].

HPLC sistem zahteva mobilnu fazu u kojoj su analiti rastvorni. Većina HPLC sistema koristi reverzno-faznu tečnu hromatografiju (RP LC), odnosno nepolarnu nepokretnu fazu i polarnu pokretnu fazu. U takvim sistemima polarniji analiti se eluiraju brže od manje polarnih [37]. Reverzno-fazna tečna hromatografija je idealna za analizu

polarnih i jonskih jedinjenja, i zbog toga je pogodna za LC-MS analize [37]. Često nije moguće postići zadovoljavajuće razdvajanje upotrebom pokretne faze koja se sastoji samo od jednog rastvarača, pa se zbog toga često koriste smeše rastvarača. Razdvajanje pomoću pokretne faze konstantnog sastava (bez obzira na broj komponenti koje ona sadrži) naziva se izokratsko eluiranje, dok je eluiranje gradijentno ukoliko se sastav pokretne faze menja [37]. Problem detekcije komponenti smese posle razdvajanja u procesu tačne hromatografije suštinski je identičan problemu kvalitativne i kvantitativne analize rastvora, uz poseban zahtev da se analiza odvija kontinualno u protočnom režimu. Od prirode analiziranih komponenti zavisi izbor optimalnog načina detekcije. Veliki broj različitih detektora koristi se u rutinskim analizama, uključujući UV/VIS, fluorescentne, elektrohemijske i detektore koji rade na principu indeksa refrakcije, detaljni podaci mogu se naći u literaturi [37-41].

2.4.2. Masena spektrometrija (MS)

Hromatografskim metodama može se postići razdvajanje komponenti smese u cilju njihove identifikacije i/ili određivanja. Komponente se identifikuju na osnovu hromatografskih retencionih karakteristika, što uglavnom nije dovoljno zbog mogućnosti da neke od analiziranih komponenti imaju ista retencionna vremena. Zbog toga se u analitici lekova, osim hromatografskih koriste i druge tehnike, najčešće spektrometrija.

Masena spektrometrija (MS) se zasniva na jonizaciji uzorka, nastali joni se zatim razdvajaju na osnovu odnosa njihovih masa i naelektrisanja (m/z) i detektuju. Dobijeni maseni spektar predstavlja zavisnost relativne brojnosti dobijenih jona u funkciji m/z [37]. Prednost masene spektrometrije (MS) je u tome što u najvećem broju slučajeva ova tehnika omogućava apsolutnu identifikaciju. Masena spektrometrija je veoma osetljiva tehnika, jer se potpuni spektar komponente i njena identifikacija mogu dobiti pomoću veoma malih količina analita (reda veličine 10^{-12}). Maseni spektrometar je sofisticiran i kompjuterizovan instrument koji se sastoji od sledećih delova: sistema za unošenje uzorka, jonskog izvora, masenog analizatora, detektora i softvera za prikupljanje i analiziranje podataka. Jonski izvor je deo instrumenta u kome se uzorak jonizuje.

Jonizacione metode koje se koriste u masenoj spektrometriji uključuju: jonizaciju elektronskim udarom (EI, electron impact ionization), hemijsku jonizaciju (CI, chemical ionization), jonizaciju desorpcijom (desorption ionization), termosprej jonizaciju (TSP, thermospray ionization), elektrosprej jonizaciju (ESI, electrospray ionization), fotojonizaciju na atmosferskom pritisku (APPI, atmospheric-pressure photoionization) i hemijsku jonizaciju na atmosferskom pritisku (APCI, atmospheric-pressure chemical ionization) [37, 38]. Elektrosprej jonizacija pripada tzv. "mekim" jonizacionim tehnikama. Za razliku od nekih drugih tehnika koje pored jonizacije dovode i do fragmentacije, ovom tehnikom se najčešće dobijaju molekulski protonovani $[M+H]^+$ ili deprotonovani $[M-H]^-$ joni, u zavisnosti od polarnosti električnog polja. Pored elektrosprej jonizacije, jedna od najčešće korišćenih jonizacionih metoda je MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization) koja se koristi za karakterizaciju bio-makromolekula kao što su proteini, oligonukleotidi, šećeri i sintetički polimeri [37, 38].

Kod određivanja strukture često je potrebno dobiti više informacija o jonima nastalim mekim jonizacionim tehnikama što se može postići primenom tandemne masene spektrometrije (MS-MS) [37, 38].

2.4.3. Tečna hromatografija-masena spektrometrija (LC-MS)

Snaga masene spektrometrije leži u činjenici da su maseni spektri mnogih jedinjenja dovoljno specifični da omoguće njihovu identifikaciju. Ukoliko je jedinjenje koje se ispituje deo smeše jedinjenja, dobijeni maseni spektar će sadržati jone svih komponenti, međutim ukoliko je ispitivano jedinjenje prisutno u smeši u manjim količinama identifikacija je teža, ali ne i nemoguća. Kombinacija separacionih mogućnosti hromatografije koja omogućava "čistim" jedinjenjima da budu uvedena u maseni spektrometar je od velike prednosti, pogotovu što mnoga jedinjenja sa sličnim ili istim retencionim karakteristikama imaju različite masene spektre, pa se na ovaj način mogu odrediti.

Kombinacija HPLC-masena spektrometrija omogućava identifikaciju i kvantitativno određivanje jedinjenja koja hromatografski nisu u potpunosti razdvojena [37]. Postupak

ispitivanja se sastoji u razdvajanju tečnom hromatografijom, a zatim se frakcije nakon uklanjanja rastvarača analiziraju masenom spektrometrijom. Postoje dve bitne neusaglašenosti koje treba usaglasiti prilikom LC-MS analiza [37]. Prva je što mobilna faza koja se koristi kod HPLC analiza često sadrži znatnu količinu vode, protok je najčešće 1 ml min^{-1} , dok maseni spektrometar radi u uslovima visokog vakuuma, pa je potrebno ukloniti rastvarač mobilne faze pre MS analize. Drugo, većina jedinjenja koja se ispituju tečnom hromatografijom su neisparljiva ili termolabilna i zbog toga nisu pogodna za jonizaciju elektronskim udarom (EI) ili hemijsku jonizaciju (CI) pa se koriste alternativne jonizacione metode, npr. termosprej jonizacija i elektrosprej jonizacija [37, 38].

2.4.4. Primena LC-MS

Najznačajnije polje primene LC-MS u farmaceutskoj industriji je tokom razvoja leka, predkliničkih i kliničkih ispitivanja i proizvodnje. LC-MS se pre svega koristi za određivanje molarne mase i čistoće leka, ispitivanje bioaktivnosti leka, za identifikaciju nečistoća i degradacionih proizvoda. LC-MS nalazi primenu kod proučavanja metabolizma lekova, za ispitivanje metabolita lekova u biološkim tečnostima i ekstraktima tkiva [38]. Kod kliničkih ispitivanja LC-MS se koristi za praćenje leka, za razvoj referentnih metoda, za toksikološka ispitivanja i ispitivanja kliničkih biomarkera [38]. LC-MS se takođe koristi kod analize steroida (doping analize), kao i za ispitivanja bezbednosti hrane, kod ispitivanja rezidua pesticida i srodnih supstanci u voću i povrću, antibiotika i antibakterijskih supstanci, tragova veterinarskih lekova, anaboličkih steroida i raznih toksina u stočnoj hrani i mesu. Posebna pažnja posvećuje se ispitivanju heterocikličnih aromatičnih amina u hrani. Naročito značajno polje primene LC-MS tehnike je kod analize prirodnih jedinjenja u biljnim ekstraktima (različiti flavonoidi, antocijanidini, fenolna i druga jedinjenja) i kod analize biomolekula (proteini, oligosaharidi, lipidi, fosfolipidi i nukleinske kiseline) [38].

U brojnim naučnim i stručnim radovima mogu se naći različite analitičke metode za kvalitativno i kvantitativno određivanje amlodipina i nifedipina u obliku čistih supstanci i komercijalnih proizvoda, kao i za određivanje u biološkim uzorcima (krv, plazma, urin, serum i tkiva).

Amlodipin i nifedipin se mogu odrediti:

- titrimetrijom (nifedipin) [7, 64]
- spektrofotometrijom [42-50]
- fluorometrijom [51, 52]
- polarografijom [31, 53, 54]
- kapilarnom elektroforezom [55-57]
- hromatografijom:
 - visokoefikasna tankoslojna hromatografija (HPTLC) [58-62]
 - tečna hromatografija (HPLC) [7, 63-76], [90]
 - tečna hromatografija sa elektrohemijским detektorom (LC-EC) [77-79], [91]
 - ultra tečna hromatografija (UPLC) [80] i (UPLC-MS-MS) [99]
 - tečna hromatografija sa masenim detektorom (LC-MS) [81] i (LC-MS-MS) [82-85], [92-98]
- masenom spektrometrijom [86]
- gasnom hromatografijom [87, 88], [100]
- imunochemijskim metodama [89]
- elektrohemijskim metodama (npr. ciklična i diferencijalna pulsna voltimetrija) [26-30] [31-36]

2.4.4.1. Primena hromatografskih i spektrometrijskih metoda za određivanje amlodipina

Amlodipin, u obliku amlodipin-bezilata, je opisan u monografijama EP [7], USP [63] i BP [64]. Prema monografiji evropske i britanske farmakopeje za određivanje

amlodipin-bezilata je korišćena oktadecilsilil silikagel kolona (5 μm) kao stacionarna faza i mobilna faza koja se sastoji od 2,3 g dm^{-3} rastvora amonijum-acetata i metanola u odnosu 30:70 (v/v). Detekcija je izvršena UV/VIS detektorom na talasnoj dužini 237 nm [7, 64]. Prema monografiji američke farmakopeje (USP) [63] za određivanje amlodipin-bezilata kao stacionarna faza korišćena je bazno deaktivirana C18 kolona, dok je mobilna faza smeša pufera (pH 3,0), metanola i acetonitrila (50:35:15 v/v/v). Pufer (pH 3,0) je pripremljen rastvaranjem 7,0 ml trietilamina u 800 ml vode, pH vrednost je podešena ortofosfornom kiselinom na $3,0 \pm 0,1$ i rastvor je razblažen vodom do 1000 ml [63].

Još jedan sistem za određivanje amlodipin-besilata u tabletama pomoću HPLC metode sa UV detektorom je sistem sa LiChrospher 100 RP-18 kolonom (5 μm) i mobilnom fazom koja sadrži metanol i vodu sa 1% trietilamina (35:65 v/v) i čiji je pH podešen na 5,0 fosfornom kiselinom [65]. Amlodipin se u tabletama može odrediti i pomoću RP-HPLC uz korišćenje mobilne faze acetonitril-metanol-kalijum-dihidrogenfosfat u odnosu 250:250:500 (v/v/v). Puferski rastvor je pripremljen rastvaranjem 0,05 mol dm^{-3} kalijum-dihidrogenfosfata i 0,1% fosforne kiseline uz podešavanje pH sa trietilaminom. Hromatografija je sprovedena na bazno deaktiviranoj koloni Hypersil C18 (5 μm) [66].

Takođe u tabletama za određivanje amlodipina korišćena je RP-HPLC metoda na RP-C18 koloni i mobilna faza sa 0,02% trietilamina u smeši voda-acetonitril (60:40 v/v) i detekcija na 226 nm. pH vrednost mobilne faze je podešena na 2,5 orto-fosfornom kiselinom [67]. Metoda tačne hromatografija sa DAD detektorom (detekcija na 237 nm) za određivanje pet različitih 1,4-dihidropiridinskih derivata: amlodipina, nitrendipina, felodipina, lacidipina i lerkanidipina u tabletama je primenjena uz upotrebu silikagel alkilamidne kolone i mobilne faze koja se sastoji od acetonitrila i vode (70:30, v/v) i sadrži 0,01 mol dm^{-3} pufera sirćetna kiselina-natrijumacetat (pH 5,0) [68].

Za određivanje amlodipina u različitim komercijalnim proizvodima (tabletama) može se koristiti tačna hromatografija za istovremeno određivanje amlodipin-bezilata i atorvastatin-kalcijuma upotrebom RP-Hypersil silica BDS kolone (5 μm) i mobilne faze 0,05 mol dm^{-3} amonijumacetatni pufer (pH 4,0) i acetonitril u odnosu 40:60 (v/v), detekcija

je na talasnoj dužini od 240 nm ili RP-C18 kolona (5 μm) i smeša koja se sastoji od fosfatnog pufera (1 ml orto-fosforne kiseline u 1000 ml vode), acetonitrila i metanola (53:43:4, v/v/v) kao mobilna faza i UV detekcija na 246 nm [69, 70]. Za određivanje amlodipin-bezilata i atorvastatin-kalcijuma u kombinaciji u tabletama korišćen je takođe i HPLC sistem sa mobilnom fazom koja se sastoji od metanola-acetonitrila-0,05 mol dm^{-3} kalijum-dihidrogenfosfata (20:50:30 v/v/v) na pH 3,5 i kolona Phenomenex Luna C18 (5 μm) [71].

U kombinaciji sa hidrohlorortiazidom, amlodipin je u tabletama određen RP-HPLC metodom na koloni Symmetry C18 (5 μm) i sa mobilnom fazom metanol-acetonitril-0,05 mol dm^{-3} dinatrijum-hidrogenfosfata (60:20:20 v/v/v), pH 7,0 se podesi 1% trietilaminom i sa detekcijom na 254 nm [72].

I drugi HPLC sistemi za određivanje amlodipina u kombinaciji sa losartanom, olmesartanom, telmisartanom ili nebivolol-hidrohloridom u tabletama mogu se naći u literaturi [73-76].

Brza, jednostavna, precizna i validirana HPLC i HPTLC metoda za istovremeno određivanje amlodipina, valsartana i hidrohlorortiazida u tabletama se takođe koriste. Gradijentna RP-HPLC metoda na koloni Phenomenex Luna C18 (5 μm) i mobilna faza koja se sastoji od 0,01 mol dm^{-3} amonijum-acetatnog pufera (pH 6,7) i metanola su korišćene za ispitivanje sa protokom 1 ml min^{-1} . Za detekciju je korišćen UV detektor na 238 nm. HPTLC analiza je urađena na silikagel 60F₂₅₄ sloju korišćenjem smeše hloroform-glacijalna sirćetna kiselina-n-butilacetat (8:4:2, v/v/v) kao mobilne faze. Određivanje je izvršeno denzitometrijski na 320 nm [62].

HPLC metode sa elektrohemijском detekcijom za istovremeno određivanje pet 1,4-dihidropiridinskih derivata u farmaceutskim preparatima, uključujući amlodipin [77] ili za određivanje amlodipina u humanoј plazmi su opisane u literaturi [78, 79].

Ultra tečnom hromatografijom (UPLC) amlodipin je određen u kombinaciji sa telmisartanom i hidrohlorortiazidom u tabletama, na C-18 koloni (1,7 μm) sa gradijentnim

eluiranjem mobilnom fazom A koja se sastoji od natrijum-perhloratnog pufera pH 3,2 ($0,053 \text{ mol dm}^{-3}$) i acetonitrila u odnosu 90:10 (v/v) i mobilnom fazom B koja sadrži natrijum-perhloratni pufer pH 3,2 ($0,053 \text{ mol dm}^{-3}$) i acetonitril u odnosu 20:80 (v/v). Gradijentni program je (T/%B) 0/5, 1.2/5, 1.6/40, 4/40, 4.1/5 i 4.5/5. Detekcija je na 271 nm za hidrohlorotiazid i telmisartan i na 237 nm za amlodipin [80].

Za određivanje amlodipina u humanoj plazmi je korišćena metoda tečne hromatografije-masene spektrometrije (LC-MS) pri čemu su uzorci pripremljeni tečno-tečnom ekstrakcijom. Razdvajanje je izvedeno na C-18 koloni sa mobilnom fazom rastvor $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ amonijumacetata - metanol (30:70, v/v). Elektrosprej jonizacija je korišćena kao jonizacioni izvor [81]. Metoda tečne hromatografije u kombinaciji sa tandemnom masenom spektrometrijom (LC-MS-MS) korišćena je u različitim farmakokinetičkim i studijama bioekvivalence za određivanje amlodipina u krvi [82] ili humanoj plazmi [83, 84].

Veoma osetljiva, jednostavna i brza metoda HPLC-MS-MS na C-18 koloni, sa gradijentnim eluiranjem i mobilnom fazom koja se sastoji od 0,1% mravlje kiseline u vodi i 0,1% mravlje kiseline u acetonitrilu, korišćena je za istovremeno određivanje atorvastatina i amlodipina u humanoj plazmi. Detekcija analita je vršena masenom spektrometrijom sa elektrosprej jonizacijom [85].

Metoda masene spektrometrije (MS) sa elektrosprej jonizacijom (ESI) i fotojonizacijom na atmosferskom pritisku (APPI) korišćena je za ispitivanje fragmentacije različitih dihidropiridinskih blokatora kalcijumovih kanala, pri čemu je fotojonizacija na atmosferskom pritisku upotrebljena kod razvoja metode za kvantitativno određivanje dihidropiridina u humanoj plazmi [86].

Metoda gasne hromatografije (GC) za određivanje amlodipina u humanoj plazmi [87, 88] kao i imunohemijske metode za ispitivanje 1,4-dihidropiridinskih antagonista kalcijuma su takođe opisane u literaturi [89].

2.4.4.2. Primena hromatografskih i spektrometrijskih metoda za određivanje nifedipina

Nifedipin se prema monografijama EP [7] i BP [64] određuje titrimetrijski rastvorom cerijum-sulfata koncentracije $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$. Prema monografiji američke farmakopeje USP [63] nifedipin je kao čista supstanca i u gotovom proizvodu (kapsule, tablete sa produženim oslobađanjem) određen metodom tečne hromatografije (HPLC). Mobilna faza je smeša vode, acetonitrila i metanola (50:25:25 v/v/v), kao stacionarna faza je korišćena C18 kolona ($5 \mu\text{m}$), a detekcija je izvršena na 235 nm. Prema monografiji britanske farmakopeje BP [64] nifedipin je u gotovom proizvodu (kapsule) određen metodom tečne hromatografije (HPLC) na oktadecilsilil silikagel koloni, $5 \mu\text{m}$ (Hypersil C18) dok je kao mobilna faza korišćena smeša acetonitrila i 0,03% (v/v) rastvor ortofosforne kiseline u vodi (40:60 v/v) sa UV detekcijom na 235 nm. Metoda visokoefikasne tečne hromatografije (HPLC) za kvantitativno određivanje nifedipina nalazi primenu na različite načine, npr. za određivanje tragova nifedipina kod validacije čišćenja opreme u farmaceutskoj industriji [90].

HPLC metoda sa elektrohemijском detekcijom primenjena je za određivanje šest različitih 1,4-dihidropiridinskih derivata, uključujući nifedipin, u humanoј plazmi. Hromatografsko razdvajanje je izvršeno na Supelcosil LC-ABZ+Plus C18 koloni. Mobilna faza je smeša metanol-voda (70:30 v/v) koja sadrži $0,002 \text{ mol dm}^{-3}$ pufera sirćetna kiselina-natrijum-acetat (pH 5,0) sa protokom 1 ml min^{-1} . Za detekciju je korišćen amperometrijski detektor sa elektrodom od staklastog ugljenika [91].

Nifedipin se u humanoј plazmi može odrediti metodom tečne hromatografije u kombinaciji sa tandemnom masenom spektrometrijom (LC-MS-MS) ekstrakcijom i taloženjem, a nakon toga se vrši razdvajanje na reverzno faznoj koloni korišćenjem mobilne faze koja je smeša amonijum-acetata i vode. Analit je detektovan na masenom detektoru nakon hemijske jonizacije na atmosferskom pritisku (APCI) [92]. U različitim kliničkim ispitivanjima kardiovaskularnih lekova, kao i studijama bioekvivalence ili za forenzička ispitivanja, metoda tečne hromatografije-masene spektrometrije (LC-MS-MS) za određivanje nifedipina u humanoј plazmi nalazi svoju primenu [93-98].

Veoma osjetljiva metoda ultra tečne hromatografije u kombinaciji sa tandemnom masenom spektrometrijom (UPLC-MS-MS) za određivanje nifedipina u humanoj plazmi i primena ove metode u studijama bioekvivalence je takođe rađena [99].

Za ispitivanje kristalizacionih svojstava nifedipin amornog praška korišćena je inverzna gasna hromatografija (IGC) sa ciljem predviđanja fizičke stabilnosti na temperaturama ispod temperature prelaska stakla u tečno stanje (T_g). Amorfni prah je pripremljen mešanjem kristalnog nifedipina i polivinilpirolidona (PVP) K-30. Undekan je korišćen kao gas za uzorak i metan kao referentni gas [100].

2.5. Proučavanje stabilnosti lekova

Cilj ispitivanja stabilnosti lekova je da se obezbedi dokaz o tome kako se kvalitet aktivne supstance ili kvalitet leka menja tokom vremena pod uticajem različitih faktora okoline, kao što su temperatura, vlažnost i uticaj svetlosti, kao i da se utvrdi re-test period aktivne supstance ili rok upotrebe leka i preporuče uslovi čuvanja leka.

Internacionalna konferencija o harmonizaciji (ICH International Conference on Harmonisation) je definisala smernice za proučavanje stabilnosti lekova [101-105]. Izbor uslova za ispitivanje stabilnosti zavisi od klimatskih uslova u tri regiona sveta (Evropa, Japan i Sjedinjene Američke Države). Na osnovu srednje kinetičke temperature u bilo kom delu sveta, koja se izračunava na osnovu klimatskih podataka, ceo svet je podeljen u četiri klimatske zone I-IV. ICH smernice koje su ovde navedene tiču se klimatskih zona I i II.

Stabilnost farmaceutskih proizvoda se obavezno prati kod:

- Uvođenja novog proizvoda [101, 102]
- Uvođenja novog farmaceutskog oblika [103] i
- Izmena registracione dokumentacije (varijacija) u sledećim slučajevima [106]:
 - Izmena perioda re-analize ili uslova čuvanja aktivne supstance,
 - Zamena nekog od ekscipijenasa drugim (kompatibilnim) ekscipijensom,
 - Izmena kvaliteta i/ili kvantitativnog sastava unutrašnjeg pakovanja,
 - Izmena veličine serije gotovog proizvoda,

- Manja izmena u procesu proizvodnje gotovog proizvoda,
- Promena boje ili arome koje se koriste u procesu proizvodnje gotovog proizvoda,
- Izmjena mase sloja za oblaganje tableta ili mase omotača kapsule,
- Izmjena oblika ili veličine kontejnera ili zatvarača.

Za procenu stabilnosti aktivne supstance i gotovog proizvoda primenjuju se [101]:

- Studije stabilnosti u roku trajanja (long term stability study)
- Studije ubrzanog starenja (accelerated stability study)
- Studije stabilnosti u "stresnim" uslovima (stability study under stressed conditions)

Ispitivanje stabilnosti u roku trajanja podrazumeva da se farmaceutski proizvod čuva u uslovima skladištenja sa temperaturom od $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i pri relativnoj vlažnosti vazduha $60\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$ sve do isteka roka trajanja, pri čemu se uzorci za ispitivanje stabilnosti uzimaju u određenim vremenskim intervalima.

Studije ubrzanog starenja se koriste da bi se u kratkom vremenskom periodu došlo do podataka o stabilnosti i predvideo rok upotrebe proizvoda. Ubrzano starenje se prati u vremenskom periodu od šest meseci (sa vremenskim tačkama 0, 3 i 6 meseci) na temperaturi $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i pri relativnoj vlažnosti $75\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$. Kod ubrzanog starenja, faktor vreme zamenjuje se faktorom povišena temperatura, a proizvod se pored temperaturnih promena izlaže i uslovima povećane vlažnosti, a ukoliko je potrebno i uticaju svetlosti. Pri tome se za ispitivanje stabilnosti koriste komore za stabilnost u kojima postoji mogućnost regulisanja temperature i relativne vlažnosti, a u nekim slučajevima i svetlosnog zračenja [102].

U zavisnosti od prirode aktivne supstance i gotovog proizvoda često se stabilnost prati u uslovima tzv. intermedijarnog starenja ($30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/65\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$) pri čemu su uslovi tako dizajnirani da se prati umereno povećanje brzine hemijske degradacije ili fizičke promene kod aktivne supstance ili gotovog proizvoda [101].

Ispitivanjem stabilnosti pod "stresnim" uslovima aktivne supstance mogu se identifikovati degradacioni proizvodi, što daje mogućnost da se ispita put i mehanizam

degradacije aktivne supstance, kao i da se validiraju "stability indicating" analitičke metode. Ispitivanje stabilnosti pod "stresnim" uslovima uključuje ispitivanje stabilnosti na povišenim temperaturama, u uslovima povišene vlažnosti (primenjuju se temperature i relativna vlažnost veća nego kod ubrzanog starenja), oksidaciju i fotolizu aktivne supstance. Ispitivanje fotostabilnosti je sastavni deo stres studija i ispituje se u saglasnosti sa smernicom ICH Q 1 B [102]. Prema smernici za praćenje fotostabilnosti aktivne supstance i gotovog proizvoda definisana su dva izvora svetlosti koji se mogu koristiti. Prema prvom, uzorak može biti izložen uticaju D65/ID65 svetlosti, odnosno veštačkoj fluorescentnoj lampi, kombinovanoj sa VIS i UV lampom. D65 je internacionalni priznati standard za svetlost koja deluje po spoljašnjoj površini uzorka definisan ISO 10977 (1993). ID65 je definisan kao standard za delovanje svetlosti u unutrašnjosti uzorka. Talasna dužina izvora zračenja je 320 nm. Drugi način izlaganja uzorka svetlosti je primenom bele i UV fluorescentne lampe. Bela fluorescentna lampa deluje po površini uzorka slično kao i svetlost koja je definisana ISO 10977(1993). UV fluorescentna lampa ima spektralnu distribuciju od 320 nm do 400 nm, sa maksimumom emisije energije 350 nm do 370 nm. U toku praćenja fotostabilnosti, iluminacija ne sme biti manja od 1,2 milion lux sati, a integracija UV zračenjem ne manja od 200 Wh/m² [102].

Identifikacija i kvalifikacija degradacionih proizvoda u lekovima je od velike važnosti jer nečistoće, s jedne strane mogu imati uticaj na kvalitet, bezbednost i efikasnost leka, a s druge strane mogu dovesti do neželjenih dejstava na pacijente. Internacionalna konferencija o harmonizaciji (ICH) izdala je smernice za kvalifikaciju nečistoća u aktivnoj supstanci [107] i gotovom proizvodu [108], kao i za ispitivanje stabilnosti za registraciju lekova za humanu upotrebu [101-105].

ICH smernicom Q 2 (R1) [109] se razmatraju zahtevi koje treba uzeti u obzir kod validacije analitičkih postupaka uključenih u dokumentaciju za registraciju leka pomoću kojih se vrši identifikacija, određivanje sadržaja nečistoća, određivanje graničnih vrednosti za kontrolu nečistoća i određivanje sadržaja aktivne supstance. Ispitivanje stabilnosti aktivne supstance i lekova je naročito važno kod razvoja proizvoda, definisanja sastava leka, izbora pakovnog materijala i utvrđivanja uslova za čuvanje leka.

Amlodipin je fotosenzitivan i lako podleže aromatizaciji do piridinskog derivata, kao i ostala 1,4-dihidropiridinska jedinjenja [110, 111]. Fotostabilnost i stabilnost amlodipina u tečnim farmaceutskim oblicima je takođe saopštena u literaturi [112, 113].

U pogledu stabilnosti i kompatibilnosti amlodipin-bezilata sa različitim ekscipijensima u čvrstim farmaceutskim oblicima, uticaj ekscipijenasa i uslova čuvanja na stabilnost amlodipin-bezilata je ispitivan. Glavni degradacioni proizvod je amlodipin-bezilat glikozil koji nastaje zbog dobro poznate Maillard-ove reakcije između primarnih amina (amlodipina) i laktoze kao ekscipijensa koji je rastvoran u vodi [114]. Struktura proizvoda nastalog u Maillard-ovoj reakciji je potvrđena LC-MS analizom.

Degradacija amlodipina pod uticajem temperature dovodi do stvaranja smeše tri ciklična degradaciona proizvoda koji nastaju usled intramolekulske reakcije ciklizacije [115].

Različite analitičke metode su razvijene za proučavanje "stres" degradacionih proizvoda u farmaceutskim aktivnim supstancama i amlodipin-bezilatu uključujući spektrofotometriju [116], HPTLC [117, 118], HPLC [119-122], RP HPLC [123-126], UPLC [80], kapilarnu elektroforezu [127], LC-2D-NMR/LC-MS [128].

Studije forsirane degradacije su pokazale da amlodipin pokazuje sporiju degradaciju pod uticajem temperature [115], da se brže degradira u uslovima fotodegradacije, i to više na UV 366 nm nego na UV 254 nm [111] i da je degradacija amlodipina mnogo veća u uslovima kisele i bazne hidrolize i oksidativnog stresa [120].

Poznato je da su orto-nitro derivati 1,4-dihidropiridina veoma nestabilna jedinjenja, koja se lako oksiduju pod uticajem svetlosti do nitrozo- i nitro- derivata [129-131].

Fotohemijaska stabilnost nifedipina je ispitivana u tabletama sa nifedipinom [132]. Različiti dihidropiridinski blokatori kalcijumovih kanala, uključujući amlodipin, nifedipin ili nilvadipin su bili izloženi D65 iradijaciji lampe prema ICH smernici (ICH Q1B). Fotodegradacija navedenih jedinjenja i njihovi degradacioni proizvodi su praćeni HPLC metodom na reverzno-faznoj koloni sa UV detekcijom. Degradacioni proizvodi su

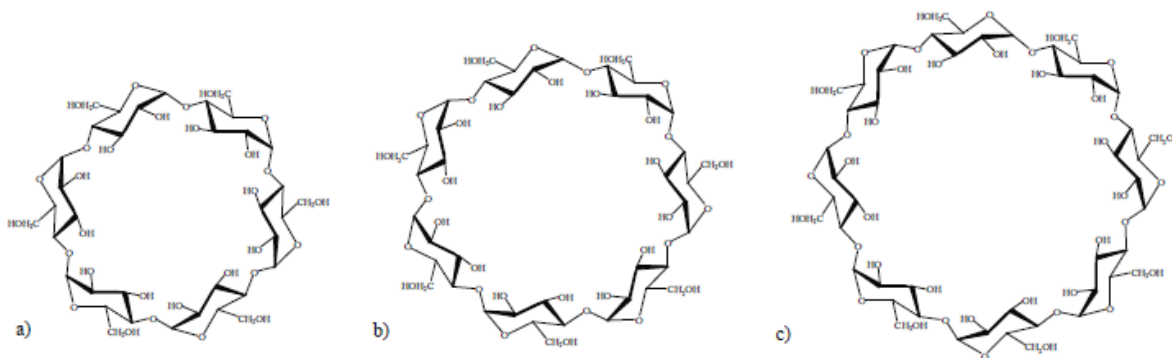
identifikovani MS analizom. Fotohemijske reakcije uključuju fotodegradaciju ovih jedinjenja sa aromatizacijom dihidropiridinskog prstena i konverziju u nitrozo grupu iz nitro grupe benzenovog prstena. Studije hemijske stabilnosti su ukazale da je nifedipin najviše fotosenzitivan.

Stabilnost nifedipina u tabletama je ispitivana i u uslovima povećane temperature (40°C) i relativne vlažnosti (75% RH) tokom 180 dana [133]. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC) i termogravimetrija (TG) su korišćene za ispitivanje osobina nifedipina, ekscipijenasa u tabletama i dva degradaciona proizvoda. HPLC metoda je korišćena za ispitivanje sadržaja nifedipina pre i posle izlaganja degradaciji.

Prema drugoj metodi korišćen je fotokalorimetar za kvantitativno određivanje reakcionih parametara koji su važni za procenu fotostabilnosti nifedipina. Reakcioni put fotodegradacije nifedipina u rastvoru je predložen na osnovu entalpije reakcije određene fotokalorimetrom [134]. Aromatizacija nesimetrično supstituisanih 1,4-dihidropiridina pod uticajem svetlosti je takođe proučavana [135].

2.6. Osnovi inkluzionih kompleksa ciklodekstrina sa lekovima (primena, dobijanje, karakterizacija)

Inkluzioni kompleksi su specijalna grupa ne-klasičnih kompleksa koji nastaju pod uticajem mehaničkih faktora ili svojstava komponenti kompleksa. Komponente kompleksa su domaćin- i gost- molekuli. Molekul-domaćin su jedinjenja koja u svojoj kristalnoj strukturi, ili njenim agregatima, imaju šupljinu dovoljno veliku u koju molekul drugog jedinjenja (molekul-gost) može da se zatvori [136]. Različiti organski molekuli mogu se inkorporirati (zatvoriti) u šupljinu ciklodekstrina stvarajući inkluzione komplekse pri čemu se poboljšavaju fizička svojstva inkorporiranih molekula, kao što su rastvorljivost, fotoosetljivost, stabilnost, miris i dr. [137-140]. Među prirodnim ciklodekstrinima α -, β - i γ -ciklodekstrini, koji sadrže 6, 7 i 8 jedinica D-glukopiranoze, se najčešće koriste u ovu svrhu. Glukoze jedinice su povezane α -1,4 glikozidnim vezama tako da obrazuju ciklične strukture prikazane na slici 24 [141-143].



Slika 24. Strukture ciklodekstrina: a) α -ciklodekstrin, b) β -ciklodekstrin, c) γ -ciklodekstrin [143]

Analiza rentgenskim zracima (XR) je pokazala da jedinice glukoze u ciklodekstrinima imaju termodinamički stabilniju konformaciju "stolice" jer su svi supstituenti u ekvatorijalnim položajima. Kao posledica ove konformacije, sve sekundarne hidroksilne grupe (OH-2 i OH-3) su locirane sa jedne strane cilindričnog molekula, dok su primarne hidroksilne grupe (OH-6) na suprotnoj strani. Zbog toga što je spoljašnja strana molekula ciklodekstrina okružena sekundarnim hidroksilnim grupama, ona ima hidrofilne osobine i rastvorljiva je u vodenim medijumima. Nasuprot tome, unutrašnja strana

molekula ciklodekstrina ima hidrofobne osobine, jer se slobodni elektronski parovi kiseonika u glikozidnom mostu (vezi) nalaze u šupljini molekula ciklodekstrina [144, 145].

Pod uticajem svetlosti 1,4-dihidropiridinski prsten amlodipina se aromatizuje i prelazi u piridinski derivat [110, 111], dok su glavni degradacioni proizvodi nifedipina, nitrozo- i nitro- derivati [129-131].

U cilju poboljšanja biofarmaceutskih karakteristika amlodipina, nifedipina i sličnih lekova mogu se koristiti različiti zaštitni agensi koji poboljšavaju svojstva ovih molekula, kao što su fotoosetljivost, nestabilnost, rastvorljivost i bioraspoloživost. Posebno su značajni inkluzioni kompleksi amlodipina i nifedipina sa β -ciklodekstrinima. Molarni odnos u formiranim kompleksima amlodipin-bezilata i kompleksirajućeg agensa β -ciklodekstrina i (2-hidroksipropil)- β -ciklodekstrina je 1:1 [146]. Na sličan način dobijeni su inkluzioni kompleksi nifedipina sa β -ciklodekstrinima u čvrstom stanju koprecipitacijom u molarnom odnosu 1:1 [143].

Struktura dobijenih kompleksa je okarakterisana pomoću rentgentskih zraka (XR) [143], infracrvenom spektroskopijom (FTIR), nuklearnom magnetnom rezonancom (^1H NMR) i diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom (DSC).

Fotoosetljivost nifedipina u inkluzionom kompleksu je smanjena više u čvrstom stanju nego u rastvoru. Čist nifedipin pokazuje znatno veću fotoosetljivost u poređenju sa inkluzionim kompleksom, i u rastvoru i u čvrstom stanju. Fotoosetljivost nifedipina u čvrstom stanju, kao čiste supstance i u kompleksu, praćena je FTIR metodom [143].

Inkluzioni kompleks amlodipina sa ciklodekstrinima pokazao je znatno veći stepen zaštite molekula amlodipina, pri kontinualnom izlaganju dnevnom svetlu, sa stepenom degradacije koji je bio mnogo niži nego kod slobodnog molekula u čvrstom stanju [146]. Fotoosetljivost amlodipin-bezilata i inkluzionih kompleksa sa ciklodekstrinima je praćena FTIR spektrometrijom [146].

Građenjem inkluzionih kompleksa sa β -ciklodekstrinima može se povećati stabilnost nifedipina pet do deset puta [143, 147-149].

Fotostabilnost amlodipina u inkluzionim sistemima sa ciklodekstrinima, lipozomima i mikrosferama je takođe bila ispitivana [150]. Kompleksi sa amlodipinom su bili podvrgnuti stres studijama i ispitivana je kinetika degradacije supstance u kompleksima u poređenju sa čistom supstancom, u rastvoru i čvrstim farmaceutskim formulacijama. Svi ispitivani kompleksi sa amlodipinom štite lek od oksidacije do aromatičnog derivata [150]. Rezultati ispitivanja stabilnosti inkluzionih kompleksa su pokazali visok stepen zaštite molekula amlodipina od uticaja svetlosti, sa brzinom degradacije nižom nego kod uobičajenih čvrstih formulacija leka [150]. Inkluzionni sistemi sa lipozomima povećavaju polu-život leka (amlodipina) dva puta, sa ciklodekstrinima do četiri puta. Najbolji rezultati stres studija postignuti su kod inkluzionih kompleksa sa mikrosferama, koji pokazuju potpunu fotostabilnost sa manje od 3% degradacije nakon 9h kontinualnog izlaganja uticaju svetlosti.

Dobijeni rezultati imaju još veći značaj zbog mogućnosti primene u razvoju novih farmaceutskih formulacija amlodipina, nifedipina i drugih fotoosetljivih lekova.

Osim kompleksa nifedipina i amlodipina sa ciklodekstrinima [143, 146, 150] mnoga druga ispitivanja i studije su posvećena formiranju sličnih supra-molekulskih struktura sa lipozomima [150, 151], mikrosferama [150, 152], mikročesticama [153] ili biokompatibilnim polimerima [154] koje mogu značajno da poboljšaju svojstva lekova kao što su npr. fotostabilnost, rastvorljivost, oslobađanje aktivne supstance i bioraspoloživost. Tako su ispitivani kompleksi sa lipozomima za transdermalnu isporuku nifedipina [151] koji poboljšavaju modifikovano oslobađanje leka. Kompleksi nifedipina sa mikrosferama pripremljeni od polivinilpirolidona (PVP) i etilceluloze mogu poboljšati in vitro oslobađanje lekova koji su slabo rastvorljivi u vodi, kao što je nifedipin [152]. U cilju poboljšanja fotostabilnosti, oslobađanja aktivne supstance i bioraspoloživosti ispitivana je mogućnost primene mikročestica titan-dioksida za oblaganje mikrokristala nifedipina. Nađeno je da na ovaj način modifikovana površina fotoosetljivih lekova može poboljšati njihovu stabilnost i in vitro bioraspoloživost [153]. Oslobađanje leka (dissolution) i stabilnost takođe se mogu poboljšati inkapsulacijom mikroniziranih čestica leka sa biokompatibilnim polimerima i površinski aktivnim supstancama [154].

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Materijali

U eksperimentalnom delu korišćeni su sledeći standardi, hemikalije i komercijalni uzorci lekova:

- Radni standard amlodipin-bezilata, Zdravlje A.D. Leskovac, Actavis Company
- Radni standard nifedipina, Zdravlje A.D. Leskovac, Actavis Company
- Alopres® tablete, 10 mg, Zdravlje A.D. Leskovac, Actavis Company
- Inkluzioni kompleksi amlodipina i nifedipina sa ciklodekstrinima, Tehnološki fakultet, Leskovac
- Sirove višeslojne ugljenične nanocevi (Sigma-Aldrich)
- Natrijum-hidrogenkarbonat, p.a., Merck
- Dejonizovana voda, 18 M Ω , IHTM, Beograd
- Metanol, HPLC čistoće, J.T. Baker
- Acetonitril, HPLC čistoće, J.T. Baker
- Trietilamin, p.a., Merck
- Amonijum-acetat, p.a., Merck
- Natrijum-hidroksid, p.a., J.T. Baker
- Hlorovodonična kiselina, p.a., Merck
- Vodonik-peroksid, p.a., Merck
- Kalijum-dihidrogenfosfat, p.a., Merck
- Kalijum-hidroksid, p.a., J.T. Baker
- Orto-fosforna kiselina (85%) p.a., Merck
- β -ciklodekstrin, čistoće 98%, Merck, Darmstadt
- (2-hidroksipropil)- β -ciklodekstrin, čistoće 97,5%, Sigma-Aldrich, Wisconsin
- Sumporna kiselina, p.a., Merck
- Azotna kiselina, p.a., Merck
- Voda, prečišćena

3.1.1. Pripremanje standardnih rastvora i uzoraka amlodipin-bezilata

Opseg koncentracija amlodipin-bezilata koje se određuju elektrohemijski korišćen je za ispitivanje amlodipin-bezilata u sirovini, komercijalnom proizvodu i inkluzionim kompleksima sa ciklodekstrinima.

- *Pripremanje osnovnog standardnog rastvora za analizu farmaceutske supstance amlodipin-bezilata*

Elektrohemijski je ispitivana farmaceutska supstanca amlodipin-bezilat tako što je napravljen osnovni rastvor amlodipin-bezilata u dejonizovanoj vodi koncentracije 1 mg ml^{-1} . Određena zapremina osnovnog rastvora amlodipin-bezilata je dodata u elektrolit ($100 \text{ ml } 0,05 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaHCO}_3$ ili fosfatni pufer $\text{pH}=11$) da bi se dobio opseg koncentracija $1,50 - 3,38 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ za ispitivanje u $0,05 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaHCO}_3$ i $13,80 - 19,61 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ za ispitivanje u fosfatnom puferu.

- *Pripremanje uzoraka komercijalnog amlodipin-bezilata*

Elektrohemijski je ispitivan komercijalni proizvod Alopres® tablete, proizvođača Zdravlje A. D. Leskovac, Actavis Company, koje sadrže $13,88 \text{ mg}$ amlodipin-bezilata što odgovara 10 mg amlodipina. Ekscipijensi koji ulaze u sastav placeba su: kukuruzni skrob, celuloza, mikrokristalna; silicijum-dioksid, koloidni, bezvodni; povidon K-30 i magnezijum-stearat. Uzorak tableta je pripremljen sledećom procedurom:

Izmerena je masa deset Alopres® tableta i izračunata prosečna masa jedne tablete. Tablete su sprašene i odmerena je količina tabletne mase koja sadrži zahtevanu količinu amlodipin-bezilata da bi se dobio opseg koncentracija $4,0 - 11,5 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ za ispitivanje u $0,05 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaHCO}_3$ i $13,80 - 17,68 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ za ispitivanje u fosfatnom puferu ($\text{pH}=11$).

Za ispitivanje amlodipin-bezilata u Alopres® tabletama u fosfatnom puferu ($\text{pH}=11$) sa akumulacijom, korišćen je opseg koncentracija od $7,94 - 11,86 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$.

Odmerena sprašena tabletna masa je rastvorena u 10 ml dejonizovane vode, rastvor je tretiran na ultrasoničnom kupatilu 30 min , i filtriran je u odmerni sud od 100 ml . Ostatak je

ispran tri puta sa $0,05 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaHCO}_3$ ili rastvorom pufera (fosfatni pufer) i odmerni sud je dopunjen istim rastvaračem do oznake.

- *Pripremanje uzoraka kompleksa ciklodekstrina sa amlodipinom*

Elektrohemijski su ispitivani inkluzioni kompleksi β -ciklodekstrina i (2-hidroksipropil)- β -ciklodekstrina sa amlodipin-bezilatom tako što je određena zapremina osnovnog rastvora (u dejonizovanoj vodi) dodata u elektrolit ($100 \text{ ml } 0,05 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaHCO}_3$ ili fosfatni pufer, $\text{pH}=11$) da bi se dobile koncentracije u opsegu $3,26 - 9,58 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ za ispitivanje cikličnom voltametrijom i $9,58 - 14,17 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ za ispitivanje voltametrijom sa pravougaonim impulsima.

- *Priprema fosfatnog pufera*

Rastvor pufera (fosfatni pufer) $\text{pH}=11$ je pripremljen rastvaranjem $1,74 \text{ g}$ kalijum-dihidrogenfosfata u 80 ml dejonizovane vode, pH je podešen kalijum-hidroksidom (1 mol dm^{-3}) i rastvor je razblažen do 100 ml dejonizovanom vodom [7].

3.1.2. Pripremanje standardnih rastvora i uzoraka nifedipina

Opseg koncentracija nifedipina koje se određuju elektrohemijски korišćen je za ispitivanje nifedipina u sirovini i inkluzionim kompleksima sa ciklodekstrinima.

- *Pripremanje osnovnog standardnog rastvora za analizu farmaceutске supstance nifedipina*

Elektrohemijski je ispitivana farmaceutska supstanca nifedipin tako što je određena zapremina osnovnog rastvora nifedipina dodata u elektrolit ($100 \text{ ml } 0,05 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaHCO}_3$) da bi se dobile koncentracije u opsegu $1,996 - 7,936 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$.

- *Pripremanje uzoraka kompleksa ciklodekstrina sa nifedipinom*

Elektrohemijski su ispitivani inkluzioni kompleksi β -ciklodekstrina i (2-hidroksipropil)- β -ciklodekstrina sa nifedipinom tako što je određena zapremina osnovnog rastvora (u smeši dejonizovana voda – metanol 1:1 v/v) dodata u elektrolit (100 ml 0,05 mol dm⁻³ NaHCO₃ ili fosfatni pufer) da bi se dobile koncentracije naznačene na slikama 41-46.

3.1.3. Pripremanje inkluzionih kompleksa ciklodekstrina sa lekovima, koprecipitacijom

3.1.3.1. Pripremanje inkluzionih kompleksa ciklodekstrina sa amlodipin-bezilatom

Amlodipin-bezilat (1mmol, 567 mg) i β -ciklodekstrin (1 mmol, 1135 mg) ili (2-hidroksipropil)- β -ciklodekstrin (1 mmol, 1540 mg) se pomešaju i rastvore u 150 ml destilovane vode. Rastvor koji je zaštićen od uticaja svetlosti je mešan na sobnoj temperaturi tokom 24 h, uparavan na vakuum uparivaču na 50 °C do zapremine od približno 20 ml i sušen na temperaturi od 25 °C u desikatoru iznad koncentrovane sumporne kiseline. Dobijeni kristalni kompleks je nakon sušenja korišćen kao takav za dalja ispitivanja [146].

3.1.3.2. Pripremanje inkluzionih kompleksa ciklodekstrina sa nifedipinom

Nifedipin (1 mmol, 346 mg) i β -ciklodekstrin (1 mmol, 1135 mg) ili (2-hidroksipropil)- β -ciklodekstrin (1 mmol, 1540 mg) se pomešaju i rastvore u 150 ml destilovane vode. Rastvor koji je zaštićen od uticaja svetlosti je mešan na sobnoj temperaturi tokom 24 h, uparavan na vakuum uparivaču na 50 °C do zapremine od približno 20 ml i sušen na temperaturi od 25 °C u desikatoru iznad koncentrovane sumporne kiseline. Dobijeni kristalni kompleks je nakon sušenja korišćen kao takav za dalja ispitivanja [143].

Ceo proces dobijanja kompleksa je izvođen u mraku u cilju zaštite amlodipina i nifedipina od fotodegradacije. Molarni odnos u kompleksima nifedipina ili amlodipin-bezilata sa kompleksirajućim agensima β -ciklodekstrin ili (2-hidroksipropil)- β -ciklodekstrin je 1:1.

3.1.4. Pripremanje različitih elektrodnih površina

3.1.4.1. Priprema elektrode od zlata

Polikristalna elektroda od zlata (površine 0,500 cm²) koja se koristi kao radna elektroda, polirana je dijamantskom pastom i aluminijumskom prahom, čišćena je smešom dejonizovane vode 18 MΩ i sumporne kiseline, i zatim je dalje čišćena dejonizovanom vodom 18 MΩ u ultrasoničnom kupatilu.

3.1.4.2. Priprema modifikovane elektrode

Sirove višeslojne ugljenične nanocevi (raw-MWCNT) korišćene su kao takve bez daljeg prečišćavanja za pripremu o-MWCNT. Čistoća sirovih višeslojnih nanocevi je veća od 95% wt%, a spoljašnji i unutrašnji prečnici su 20-30 nm i 5-10 nm, respektivno.

Oksidacija nanocevi (MWCNT) koje se kao takve koriste za pripremu modifikovane elektrode od zlata je izvedena prema dobro poznatoj metodi [155]. Količina od 110 mg sirovih višeslojnih nanocevi (raw-MWCNT) je najpre tretirana smešom (v/v 3:1) koncentrovane H₂SO₄ i HNO₃ kiseline (120 ml). Ova smeša je zatim tretirana 3 h na 40 °C u ultrasoničnom kupatilu radi uvođenja funkcionalnih grupa koje sadrže kiseonik na površinu nanocevi (MWCNT). Nakon hlađenja do sobne temperature, oksidovane nanocevi (o-MWCNT) su dodate u kapima u 300 ml hladne dejonizovane vode, a zatim su filtrirane u vakuumu preko 0,05 μm membranskog filtera od politetrafluoroetilena (PTFE) i isprane dejonizovanom vodom sve do neutralne pH. Uzorak je sušen u vakuum sušnici na 80 °C tokom 8 h.

Karakterizacija sirovih (raw-MWCNT) i oksidovanih nanocevi (o-MWCNT) je vršena pomoću FTIR, TGA, UV, XRD, TEM i tehnikom elementarne analize kao i elektrohemijskom karakterizacijom tankog sloja oksidovanih nanocevi (o-MWCNT) što je prethodno saopšteno [155, 156]. Mesta koncentrisanja kiselih i baznih grupa (karboksilne grupe, laktoni, fenoli, ukupan broj kiselih i baznih mesta) na površini sirovih (raw-MWCNT) i oksidovanih (o-MWCNT) nanocevi su kvantitativno određena Boehm metodom [156]. Pokazano je da oksidacioni proces izveden upotrebom jakih kiselina

značajno smanjuje ostatak metalnog katalizatora u oksidovanim nanocevima (o-MWCNT) [157].

Za elektrohemijška merenja su korišćene oksidovane nanocevi (o-MWCNT) koje su nanete na površinu elektrode od zlata u obliku tankog filma, kao što je detaljno opisano u literaturi [158-160]. Ovim postupkom pripreme filma dobijeno je 0,10 mg nanocevi po 1 cm² površine Au.

3.1.5. Postupci forsirane (ubrzane degradacije) amlodipin-bezilata [102, 111, 120]

3.1.5.1. Priprema uzoraka za ispitivanje forsirane degradacije tečnom hromatografijom (HPLC)

Priprema osnovnog rastvora

Osnovni rastvor je pripremljen rastvaranjem 10 mg amlodipin-bezilata u metanolu u odmernom sudu od 10 ml tako da se dobije rastvor koncentracije 1000 µg ml⁻¹. Za ispitivanja je korišćen uvek sveže pripremljen rastvor.

3.1.5.1.1. Alkalna degradacija

Ispitivanje degradacije amlodipin-bezilata u alkalnim uslovima je izvedeno sledećim eksperimentima:

- 1 ml osnovnog rastvora amlodipin-bezilata i 9 ml rastvora natrijum-hidroksida, koncentracije 0,1 mol dm⁻³ je ostavljeno na sobnoj temperaturi tokom 4 h. Nakon degradacije rastvor je neutralizovan hlorovodoničnom kiselinom (c=0,1 mol dm⁻³) i razblažen mobilnom fazom u odmernom sudu od 100 ml tako da je dobijen rastvor koncentracije 10 µg ml⁻¹.
- Drugi eksperiment je izveden tako što je 1 ml osnovnog rastvora amlodipin-bezilata i 5 ml rastvora natrijum-hidroksida koncentracije 0,1 mol dm⁻³ zagrevano na 80 °C tokom 6 h. Nakon toga je rastvor neutralizovan hlorovodoničnom kiselinom i razblažen mobilnom fazom u odmernom sudu od 100 ml pri čemu je dobijen rastvor koncentracije 10 µg ml⁻¹.

- Treći eksperiment je izveden tako što je 1 ml osnovnog rastvora amlodipin-bezilata i 0,2 ml rastvora natrijum-hidroksida koncentracije 5 mol dm^{-3} zagrevano na $80 \text{ }^\circ\text{C}$ tokom 6 h. Nakon toga je rastvor neutralizovan hlorovodoničnom kiselinom ($c=0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) i razblažen mobilnom fazom u odmernom sudu od 100 ml tako da je dobijen rastvor koncentracije $10 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$.

3.1.5.1.2. Degradacija sa $0,05 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaHCO}_3$

- Rastvor za ispitivanje je pripremljen tako što je 10 mg amlodipin-bezilata rastvoreno u odmernom sudu od 100 ml u $0,05 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaHCO}_3$. Sveže pripremljen rastvor je upoređen sa rastvorom koji je pripremljen na isti način i čuvan na sobnoj temperaturi tokom 5 h.
- U drugom eksperimentu 10 mg amlodipin-bezilata je rastvoreno u odmernom sudu od 100 ml u $0,05 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaHCO}_3$ i rastvor je zagrevan na $80 \text{ }^\circ\text{C}$ tokom 5 h. pH vrednost rastvora na kraju procesa degradacije je 8,87. Rastvor je zatim razblažen mobilnom fazom tako da je dobijen rastvor koncentracije $10 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$.

3.1.5.1.3. Oksidativna degradacija

- Za ispitivanje oksidativne degradacije, inicijalno je uzet 1 ml osnovnog rastvora amlodipin-bezilata i 9 ml 3% H_2O_2 . Rastvor je ostavljen na sobnoj temperaturi tokom 24 h, nakon toga je razblažen mobilnom fazom u odmernom sudu od 100 ml tako da je dobijen rastvor koncentracije $10 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$.
- Dodatno, su pripremljena dva uzorka za ispitivanje oksidativne degradacije. 1ml osnovnog rastvora amlodipin-bezilata i 9 ml rastvora 3% H_2O_2 : metanol = 80:20 (v/v) je zagrevano na $80 \text{ }^\circ\text{C}$ tokom 2 h, a u drugom eksperimentu tokom 6 h. Nakon toga je rastvor razblažen mobilnom fazom u odmernom sudu od 100 ml tako da je dobijen rastvor koncentracije $10 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$.

3.1.5.1.4. Fotodegradacija

Rastvor amlodipin-bezilata je pripremljen rastvaranjem 14,3 mg sirovine u 100 ml vode. Zatim je 5 ml rastvora izloženo delovanju UV svetlosti (366 nm) tokom 2 h kao i

photodegradaciji prema ICH smernici tokom 14 dana (1,2 million Lux hrs i 200 Watt hrs/m²).

3.1.5.1.5. Elektrohemijska degradacija

Elektrohemijska degradacija amlodipin-bezilata ($c=9,9 \mu\text{g ml}^{-1}$) je izvedena cikličnom voltametrijom u $0,05 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaHCO}_3$ na elektrodi od zlata tokom 9 sati upotrebom opreme koja je detaljno opisana u radu [161].

3.1.5.2. Priprema uzoraka za ispitivanje forsirane degradacije metodom LC-MS

Kod ispitivanja proizvoda forsirane degradacije amlodipin-bezilata primenom LC-MS tehnike bile su uključene alkalna, kisela, oksidativna i elektrohemijska degradacija u $0,05 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaHCO}_3$.

Osnovni rastvor: Korišćen je rastvor amlodipin-bezilata u metanolu koncentracije 1 mg ml^{-1} za ispitivanje degradacionih proizvoda u uslovima bazne, kisele i oksidativne degradacije.

- *Alkalna degradacija:* 1 ml osnovnog rastvora amlodipin-bezilata i 0,2 ml rastvora natrijum-hidroksida koncentracije 5 mol dm^{-3} je zagrevano na $80 \text{ }^\circ\text{C}$ tokom 6 h. Nakon toga je rastvor neutralizovan hlorovodoničnom kiselinom i razblažen mobilnom fazom u odmernom sudu od 100 ml pri čemu je dobijen rastvor koncentracije $10 \mu\text{g ml}^{-1}$.
- *Kisela degradacija:* 1 ml osnovnog rastvora amlodipin-bezilata i 0,2 ml rastvora hlorovodonične kiseline koncentracije 5 mol dm^{-3} je zagrevano na $80 \text{ }^\circ\text{C}$ tokom 6 h. Nakon toga je rastvor neutralizovan natrijum-hidroksidom i razblažen mobilnom fazom u odmernom sudu od 100 ml tako da je dobijen rastvor koncentracije $10 \mu\text{g ml}^{-1}$.
- *Oksidativna degradacija:* 1 ml osnovnog rastvora amlodipin-bezilata i 9 ml rastvora 3% H_2O_2 : metanol = 80:20 (v/v) je zagrevano na $80 \text{ }^\circ\text{C}$ tokom 6 h. Nakon toga je rastvor razblažen mobilnom fazom u odmernom sudu od 100 ml tako da je dobijen rastvor koncentracije $10 \mu\text{g ml}^{-1}$.
- *Elektrohemijska degradacija:* Eksperiment je izveden kao što je opisano u 3.1.5.1.5.

3.2. Aparati i uređaji

- 3.2.1. Potenciostat RDE 4, PINE, XY pisač PM 8134, Philips, korišćen za cikličnu voltametriju
- 3.2.2. Gamry potenciostat (Reference 600), softver PV 220, korišćen za voltametriju sa pravougaonim impulsima (kod amlodipina)
- 3.2.3. Autolab potenciostat/galvanostat (Metrohm, ECO Chemie, The Netherlands) korišćen za voltametriju sa pravougaonim impulsima (kod inkluzionih kompleksa amlodipina i nifedipina sa ciklodekstrinima)
- 3.2.4. HPLC aparat 1100 Series (Agilent) (binary pump, column thermostat, the thermostated autosampler, diode array detector), softver ChemStation 32
- 3.2.5. HPLC aparat 1100 Series (Agilent Technologies) (degasser, autosampler, diode array detector) kuplovan sa 6210 Time-of-Flight LC/MS sistemom (Agilent Technologies), softver MassHunter Workstation, korišćen za LC-MS analizu
- 3.2.6. Mikroskop NanoScope III A (Veeco, USA)
- 3.2.7. Elektronska vaga Sartorius AC 121S (Sartorius Goettingen, Germany)
- 3.2.8. UV light cabinet Camag (Made in Switzerland)
- 3.2.9. Light cabinet type PSC 062 (Weiss Gallenkamp, UK) opremljen fluorescentnom i UV lampom, prema ICH smernici za ispitivanje fotostabilnosti (opcija 2, ICH Q1B, 1996)
- 3.2.10. pH metar (Metrohm type 827 pH lab)
- 3.2.11. Ultrasonično kupatilo UZ-4P, Iskra Kranj, Slovenija
- 3.2.12. Milli-Q sistem za prečišćavanje vode, 18M Ω
- 3.2.13. Vakuum uparivač, Büchi (Switzerland)
- 3.2.14. Magnetna mešalica, Velp Scientifica
- 3.2.15. Membranski filteri od celuloze 0,45 μm (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingem, Germany)
- 3.2.16. Membranski filteri od politetrafluoroetilena 0,05 μm (PTFE)

3.3. Metode

3.3.1. Ciklična voltametrij (CV)

Oprema koja je korišćena za cikličnu voltametriju je potenciostat RDE 4 Pine, XY pisač PM 8134 Phillips i elektrohemijaska ćelija koja se sastoji se od staklene posude i tri elektrode [162]. U eksperimentima je korišćena komercijalna Tacusell staklena ćelija. Polikristalna elektroda od zlata je korišćena kao radna elektroda (Pine rotating disc, površine 0,500 cm²), žica od zlata kao pomoćna elektroda i zasićena kalomelova elektroda (SCE, saturated calomel electrode) kao referentna elektroda. Svi potencijali su dati prema zasićenoj kalomelovoj elektrodi (*vs.* SCE). Pre dodavanja ispitivanih rastvora lekova ili pre dodavanja kompleksa ciklodekstrina elektrolit je degaziran provođenjem azota. Svi eksperimenti su izvedeni na sobnoj temperaturi.

3.3.2. Voltametrij sa pravougaonim impulsima (SWV)

Za metodu voltametrije sa pravougaonim impulsima (SWV) je korišćen Autolab i Gamry potenciostat i elektrohemijaska ćelija koja se sastoji od staklene posude i tri elektrode, kao što je navedeno kod metode ciklične voltametrije. Uslovi određivanja lekova su dati u tekstu ispod slika u rezultatima i diskusiji.

3.3.3. Tečna hromatografija

Hromatografski uslovi pod kojima su ispitivani *amlodipin-bezilata u sirovini, komercijalnom proizvodu* i elektrolitu tokom praćenja elektrohemijske aktivnosti amlodipin-bezilata:

- Izokrasko eluiranje (sastav mobilne faze se ne menja tokom vremena)
- kolona: Symmetry C18, 5 µm (oktadecilsilil silikagel) (Waters, 150 mm x 4,6 mm id)
- mobilna faza: acetonitril - metanol - rastvor trietilamina (15:35:50, v/v/v).
- zapremina injektiranja: 100 µl
- protok: 1,0 ml min⁻¹
- temperatura kolone: 20 °C
- talasna dužina: 237 nm

- *Rastvor trietilamina* je pripremljen na sledeći način: 7,0 ml trietilamina je rastvoreno u 1 dm³ vode i pH vrednost rastvora je podešena na 3,0±0,1 orto-fosfornom kiselinom 85%.

Hromatografski uslovi pod kojima su ispitivani *degradacioni proizvodi amlodipin-bezilata*:

- Izokratsko eluiranje (sastav mobilne faze se ne menja tokom vremena)
- kolona: Spherisorb ODS1, 5 µm (oktadecilsilil silika gel) (Waters, 250,0 mm x 4,0 mm id)
- mobilna faza: 2,3 g dm⁻³ rastvora amonijum-acetata (u vodi) - metanol (30:70, v/v)
- zapremina injektiranja: 100 µl
- protok: 1,0 ml min⁻¹
- temperatura kolone: 20 °C
- talasna dužina: 237 nm

Hromatografski uslovi pod kojima su ispitivani *amlodipin i inkluzioni kompleksi amlodipin-bezilata sa ciklodekstrinima* kao i elektrolit tokom praćenja elektrohemijske aktivnosti amlodipin-bezilata:

- Izokratsko eluiranje (sastav mobilne faze se ne menja tokom vremena)
- kolona: Spherisorb ODS1, 5 µm (oktadecilsilil silika gel) (Waters, 250,0 mm x 4,0 mm id)
- mobilna faza: 2,3 g dm⁻³ rastvora amonijum-acetata (u vodi) - metanol (30:70, v/v)
- zapremina injektiranja: 20 µl
- protok: 1,0 ml min⁻¹
- temperatura kolone: 20 °C
- talasna dužina: 237 nm

Hromatografski uslovi pod kojima su ispitivani *nifedipin i inkluzioni kompleksi nifedipina sa ciklodekstrinima* kao i elektrolit tokom praćenja elektrohemijske aktivnosti nifedipina:

- Izokratsko eluiranje (sastav mobilne faze se ne menja tokom vremena)
- kolona: Hypersil ODS, 5 µm (Agilent, 250,0 mm x 4,6 mm id)

- mobilna faza: acetonitril - 0,03% v/v rastvor orto-fosforne kiseline (40:60, v/v); pH vrednost mobilne faze je 2,67
- zapremina injektiranja: 20 μ l
- protok: 1,0 ml min⁻¹
- temperatura kolone: 20 °C
- talasna dužina: 235 nm

U svim hromatografskim ispitivanjima mobilna faza je filtrirana kroz 0,45 μ m membranski filter od celuloze i degazirana pre upotrebe. U toku izvođenja analiza ispitivani uzorci su zaštićeni od uticaja svetlosti, a ispitivanja su izvedena u uslovima kontrolisane sobne temperature (20-25 °C).

3.3.4. LC-MS tehnika

Uslovi LC-MS ispitivanja *degradacionih proizvoda amlodipin-bezilata*:

- Izokratsko eluiranje (sastav mobilne faze se ne menja tokom vremena)
- kolona: Spherisorb ODS1, 5 μ m (oktadecilsilil silika gel) (Waters, 250,0 mm x 4,0 mm id)
- mobilna faza: 2,3 g dm⁻³ rastvora amonijum-acetata (u vodi 18 M Ω) - metanol (30:70, v/v)
- diode array detektor (DAD) kuplovan sa 6210 Time-of-Flight LC/MS sistemom (Agilent Technologies)
- zapremina injektiranja: 100 μ l
- protok: 1,0 ml min⁻¹
- temperatura kolone: 30 °C
- talasna dužina: 237 nm

Za dobijanje i obradu podataka korišćen je softver MassHunter Workstation. Pozitivno naelektrisani molekularni joni dobijeni su elektrosprej jonizacijom (ESI) na atmosferskom pritisku: eluirana jedinjenja su mešana sa azotom u zagrejanom interfejsu, a polarnost je podešena na pozitivnu, sa sledećim vrednostima ESI parametara: potencijal kapilare, 4,0 kV; temperatura gasa, 350 °C; protok gasa za sušenje, 12 dm³/min; pritisak nebulajzera,

310,26 Pa; napon fragmentora 140 V. Maseni spektri su beleženi u m/z oblasti od 100-2000.

3.3.5. AFM tehnika (atomic force microscopy)

AFM tehnikom su dobijeni podaci o izgledu površine amlodipin/Au i površine amlodipin/Au/o-MWCNT. Korišćen je mikroskop NanoScope III A (Veeco, USA) na sobnoj temperaturi. Gravirane silikonske sonde sa konstantom opruge 20-80 N m⁻¹ su korišćene.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

Ovo poglavlje sastoji se od tri tematske celine u kojima su obrađeni i diskutovani dobijeni rezultati. Tema i cilj prvog poglavlja je ispitivanje elektrohemijske aktivnosti amlodipin-bezilata, kao čiste supstance i u komercijalnom proizvodu Alopres® tabletama. U drugom delu su ispitivani degradacioni proizvodi amlodipin-bezilata pod različitim uslovima stresa, uključujući elektrohemijsku degradaciju. U okviru trećeg poglavlja obrađena je elektrohemijska karakterizacija inkluzionih kompleksa amlodipina i nifedipina sa ciklodekstrinima. Ispitivane koncentracije amlodipina i nifedipina u elektrolitu su potvrđene metodom tečne hromatografije.

4.1. Elektrohemijsko ponašanje amlodipin-bezilata

Praćenje elektrohemijskog ponašanja amlodipin-bezilata čiste supstance i komercijalnog proizvoda izvršeno je prvo pomoću ciklične voltametrije, a zatim i voltametrije sa pravougaonim impulsima. Koncentracija amlodipin-bezilata u elektrolitu je simultano praćena metodom tečne hromatografije (HPLC).

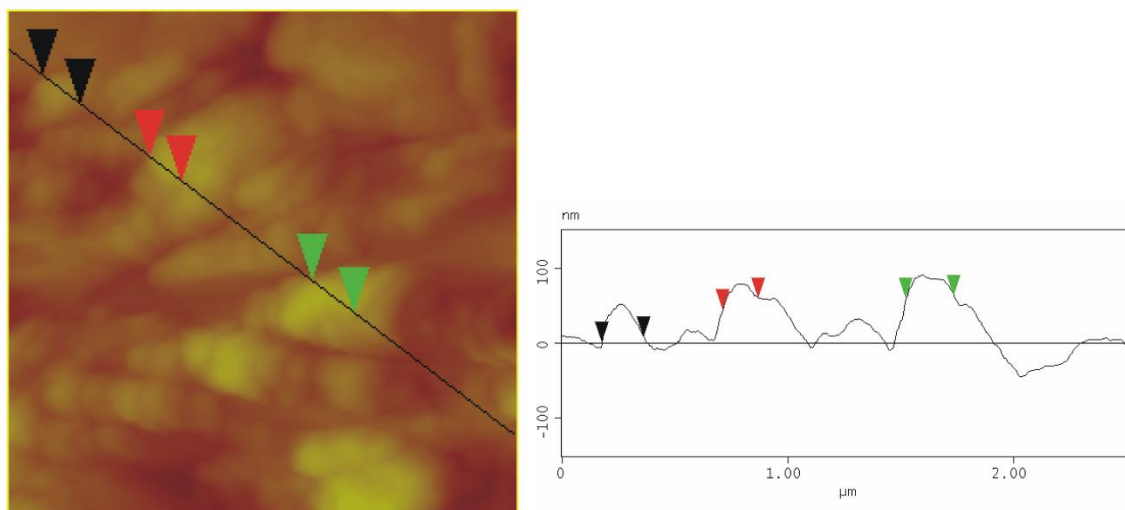
4.1.1. Proučavanje elektrohemijske aktivnosti amlodipin-bezilata standarda i u Alopres tabletama cikličnom voltametrijom, bez akumulacije

Kod metode ciklične voltametrije, kao što je navedeno u eksperimentalnom delu, korišćena je elektroda od zlata i elektroda od zlata modifikovana aktiviranim nanocevima. Kao elektrolit su korišćeni $0,05 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaHCO}_3$ i fosfatni pufer (pH=11).

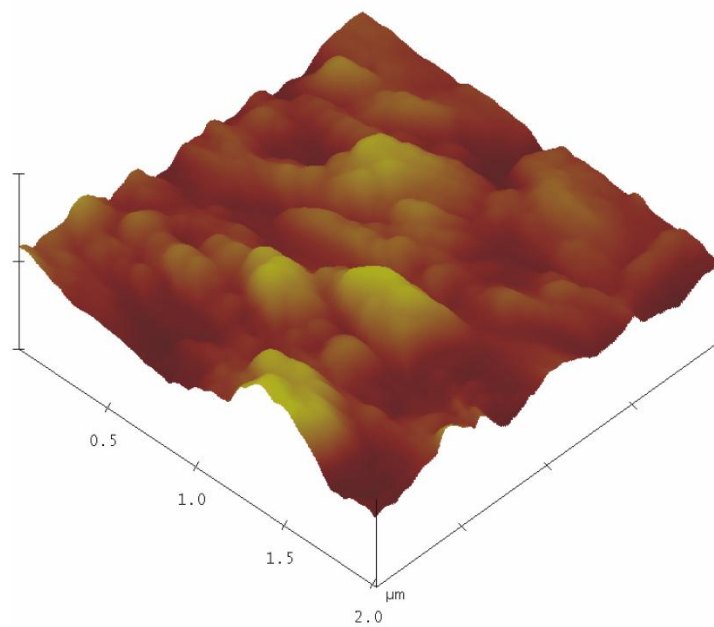
Pre početka eksperimenta elektrolit je degaziran provođenjem azota, a površine elektroda su okarakterisane AFM tehnikom. AFM tehnikom su dobijeni podaci o izgledu površine amlodipin/Au i površine amlodipin/Au/o-MWCNT.

Na slikama 25 i 26 je prikazan tipičan dvo-dimenzionalni (2D) i tro-dimenzionalni (3D) AFM izgled površine amlodipin/Au dobijen nanošenjem vodene suspenzije amlodipina na površinu od zlata.

Kao što se vidi na slici 25 mali aglomerati amlodipin-bezilata pokrivaju elektrodu od zlata i uz to su kompaktni i uniformno raspoređeni, sa prosečnim prečnikom od 200 nm (sl. 26).



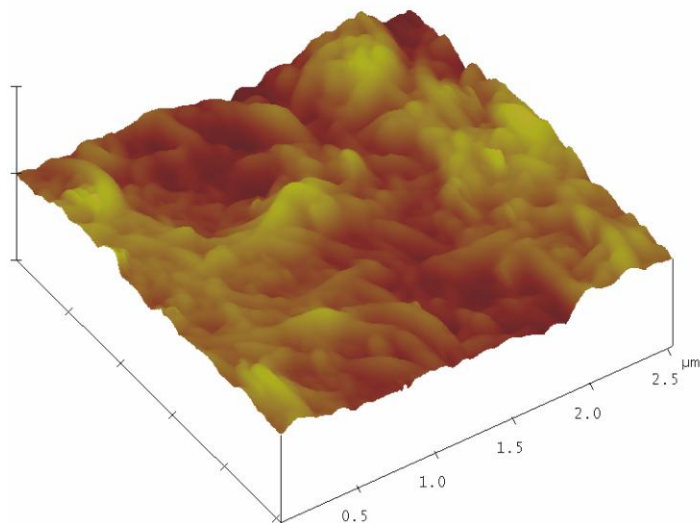
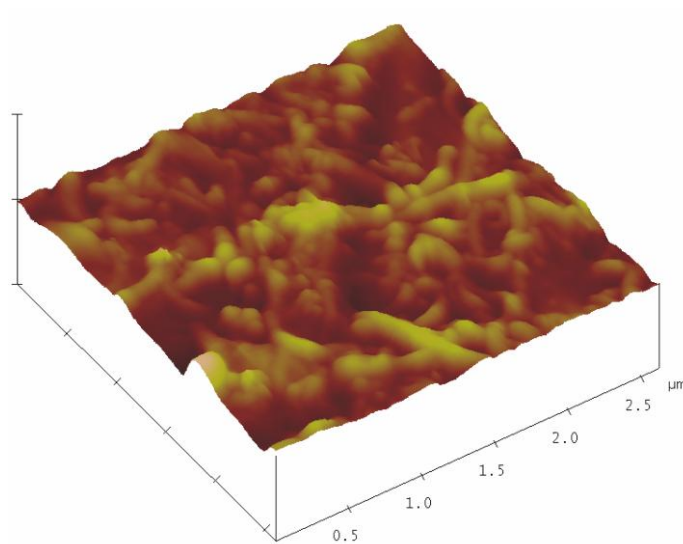
Slika 25. 2D AFM izgled i profil visina ($3 \times 3 \times 0,3 \mu\text{m}$) amlodipin/Au



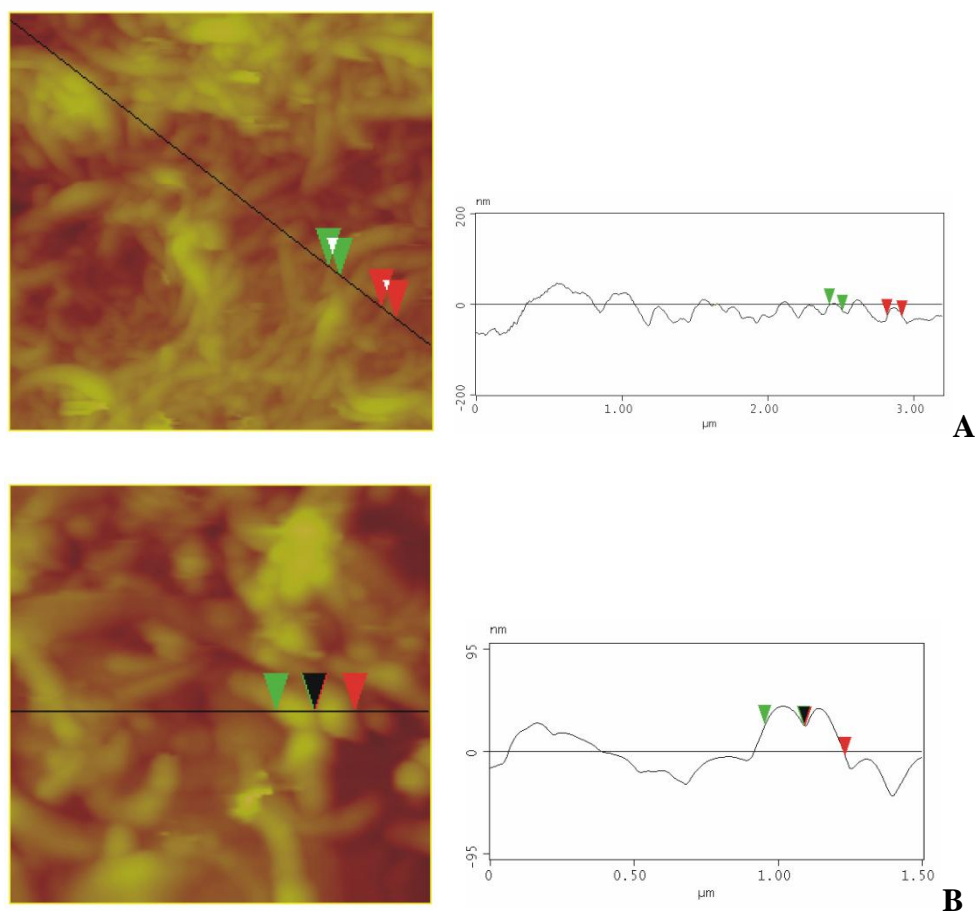
Slika 26. 3D AFM izgled ($2 \times 2 \times 0,3 \mu\text{m}$) amlodipin/Au

Elektroda od zlata modifikovana o-MWCNT je pripremljena nanošenjem kapi vodene suspenzije nanocevi na površinu od zlata. Kao što je prikazano na slici 27, jasno se

vidi da nasumično orijentisane o-MWCNT homogeno pokrivaju celu površinu elektrode od zlata, sa srednjim prečnikom od 100 nm (sl. 28a).

**A****B**

Slika 27. 3D AFM izgled a) Au/o-MWCNT (2,5 x 2,5 x 0,4 μm) i b) amlodipin/Au/o-MWCNT (2,5 x 2,5 x 0,5 μm)

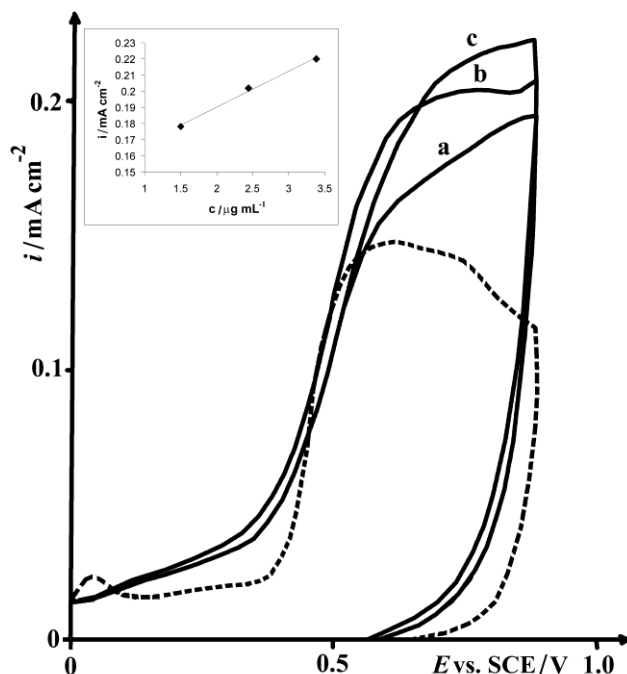


Slika 28. 2D izgled i profil visina a) o-MWCNT (3 x 3 x 0,4 μm) i b) amlodipin/Au/o-MWCNT (1,5 x 1,5 x 0,2 μm)

Tretiranje kiselinom sirovih MWCNT, upotrebom oksidujućeg agensa azotne kiseline, prouzrokuje veliko oštećenje grafitne površine materijala, pri čemu dolazi do porasta broja oštećenih mesta i skraćivanja nanocevi. Skraćene o-MWCNT naležu na elektrodu od zlata mnogo lakše zbog smanjene rigidnosti, a prisustvo kiseonika doprinosi boljem prijanjanju za površinu elektrode od zlata.

S druge strane, nakon adsorbovanja amlodipina, prečnik o-MWCNT obloženih amlodipin-bezilatom postaje "širi" u poređenju sa o-MWCNT sa srednjim prečnikom od 140 nm (sl. 28b). Amlodipin-bezilati na modifikovanoj elektrodi Au/o-MWCNT je dobro dispergovani, ukazujući na to da o-MWCNT mogu dobro vezati amlodipin za površinu.

Na slici 29 je prikazan ciklični voltamogram standarda amlodipin-bezilata u $0,05 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaHCO}_3$ koji je dobijen bez akumulacije leka.

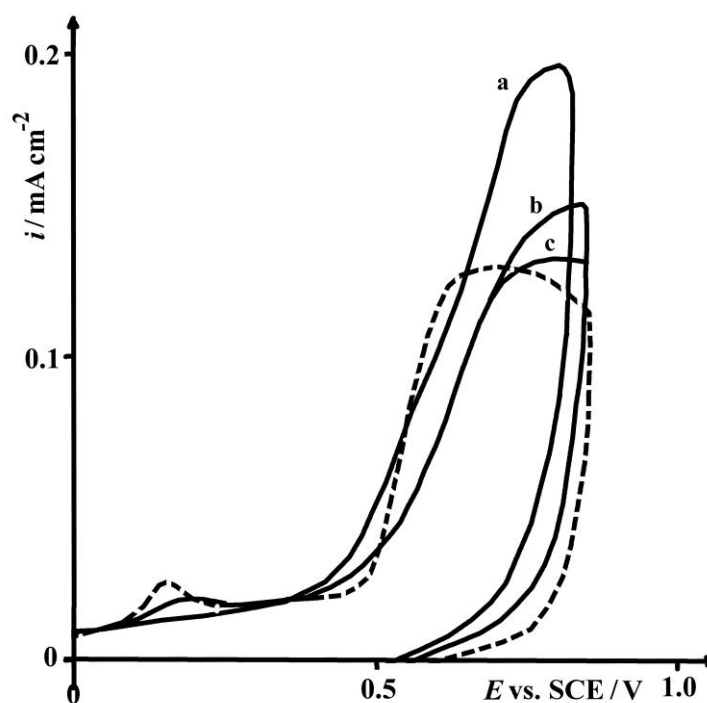


Slika 29. Ciklični voltamogram elektrode od zlata u $0,05 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaHCO}_3$ (isprekidana linija) i u prisustvu amlodipin-bezilata (puna linija) a) $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, b) $2,439 \mu\text{g mL}^{-1}$, c) $3,38 \mu\text{g mL}^{-1}$, brzina promene potencijala: 50 mV s^{-1}

Anodna reakcija, sa maksimalnim vrednostima struja, je uočena između potencijala $0,5 \text{ V}$ i $0,85 \text{ V}$ za sve prikazane koncentracije. U odsečku na slici 29 je prikazana linearna zavisnost anodnih struja od koncentracije u ispitivanom opsegu ($1,50 - 3,38 \mu\text{g mL}^{-1}$) koja je dobijena na potencijalu od $0,75 \text{ V}$.

Mali aglomerati amlodipin-bezilata na elektrodi od zlata koji se vide pomoću AFM metode (sl. 25) pokrivaju površinu elektrode i tokom prvog ciklusa ostaju adsorbovani na njoj prouzrokujući znatno niže struje u drugom i sledećim ciklusima.

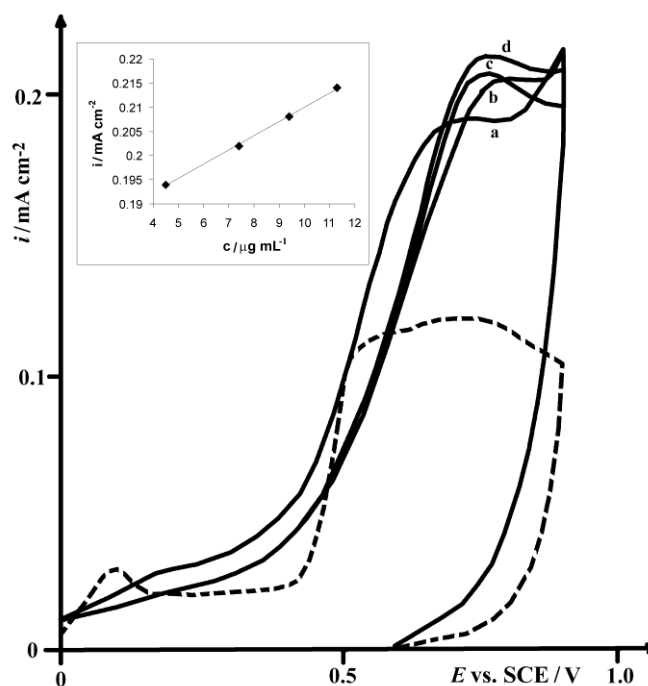
Ovo je potvrđeno eksperimentom prikazanim na slici 30. Nakon dvadeset ciklusa u prisustvu $2,439 \mu\text{g ml}^{-1}$ amlodipin-bezilata, zabeležen je ciklični voltamogram (sl. 30, linija a), elektroda je isprana dejonizovanom vodom, osušena na vazduhu tokom noći i zatim prenetu u kompletno čistu elektrohemijisku ćeliju i elektrolit. U prvom ciklusu ciklični voltamogram pokazuje anodnu oksidaciju amlodipina sa nižim strujama nego što su zabeležene posle 20 ciklusa po završetku eksperimenta prikazanog na sl. 29 (sl. 30, linija b), ukazujući na to da amlodipin očigledno ostaje snažno adsorbovan na površini elektrode. Na slici 29 kao i na sledećim slikama prikazan je samo prvi sweep, a površina elektrode je pripremljena za svaku prikazanu koncentraciju kao što je opisano u eksperimentalnom delu.



Slika 30. Ciklični voltamogram elektrode od zlata u $0,05 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaHCO}_3$ (isprekidana linija) i a) posle 20 ciklusa u prisustvu $2,439 \mu\text{g ml}^{-1}$ amlodipin-bezilata (puna linija); b) elektroda je osušena na vazduhu tokom noći i prenetu u čistu elektrohemijisku ćeliju i elektrolit (prvi sweep); c) drugi sweep, brzina promene potencijala: 50 mV s^{-1}

Na slici 31 je prikazan ciklični voltamogram Alopres® tableta u $0,05 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaHCO}_3$ dobijen bez akumulacije leka. Svi prisutni ekscipijensi, kao što je ranije

publikovano, nemaju elektrohemijisku aktivnost pod istim eksperimentalnim uslovima [162] i amlodipin-bezilat kao aktivna supstanca Alopres® tableta pokazuje linearnu zavisnost anodnih struja od koncentracije, ali sa višim vrednostima ($4,0 - 11,5 \mu\text{g ml}^{-1}$) na potencijalu $0,75 \text{ V}$ (kao što je prikazano u levom uglu na sl. 31).



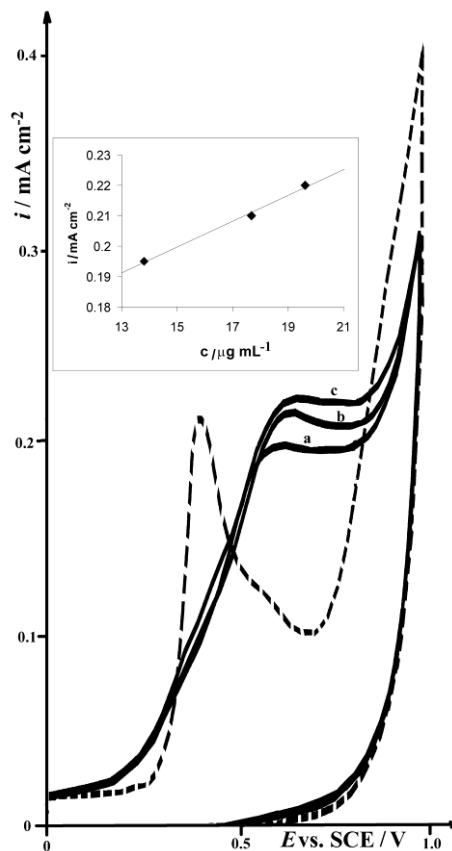
Slika 31. Ciklični voltamogram elektrode od zlata u $0,05 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaHCO}_3$ (isprekidana linija) i u prisustvu amlodipina u Alopres® tabletama (puna linija) a) $5 \mu\text{g ml}^{-1}$, b) $6,5 \mu\text{g ml}^{-1}$, c) $9 \mu\text{g ml}^{-1}$, d) $12 \mu\text{g ml}^{-1}$, brzina promene potencijala: 50 mV s^{-1}

Upoređivanjem sl. 29 i sl. 31 može se pretpostaviti da ekscipijensi pokrivaju površinu elektrode i da na neki način sprečavaju stvaranje jako adsorbovanih aglomerata amlodipin-bezilata, prouzrokujući da se anodna reakcija dešava na višim koncentracijama.

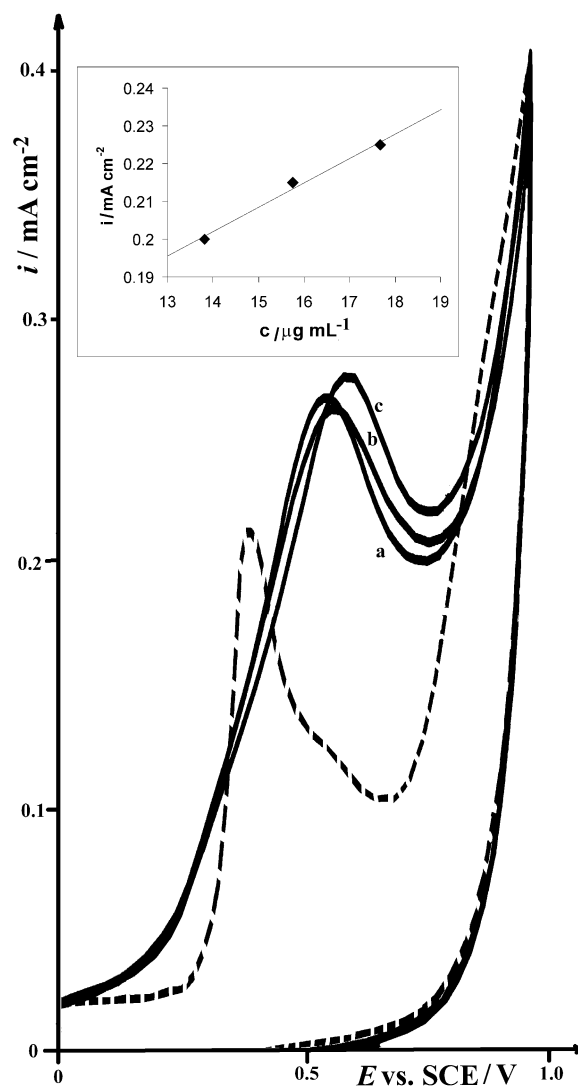
Pri višim koncentracijama na sl. 31 izgled voltamograma se stabilizuje, što se može pripisati postignutoj ravnoteži koja se odnosi na kompetitivnu adsorpciju između amlodipin-bezilata i nekog ili više prisutnih ekscipijenasa.

Prema literaturnim podacima [26-29], cikličnom i voltametrijom sa pravougaonim impulsima može se odrediti amlodipin u lekovima na najbolji način upotrebom elektrolita na pH=11, uglavnom fosfatnog pufera.

Na slikama 32 i 33 su prikazani ciklični voltamogrami amlodipin-bezilata i Alopres® tableta u fosfatnom puferu, pH=11, dobijeni bez akumulacije.



Slika 32. Ciklični voltamogram elektrode od zlata u fosfatnom puferu (pH=11) (isprekidana linija) i u prisustvu amlodipin-bezilata (puna linija) a) $13,80 \mu\text{g mL}^{-1}$, b) $17,68 \mu\text{g mL}^{-1}$, c) $19,61 \mu\text{g mL}^{-1}$, brzina promene potencijala: 50 mV s^{-1}



Slika 33. Ciklični voltamogram elektrode od zlata u fosfatnom puferu (pH=11) (isprekidana linija) i u prisustvu amlodipina u Alopres® tabletama (puna linija) a) $13,80 \mu\text{g mL}^{-1}$, b) $15,75 \mu\text{g mL}^{-1}$, c) $17,68 \mu\text{g mL}^{-1}$, brzina promene potencijala: 50 mV s^{-1}

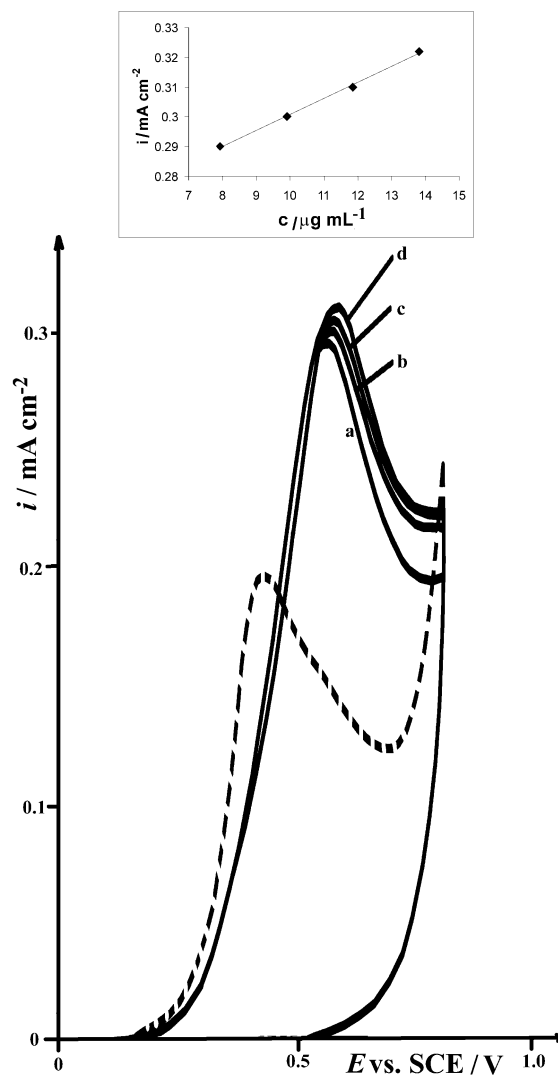
Poređenjem sa slikama 29 i 31, očigledno je da je veća anodna aktivnost dobijena na višim koncentracijama amlodipin-bezilata i amlodipina u Alopres® tabletama. U fosfatnom puferu, kao što se zapaža na slikama 32 i 33, voltamogrami imaju isti izgled i može se pretpostaviti da ekscipijensi gube kompetitivni adsorpcioni uticaj, koji je očigledan u $0,05 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaHCO}_3$.

Linearna zavisnost anodnih struja od koncentracije amlodipin-bezilata u opsegu: 13,80 – 19,61 $\mu\text{g ml}^{-1}$, koja je predstavljena u levom uglu na sl. 32, dobijena je na potencijalu 0,75 V.

Linearna zavisnost anodnih struja od koncentracije amlodipina u Alopres® tabletama u opsegu: 13,80 – 17,68 $\mu\text{g ml}^{-1}$, koja je predstavljena u levom uglu na sl. 33, dobijena je na potencijalu 0,75 V.

4.1.2. Proučavanje elektrohemijske aktivnosti amlodipin-bezilata u Alopres tabletama cikličnom i voltametrijom sa pravougaonim impulsima, sa akumulacijom

Slika 34 predstavlja ciklične voltamograme amlodipina u Alopres® tabletama u fosfatnom puferu, pH = 11, koji su dobijeni sa akumulacijom na 0,1 V tokom 220 s. Nakon akumulacije, u poređenju sa slikom 33, oksidacija amlodipina u Alopres® tabletama se dešava na višim vrednostima struja i linearna zavisnost anodnih struja od koncentracija je dobijena na potencijalu koji je za 0,15 V negativniji. To je prikazano na slici 34 za opseg koncentracija: 7,94 – 11,86 $\mu\text{g ml}^{-1}$.



Slika 34. Ciklični voltamogram elektrode od zlata u fosfatnom puferu (pH=11) (isprekidana linija) i u prisustvu amlodipina u Alopres® tabletama (puna linija) sa akumulacijom na 0,1 V nakon 220 s, a) $7,94 \mu\text{g mL}^{-1}$, b) $9,90 \mu\text{g mL}^{-1}$, c) $11,86 \mu\text{g mL}^{-1}$, brzina promene potencijala: 50 mV s^{-1}

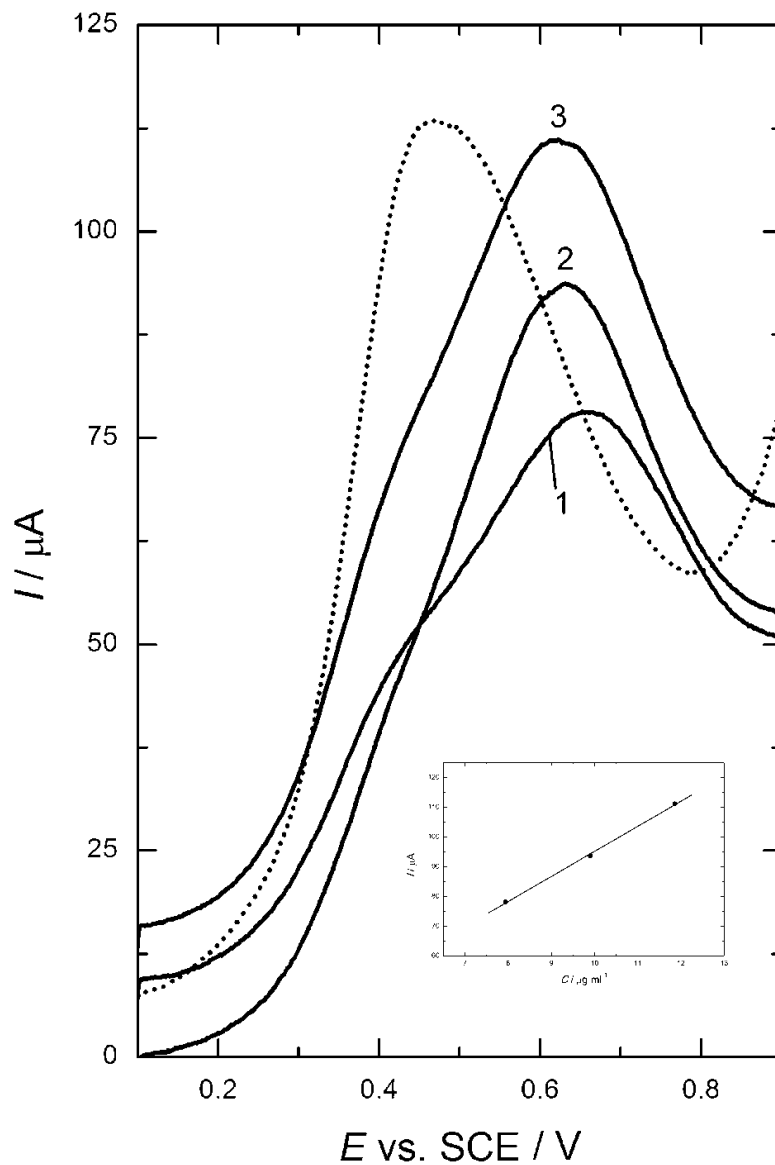
Za elektrodu od zlata, najbolja anodna aktivnost amlodipin-bezilata standarda i Alopres® tableta je dobijena u fosfatnom puferu pH=11, kao što je dobijeno za elektrodu od staklastog ugljenika. U poređenju sa rezultatima u literaturi [27] sa elektrodom od staklastog ugljenika, pod istim eksperimentalnim uslovima, na pH=11 elektroda od zlata je bolji katalizator za anodnu oksidaciju amlodipin-bezilata standarda, kao i sadržaja u

farmaceutskom preparatu Alopres® tabletama, nego elektroda od staklastog ugljenika, dajući u svim eksperimentima 50 puta veće struje.

Voltometrija sa pravougaonim impulsima je primenjena u cilju elektrohemijskog određivanja amlodipina u Alopres® tabletama na elektrodi od zlata u rastvoru fosfatnog pufera na pH=11. Voltamogrami su zabeleženi u oblasti potencijala +0,1 V i +0,9 V za različite koncentracije amlodipina u Alopres® tabletama i pre svakog skeniranja pre-koncentracioni stepen je izveden na potencijalu od +0,1 V za 220 s u cilju akumulacije amlodipin-bezilata na površini elektrode.

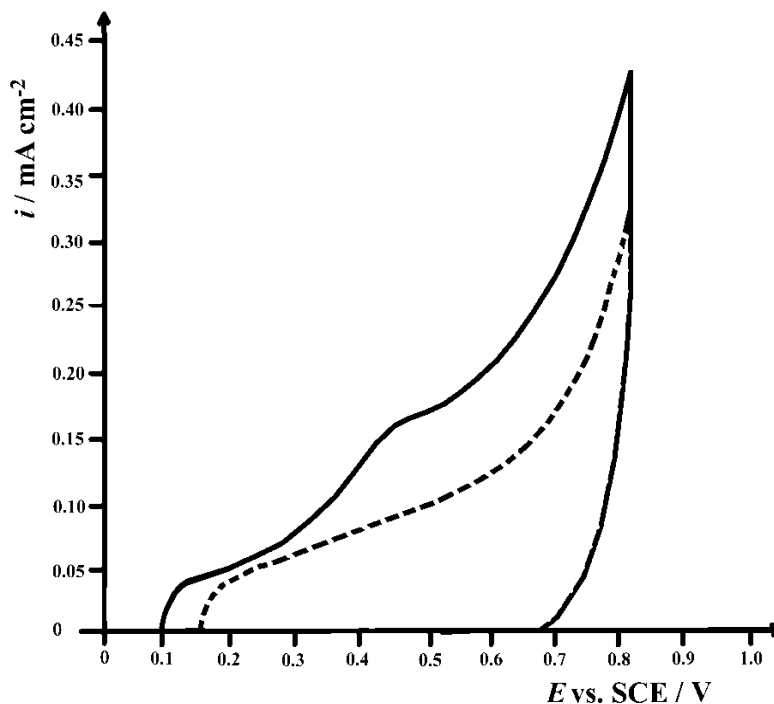
Rezultati su prikazani na slici 35. Voltamogram elektrode od zlata zabeležen u rastvoru pufera (tačkasta linija) je okarakterisan prisustvom velikog pika na +0,47 V, koji odgovara oksidaciji zlata. Dodavanjem amlodipina iz Alopres® tableta u rastvor (pune linije), ovaj pik praktično nestaje (ostaje samo mali "pregib"), ukazujući na zaustavljanje procesa razmene elektrona usled adsorpcije amlodipin-bezilata i/ili prisutnih ekscipijenasna na površinu elektrode od zlata. Svi voltamogrami dobijeni u prisustvu Alopres® tableta u rastvoru imaju novi, dobro definisani pik, koji se nalazi na približno +0,63 V što se pripisuje oksidaciji adsorbovanog molekula amlodipina. Pik anodne struje, I_p , pokazuje linearnu zavisnost od koncentracije amlodipina u Alopres® tabletama od 7,94 do 11,86 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (slika 35), prema jednačini:

$$I_p (\mu\text{A}) = 11,000 (\pm 2,754) + 8,415 (\pm 0,274) C (\mu\text{g ml}^{-1}), R = 0,9995 \quad (1)$$



Slika 35. Voltamogrami zabeleženi voltametrijom sa pravougaonim impulsima na polikristalnoj elektrodi od zlata za: (1) $7,94 \mu\text{g ml}^{-1}$ (2) $9,90 \mu\text{g ml}^{-1}$ i (3) $11,86 \mu\text{g ml}^{-1}$ amlodipina u Alopres® tabletama u rastvoru fosfatnog pufera na $\text{pH}=11$ (tačkasta linija predstavlja čistu elektrodu od zlata). Vreme akumulacije: 220 s na $E=+0,1 \text{ V}$; step size: 2 mV; pulse size: 25 mV; frekvencija: 50 Hz; scan rate: 100 mV s^{-1}

Na slici 36 je prikazana oksidacija amlodipina u Alopres® tabletama na modifikovanoj elektrodi Au/o-MWCNT u fosfatnom puferu na pH=11 ($7,94 \mu\text{g ml}^{-1}$), sa akumulacijom na 0,1 V tokom 220 s. U poređenju sa sl. 34 jasno je da je anodna aktivnost amlodipina u Alopres® tabletama mnogo niža na modifikovanoj elektrodi Au/o-MWCNT nego na elektrodi od zlata.



Slika 36. Ciklični voltamogram modifikovane elektrode Au/o-MWCNT u fosfatnom puferu (pH=11) (isprekidana linija) i u prisustvu amlodipina u Alopres® tabletama (puna linija), sa akumulacijom na 0,1 V nakon 220 s, $7,94 \mu\text{g ml}^{-1}$, brzina promene potencijala: 50 mV s^{-1}

Slika 27 jasno pokazuje da nasumično orijentisane o-MWCNT homogeno pokrivaju površinu elektrode od zlata, sa srednjim prečnikom od 100 nm (sl. 28 a). Amlodipin-bezilat na modifikovanoj elektrodi Au/o-MWCNT je takođe dobro dispergovan, ukazujući da o-MWCNT mogu dobro vezati amlodipin za površinu i sprečiti njegovu oksidaciju. Ovo objašnjava bolju elektrokatalitičku aktivnost elektrode od zlata koja je pokrivena malim aglomeratima amlodipina.

Voltometrija sa pravougaonim impulsima je primenjena i na modifikovanoj elektrodi Au/o-MWCNT pod istim eksperimentalnim uslovima i veoma mala anodna aktivnost amlodipina u Alopres® tabletama je dobijena, kao što je pokazano cikličnom voltametrijom na slici 36. U literaturi [29] je publikovana anodna oksidacija amlodipin-bezilata na elektrodi od staklastog ugljenika modifikovanoj sa o-MWCNT u fiziološkom rastvoru. Rezultati jasno pokazuju da je elektroda od staklastog ugljenika modifikovana sa o-MWCNT bolji katalizator od elektrode od zlata modifikovane sa o-MWCNT za oksidaciju standarda amlodipin-bezilata kao i njegovog sadržaja u farmaceutskom preparatu.

4.2. Ispitivanje forsirane (ubrzane) degradacije amlodipin-bezilata primenom tečne hromatografije i tečne hromatografije – masene spektrometrije

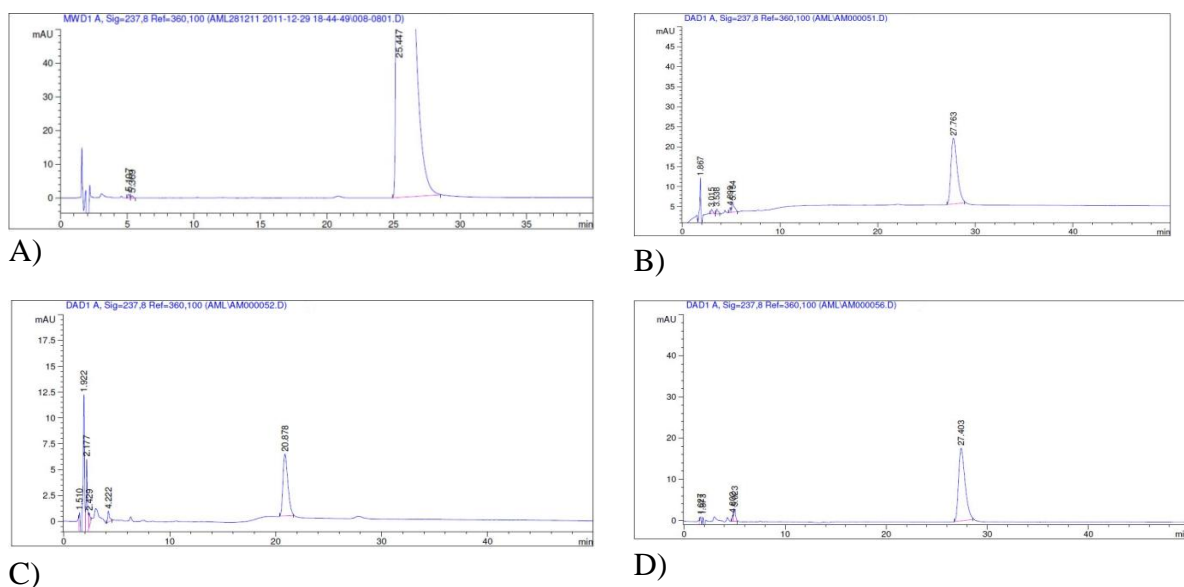
Amlodipin-bezilata je oficinalan i njegova monografija se može naći u evropskoj [7], američkoj [63] i britanskoj [64] farmakopeji. U drugom delu naših ispitivanja cilj rada je bio da se ispituju degradacioni proizvodi amlodipin-bezilata pod različitim uslovima stresa, uključujući i elektrohemijisku degradaciju.

U preliminarnom eksperimentu, ispitivanje ubrzane degradacije amlodipin-bezilata je sprovedeno u uslovima alkalne hidrolize, hemijske oksidacije, fotodegradacije i degradacije u $0,05 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaHCO}_3$ u cilju postizanja totalne degradacije amlodipin-bezilata. Takođe je ispitivana elektrohemijiska degradacija amlodipin-bezilata.

Rezultati ispitivanja alkalne hidrolize u $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ rastvoru NaOH na sobnoj temperaturi tokom 4 h su pokazali da je amlodipin-bezilata stabilan u primenjenim uslovima ispitivanja. Nije bilo promene u hromatogramu amlodipin-bezilata (sl. 37A). Hromatogram uzorka koji je podvrgnut degradaciji u alkalnoj sredini u $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ NaOH na $80 \text{ }^\circ\text{C}$ tokom 6 h pokazuje pikove degradacionih proizvoda na retencionom vremenu (RT) 3,015 min, (RT) 3,538 min, (RT) 4,899 min i (RT) 5,154 min (sl. 37B). U ovim uslovima degradacija amlodipin-bezilata je bila 42 %. Kada je alkalna hidroliza izvedena u 5 mol dm^{-3} NaOH na $80 \text{ }^\circ\text{C}$ tokom 6 h, postignuta je potpuna degradacija amlodipin-bezilata, a glavni

degradacioni proizvod je sa retencionim vremenom (RT) 20,878 min (sl. 37C). Degradacija molekula se pripisuje alkalnoj hidrolizi acetil grupa molekula amlodipina [114].

Degradacijom amlodipin-bezilata u $0,05 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaHCO}_3$ na sobnoj temperaturi tokom 5 h postignuto je 4,2% degradacije, u poređenju sa sveže pripremljenim rastvorom amlodipin-bezilata. Kada je amlodipin-bezilat podvrgnut degradaciji u $0,05 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaHCO}_3$ na $80 \text{ }^\circ\text{C}$ tokom 5 h, postignut je stepen degradacije amlodipin-bezilata od 30,7%. Hromatogram (sl. 37D) pokazuje da nastaju jedinjenja sa retencionim vremenom (RT) 4,802 min i (RT) 5,023 min.

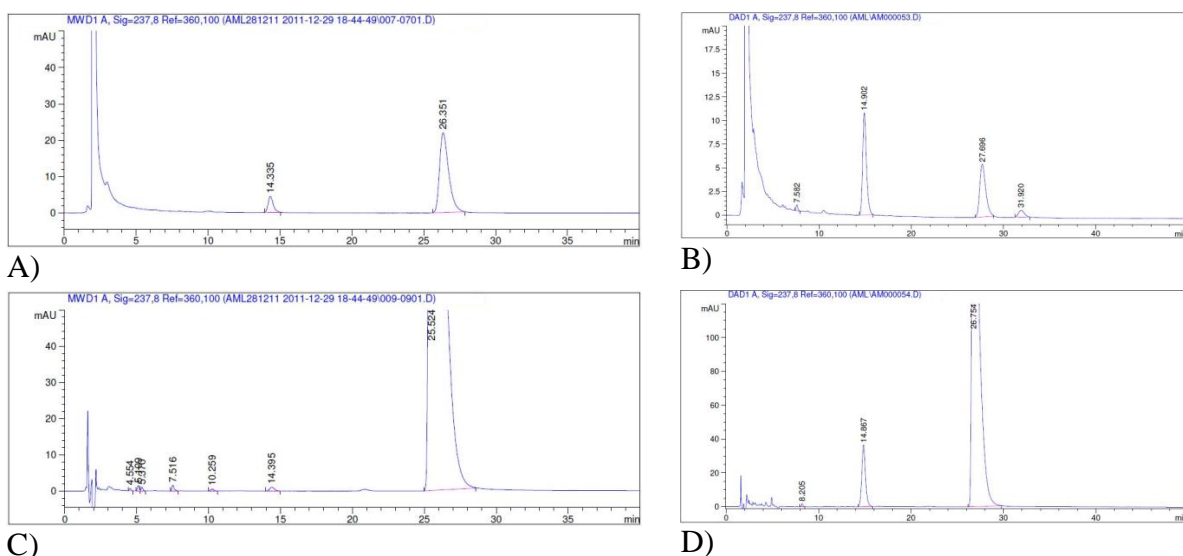


Slika 37. A) hromatogram amlodipin-bezilata (AMB); B) hromatogram degradacije u alkalnoj sredini ($0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaOH}$) AMB na 80°C za 6 h; C) hromatogram degradacije u alkalnoj sredini ($5 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaOH}$) AMB na 80°C za 6 h; D) hromatogram degradacije u alkalnoj sredini ($0,05 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaHCO}_3$) AMB na 80°C za 5 h

Rezultati oksidativne degradacije ($3\% \text{ H}_2\text{O}_2$) amlodipin-bezilata na sobnoj temperaturi tokom 24 h pokazuju degradaciju amlodipin-bezilata od 5,3% sa jednim degradacionim proizvodom na retencionom vremenu (RT) 14,337 min. Oksidativnom degradacijom amlodipin-bezilata u rastvoru $3\% \text{ H}_2\text{O}_2$ -metanol 80:20 (v/v) na $80 \text{ }^\circ\text{C}$ za 2 h dobijen je jedan degradacioni proizvod na retencionom vremenu (RT) 14,335 min (sl. 38A), dok je oksidativna degradacija ($3\% \text{ H}_2\text{O}_2$ -metanol 80:20, v/v) na $80 \text{ }^\circ\text{C}$ za 6 h

pokazala da nastaju tri degradaciona proizvoda, sa retencionim vremenom (RT) 7,582 min, (RT) 14,902 min i (RT) 31,920 min (sl. 38B). Degradacija amlodipin-bezilata je povećana od 25,9% na 80,1%.

U hromatogramu fotodegradacije amlodipin-bezilata na UV 366 nm za 2 h pojavljuju se pikovi tri degradaciona proizvoda na retencionom vremenu (RT) 7,516 min, (RT) 10,259 min i (RT) 14,395 min (sl. 38C), dok hromatogram fotodegradacije amlodipin-bezilata prema ICH smernici za ispitivanje fotostabilnosti tokom 14 dana pokazuje pikove dva degradaciona proizvoda sa retencionim vremenom (RT) 8,205 min i (RT) 14,867 min (sl. 38D).



Slika 38. A) hromatogram oksidativne degradacije (3% H₂O₂ - metanol=80:20, v/v) AMB na 80°C za 2 h; B) hromatogram oksidativne degradacije (3% H₂O₂ - metanol=80:20, v/v) AMB na 80°C za 6; C) hromatogram fotodegradacije (UV 366 nm) AMB za 2 h; D) hromatogram fotodegradacije (prema ICH smernici) AMB u periodu od 14 dana

Sprovedenim ispitivanjima je pokazano da je amlodipin-bezilata stabilan u uslovima alkalne hidrolize u 0,1 mol dm⁻³ NaOH na sobnoj temperaturi tokom 4 h, dok je podložan degradaciji u 0,05 mol dm⁻³ NaHCO₃ kao i oksidativnoj i fotodegradaciji.

Amlodipin-bezilat u rastvoru je pokazao degradaciju od 32,2% nakon 14 dana izlaganja u komori za fotostabilnost i 14,1% degradacije na UV 366 nm za 2 h.

Prema literaturnim podacima [120] postignuta je degradacija amlodipina od 25%, 10% i 70% u "stres" uslovima tokom kisele, neutralne i bazne hidrolize, i 80% degradacije u uslovima oksidativnog stresa.

Pored ispitivanja proizvoda forsirane degradacije amlodipin-bezilata primenom metode tačne hromatografije (HPLC), sprovedeno je takođe ispitivanje primenom LC-MS tehnike. Primenom metode LC-MS ispitivani su degradacioni proizvodi amlodipin-bezilata dobijeni tokom alkalne, kisele, oksidativne i elektrohemijske degradacije, kao što je opisano u eksperimentalnom delu. Elektrohemijska degradacija amlodipin-bezilata je izvedena u $0,05 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaHCO}_3$.

Tabela 2 pokazuje rezultate LC-MS analize tokom degradacije amlodipin-bezilata u alkalnoj sredini ($5 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaOH}$) na 80°C za 6 h. Forsirana degradacija u alkalnim uslovima potvrdila je potpunu degradaciju amlodipin-bezilata, a jedinjenje na (RT) 19,41 min molekulske formule $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{NOCl}$ je nađeno kao glavni degradacioni proizvod. Molarne mase, nađene vrednosti m/z jona i predložene molekulske formule svih potencijalnih degradacionih proizvoda amlodipin-bezilata su date u tabelama 2–5.

Tabela 2. Rezultati LC-MS analize dobijeni alkalnom degradacijom amlodipin-bezilata
(5 mol dm⁻³ NaOH) na 80 °C za 6 h

R.br.	t _R (min)	Izmerene molarne mase i izmerene mase m/z jona	Molekulska formula*
1	1,976	348,0823; 349,0895, 100 % (351,0851, 30 %); 719,1593, 100 % (721,1577, 30 %) + 406,1296; 407,1369, 100 % (409,11351, 30 %)	C ₁₁ H ₂₁ O ₁₀ Cl ili C ₁₂ H ₁₇ N ₄ O ₆ Cl + C ₂₀ H ₂₃ N ₂ O ₅ Cl ili C ₂₅ H ₂₃ O ₃ Cl
2	5,703	472,2546; 473,2619	C ₂₁ H ₃₆ N ₄ O ₈ (tr)
3	7,461	414,2125; 415,2198 + 394,1149; 395,1222 + 378,1408; 379,1480	C ₂₃ H ₃₀ N ₂ O ₅ (tr) + C ₂₁ H ₁₈ N ₂ O ₆ (tr) + C ₁₈ H ₂₂ N ₂ O ₇ (tr)
4	8,835	278,1491; 279,1563; 301,1384; 317,1142	C ₁₆ H ₂₂ O ₄ (tr)
5	15,425	246,2170; 247,2238; 264,2509; 269,2065	C ₁₄ H ₃₀ O ₃ (tr)
6	17,372	290,2436; 291,2507; 308,2772; 313,2332	C ₁₆ H ₃₄ O ₄ (tr)
7	19,418	261,0900; 262,0973, 100 % (264,0948, 30 %)	C ₁₅ H ₁₆ NOCl
8	25,078	408,1435; 409,1504, 100 % (411,1480, 30 %); 431,1328, 100 % (433,1313, 30 %)	C ₂₀ H ₂₅ N ₂ O ₅ Cl (Amlodipin) (tr)

* Identifikacija amlodipina je izvedena upotrebom standarda. Za ostala jedinjenja, predložena molekulska formula je određena na osnovu precizno izmerenih masa.
(tr) – Tragovi; jedinjenja su detektovana masenom spektrometrijom.

U tabeli 3 su dati rezultati LC-MS analize dobijeni elektrohemijском degradacijom amlodipin-bezilata cikličnom voltametrijom (0,05 mol dm⁻³ NaHCO₃) tokom 9 h na elektrodi od zlata. Elektrohemijski eksperiment je ukazao na degradaciju jer se nakon 9 sati

cikliziranja početak oksidacije amlodipina pomerio za 200 mV ka negativnijim potencijalima, u odnosu na početak cikliziranja.

Tabela 3. Rezultati LC-MS analize kod elektrohemijske degradacije amlodipin-bezilata cikličnom voltametrijom ($0,05 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaHCO}_3$) za 9 h na elektrodi od zlata

R.br.	t_R (min)	Izmerene molarne mase i izmerene mase m/z jona	Molekulska formula*
1	7,521	394,1146; 395,1219 + 414,2132; 415,2196 + 378,1408; 379,1481	$\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6$ + $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5$ + $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_7$
2	8,893	278,1494; 279,1566; 301,1387; 317,1138	$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4$ (tr)
3	14,511	406,1274; 407,1347, 100 % (409,1333, 30 %); 429,1172, 100 % (431,1175, 30 %)	$\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_5\text{Cl}$ (tr)
4	15,480	246,2175; 247,2242; 264,2514; 269,2071	$\text{C}_{14}\text{H}_{30}\text{O}_3$ (tr)
5	17,430	290,2441; 291,2511; 308,2778; 313,2337; 329,2108 + 348,2971; 349,3044 + 335,3014; 336,3086	$\text{C}_{16}\text{H}_{34}\text{O}_4$ (tr) + $\text{C}_{18}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_4$ (tr) + $\text{C}_{19}\text{H}_{37}\text{N}_5$ (tr)
6	19,858	334,2700; 335,2759; 352,3040; 357,2592	$\text{C}_{18}\text{H}_{38}\text{O}_5$ (tr)
7	25,078	408,1429; 409,1500, 100 % (411,1477, 30 %); 431,1323, 100 % (433,1305, 30 %); 447,1064, 100 % (449,1081, 30 %)	$\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_5\text{Cl}$ (Amlodipin)

* Identifikacija amlodipina je izvedena upotrebom standarda. Za ostala jedinjenja, predložena molekulska formula je određena na osnovu precizno izmerenih masa.
(tr) – Tragovi; jedinjenja su detektovana masenom spektrometrijom.

Na osnovu rezultata tečne hromatografije može se zaključiti da je postignuta degradacija amlodipin-bezilata od 66,5%. Tri degradaciona proizvoda su nađena na (t_R) 7,521 min sa predloženim formulama $C_{21}H_{18}N_2O_6$, $C_{23}H_{30}N_2O_5$ i $C_{18}H_{22}N_2O_7$.

Rezultati LC-MS analize kod degradacije amlodipin-bezilata u kiseloj sredini (5 mol dm^{-3} HCl) na 80°C za 6 h su prikazani u tabeli 4. U uslovima degradacije u kiseloj sredini, postignuto je 75,2% degradacije amlodipin-bezilata (prema rezultatima tečne hromatografije). Nađeno je da degradacioni proizvod molekulske formule $C_{18}H_{35}NO$ na (RT) 26,84 min nastaje u značajnoj količini.

Tabela 4. Rezultati LC-MS analize dobijeni degradacijom amlodipin-bezilata pod uticajem kiseline (5 mol dm^{-3} HCl) na 80 °C za 6 h

R.br.	t_R (min)	Izmerene molarne mase i izmerene mase m/z jona	Molekulska formula*
1	5,683	455,2278; 456,2397; 473,2616 + 351,1200; 352,1272, 100 % (354,1125, 30 %); 374,1095, 100 % (376,1046, 30 %); 390,0830, 100 % (392,0822, 30 %); 725,2321, 100 % (727,2326, 30 %);	$C_{21}H_{33}N_3O_8$ + $C_{18}H_{22}NO_4Cl$ ili $C_{13}H_{22}N_3O_6Cl$
2	6,648	391,1263; 392,1333, 100 % (394,1311, 30 %); 414,1159, 100 % (416,1149, 30 %); 430,0911, 100 % (432,0893, 30 %)	$C_{19}H_{22}N_3O_7Cl$ (tr)
3	7,070	389,0968; 390,1042, 100 % (392,1030, 30 %); 412,0866, 100 % (414,0851, 30 %); 428,0594, 100 % (430,0579, 30 %); 801,1903, 100 % (803,1884, 30 %);	$C_{15}H_{20}N_3O_7Cl$
4	7,452	414,2121; 415,2194 + 394,1143; 395,1216	$C_{23}H_{30}N_2O_5$ + $C_{21}H_{18}N_2O_6$ ili $C_{16}H_{18}N_4O_8$

		+	+
		378,1405; 379,1478	$C_{18}H_{22}N_2O_7$
5	8,824	278,1492; 279,1564; 301,1382; 317,1139	$C_{16}H_{22}O_4$
6	13,736	406,1274; 407,1346, 100 % (409,1328, 30 %); 429,1172, 100 % (431,1153, 30 %); 445,0905, 100 % (447,0906, 30 %); 835,2488, 100 % (837,2469, 30 %)	$C_{20}H_{23}N_2O_5Cl$ + $C_{18}H_{20}NO_3Cl$ ili $C_{13}H_{20}N_3O_5Cl$
		+	
		333,1110; 334,1184, 100 % (336,1161, 30 %); 356,1009, 100 % (358,0981, 30 %)	
7	15,367	246,2176; 247,2245; 264,2516; 269,2067	$C_{14}H_{30}O_3$ (tr)
8	17,310	290,2442; 291,2510; 308,2781; 313,2335; 329,2098	$C_{16}H_{34}O_4$ ili $C_{17}H_{30}N_4$
9	19,397	261,0899; 262,0972, 100 % (264,2516, 30 %);	$C_{15}H_{16}NOCl$ (tr)
10	22,271	348,1227; 349,1300; 371,1115	$C_{19}H_{16}N_4O_3$ ili $C_{18}H_{20}O_7$ ili $C_{24}H_{16}N_2O$ (tr)
11	24,868	408,1429; 409,1499, 100 % (411,1480, 30 %); 431,1323, 100 % (433,1306, 30 %); 447,1064, 100 % (449,1085, 30 %)	$C_{20}H_{25}N_2O_5Cl$ (Amlodipin)
12	26,840	281,2701; 282,2770; 299,3031; 304,2599; 563,5500	$C_{18}H_{35}NO$

* Identifikacija amlodipina je izvedena upotrebom standarda. Za ostala jedinjenja, predložena molekulska formula je određena na osnovu precizno izmerenih masa.
(tr) – Tragovi; jedinjenja su detektovana masenom spektrometrijom.

U tabeli 5 su prikazani rezultati LC-MS analize kod oksidativne degradacije amlodipin-bezilata (3% H_2O_2 -metanol 80:20, v/v) na 80°C za 6 h.

Tabela 5. Rezultati LC-MS analize kod oksidativne degradacije amlodipin-bezilata
(3% H₂O₂-metanol 80:20, v/v) na 80 °C za 6 h

R.br.	t _R (min)	Izmerene molarne mase i izmerene mase <i>m/z</i> jona	Molekulska formula*
1	4,275	444,2202; 445,2275	C ₁₉ H ₃₂ N ₄ O ₈
2	5,706	472,2556; 473,2628	C ₂₁ H ₃₆ N ₄ O ₈
3	7,464	414,2130; 415,2203 + 394,1154; 395,1227 + 378,1411; 379,1484	C ₂₃ H ₃₀ N ₂ O ₅ + C ₂₁ H ₁₈ N ₂ O ₆ ili C ₁₆ H ₁₈ N ₄ O ₈ + C ₁₈ H ₂₂ N ₂ O ₇
4	8,843	278,1496; 279,1568; 301,1390; 317,1138	C ₁₆ H ₂₂ O ₄ ili C ₁₇ H ₁₈ N ₄
5	13,564	406,1271; 407,1343, 100 % (409,1328, 30 %); 429,1172, 100 % (431,1155, 30 %); 445,0909, 100 % (447,0932, 30 %)	C ₂₀ H ₂₃ N ₂ O ₅ Cl
6	17,282	290,2437; 291,2507; 308,2777; 313,2328; 329,2084	C ₁₆ H ₃₄ O ₄ ili C ₁₇ H ₃₀ N ₄
7	21,600	255,2543; 256,2615; 273,2879; 278,2434; 294,2168; 511,5183; 533,5006	C ₁₆ H ₃₃ NO
8	24,725	408,1431; 409,1496, 100 % (411,1475, 30 %); 431,1327, 100 % (433,1301, 30 %)	C ₂₀ H ₂₅ N ₂ O ₅ Cl (Amlodipin)
9	26,988	281,2701; 282,2770; 299,3031; 304,2599; 563,5500	C ₁₈ H ₃₅ NO

* Identifikacija amlodipina je izvedena upotrebom standarda. Za ostala jedinjenja, predložena molekulska formula je određena na osnovu precizno izmerenih masa.
(tr) – Tragovi; jedinjenja su detektovana masenom spektrometrijom.

Ispitivanje forsirane degradacije amlodipin-bezilata u oksidativnim uslovima je pokazalo da nastaje jedinjenje molekulske formule $C_{18}H_{35}NO$, kao kod degradacije u kiseloj sredini, na retencionom vremenu (RT) 26,94 min. Masenom spektrometrijom je potvrđeno prisustvo jedinjenja molekulske formule $C_{20}H_{23}N_2O_5Cl$ koja odgovara dehidro derivatu amlodipina [7, 63, 163]. Ovo jedinjenje je jedan od proizvoda forsirane degradacije u uslovima oksidacije i degradacije u kiseloj sredini, dok je kod elektrohemijske degradacije nađeno u tragovima.

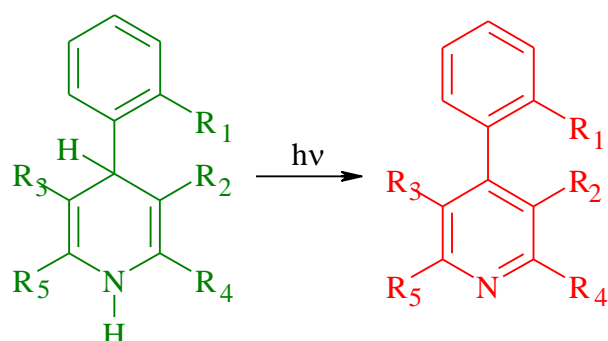
4.3. Elektrohemijsko ispitivanje inkluzionih kompleksa nifedipina i amlodipina sa β -ciklodekstrinom i (2-hidroksipropil)- β -ciklodekstrinom

Elektrohemijsko ponašanje inkluzionih kompleksa nifedipina (Nif) i amlodipina (Aml), blokatora kalcijumovih kanala dihidropiridinske (DHP) klase sa β -ciklodekstrinom (β CD) i (2-hidroksipropil)- β -ciklodekstrinom (HP β CD) je ispitano cikličnom i voltametrijom sa pravougaonim impulsima u $0,05 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaHCO}_3$ i fosfatnom puferu (pH=11) na elektrodi od zlata. Voltamogrami pokazuju jedan ireverzibilni anodni talas sa strujom koja je kontrolisana adsorpcijom. Nađeno je da fosfatni pufer favorizuje elektrohemijsku aktivnost oba kompleksa nifedipina sa linearnom zavisnošću oksidativnih struja od koncentracija.

U fosfatnom puferu, samo HP β CD-Aml kompleks pokazuje linearnu zavisnost oksidativnih struja od koncentracije. U $0,05 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaHCO}_3$ kao elektrolitu samo HP β CD-Nif pokazuje značajnu aktivnost. Vrednost početnog potencijala anodne reakcije kao i vrednost potencijala maksimalnih anodnih struja za sve ispitivane komplekse u oba elektrolita su pomereni ka pozitivnijim vrednostima u poređenju sa njihovim standardima. Dodatno, vrednost anodnih struja opada.

1,4-dihidropiridinski antagonisti kalcijumovih kanala su podložni degradaciji pod uticajem svetlosti. Oksidativna aromatizacija dihidropiridinskog dela molekula do piridinskog derivata je glavni način degradacije amlodipina i drugih molekula 1,4-dihidropiridinske klase (kao što je nifedipin) i odigrava se kako u rastvoru tako i u čvrstom stanju pod uticajem svetlosti (slika 39) [16, 112-114]. Ovi lekovi imaju intenzivnu

apsorbiciju u UV-A oblasti (neki i u vidljivoj oblasti) i poznato je da su fotonestabilni [110, 112, 164-166]. Kada se amlodipin i amlodipin-bezilat podvrgnu zračenju u rastvoru, u prisustvu ili bez prisustva vazduha, nađeno je da nastaje aromatizovani piridin kao glavni degradacioni proizvod [110, 111]. Kada je nifedipin izložen uticaju dnevnog svetla ili nekim talasnim dužinama veštačkog svetla nastaje nitrozofenil piridinski derivat, dok pod uticajem UV svetla nastaje nitrofenil piridinski derivat [8, 129-131].

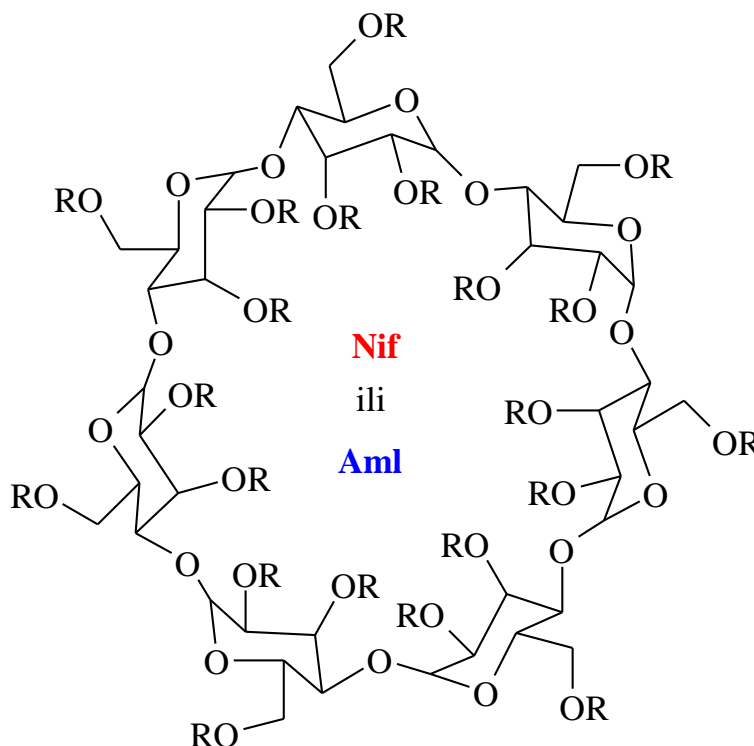


Slika 39. Oksidativna degradacija 1,4-dihidropiridina do piridinskog derivata pod uticajem svetlosti – amlodipin ($R_1=Cl$; $R_2=COOMe$; $R_3=COOEt$; $R_4=CH_2OCH_2CH_2NH_2$; $R_5=Me$), nifedipin ($R_1=NO_2$; $R_2,R_3=COOMe$; $R_4,R_5=Me$).

Fotodegradacioni proizvodi amlodipina i nifedipina nemaju farmakološku aktivnost pa je zaštita ovih molekula od fotodegradacije veoma važna. U tu svrhu se koriste različiti protektivni agensi. Više različitih formulacija uključujući ciklodekstrine, liposome i mikrosfere je dobijeno i opisano u literaturi [150-154]. Različiti organski molekuli se mogu inkapsulirati u šupljinu ciklodekstrina, stvarajući tzv. inkluzione komplekse. Među prirodnim ciklodekstrinima, α -, β - i γ -ciklodekstrini koji se sastoje od 6, 7 i 8 D-glukopiranoznih jedinica se najčešće koriste. Molekuli glukoze su povezani α -1,4-glikozidnim vezama tako da stvaraju ciklične strukture [141, 142].

Inkluzioni kompleksi (slika 40) nifedipina sa β -ciklodekstrinom (β CD-Nif) [143] ili (2-hidroksipropil)- β -ciklodekstrinom (HP β CD-Nif) i amlodipin-bezilata sa β -ciklodekstrinom (β CD-Aml) ili (2-hidroksipropil)- β -ciklodekstrinom (HP β CD-Aml) [146] su pripremljeni u čvrstom stanju koprecipitacijom u molarnom odnosu 1:1 i okarakterisani

primenom spektroskopskih metoda FTIR, $^1\text{H-NMR}$ i XRD. Stvaranjem inkluzionih kompleksa sa ciklodekstrinima poboljšavaju se fizička svojstva molekula kao što su rastvorljivost, oslobađanje, fotoosetljivost i stabilnost [143, 146, 150, 167-170].

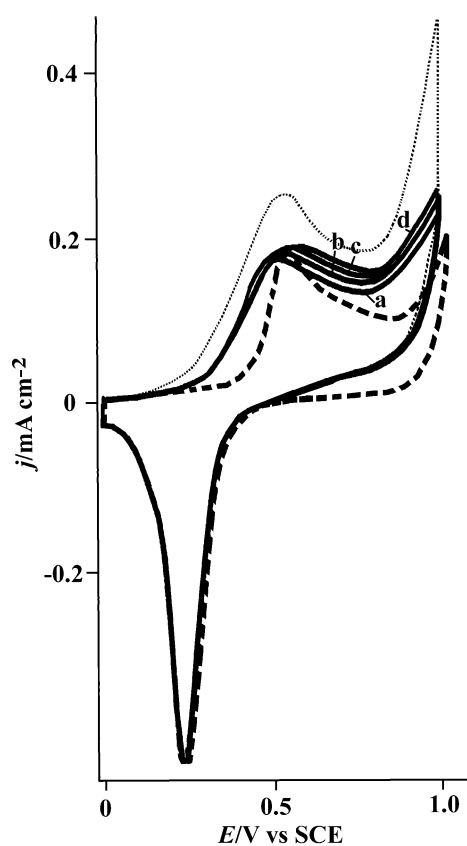


Slika 40. Struktura β -ciklodekstrina (βCD) ($\text{R}=\text{H}$) i (2-hidroksipropil)- β -ciklodekstrina (HP βCD) ($\text{R}=\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{OH})\text{CH}_3$); **Nif** = nifedipin, **Aml** = amlodipin

Oksidativno ponašanje inkluzionih kompleksa HP βCD -Aml, βCD -Aml, HP βCD -Nif i βCD -Nif je ispitivano na isti način kao kod određivanja amlodipin standarda [161]. Sve ispitivane koncentracije amlodipin-bezilata i nifedipina u rastvoru inkluzionih kompleksa su proveravane HPLC metodom.

4.3.1. Ciklična voltimetrija i voltimetrija sa pravougaonim impulsima kompleksa ciklodekstrina sa nifedipinom u fosfatnom puferu

Ciklični voltamogrami β CD-Nif prikazani na slici 41 u fosfatnom puferu (pH=11) pokazuju da u anodnom pravcu elektrooksidacija nifedipina počinje na 0,25 V sa tendencijom povećanja do postizanja maksimuma struje na početku formiranja oksida na elektrodi od zlata. Maksimalna vrednost struje se pojavljuje u celoj oblasti stvaranja oksida sa blagim povećanjem od 0,9 V do 1,0 V. U katodnom pravcu prisustvo β CD-Nif dovodi do manjih struja redukcije oksida koje se pripisuju redukciji vrsta oksidovanih u anodnom pravcu.



Slika 41. Ciklični voltamogram elektrode od zlata u fosfatnom puferu (pH=11) (isprekidana linija) i u prisustvu β CD-Nif. Koncentracije nifedipina: a) $2,24 \mu\text{g ml}^{-1}$, b) $3,35 \mu\text{g ml}^{-1}$, c) $4,44 \mu\text{g ml}^{-1}$, d) $5,53 \mu\text{g ml}^{-1}$, sweep: 50 mV s^{-1} ; nifedipin standard $2,7 \mu\text{g ml}^{-1}$ (tačkasta linija)

Linearna zavisnost anodnih struja od koncentracije nifedipina u β CD-Nif u opsegu koncentracija: 2,24 – 5,53 $\mu\text{g ml}^{-1}$ dobijena je na 0,77 V na osnovu podataka sa sl. 41.

Navedena linearna zavisnost odgovara jednačini 1 datoj u tabeli 6 [171].

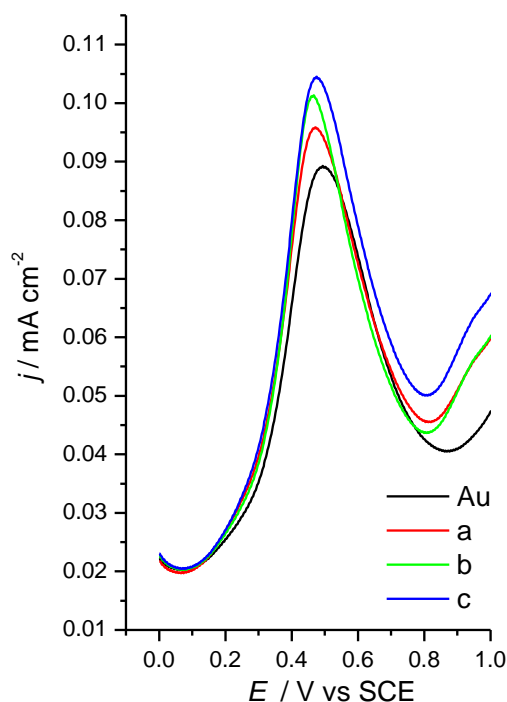
Tabela 6. Linearna zavisnost anodnih struja od koncentracije nifedipina i amlodipina u ispitivanim kompleksima

Br.	Kompleks	Pufer	Metoda	Jednačina, $j/\text{mA cm}^{-2}=f(C/\mu\text{g ml}^{-1})$	R
1	βN^{a}	Ph^{d}	CV	$j=0,1226 (\pm 0,0025)+0,0098 (\pm 0,0006) C$	0,9962
2	βN	Ph	SWV	$j=0,0876 (\pm 0,0003) + 0,0019 (\pm 0,00004) C$	0,9998
3	HN^{b}	Ph	CV	$j=0,1453 (\pm 0,0018)+0,0258 (\pm 0,0006) C$	0,9996
4	HN	Ph	SWV	$j=0,0727 (\pm 0,0039) + 0,0069 (\pm 0,0014) C$	0,9802
5	HN	SBC^{e}	CV	$j=0,0782 (\pm 0,0021)+0,0333 (\pm 0,0011) C$	0,9995
6	HN	SBC	SWV	$j=0,0706 (\pm 0,0004)+0,0021 (\pm 0,0001) C$	0,9986
7	HA^{c}	Ph	CV	$j=0,0679 (\pm 0,0030)+0,0132 (\pm 0,0004) C$	0,9994
8	HA	Ph	SWV	$j=0,0353 (\pm 0,0008)+0,0006 (\pm 0,00006) C$	0,9885

^a β CD-Nif; ^b HP β CD-Nif; ^c HP β CD-Aml; ^d fosfatni pufer; ^e 0,05 mol dm⁻³ NaHCO₃

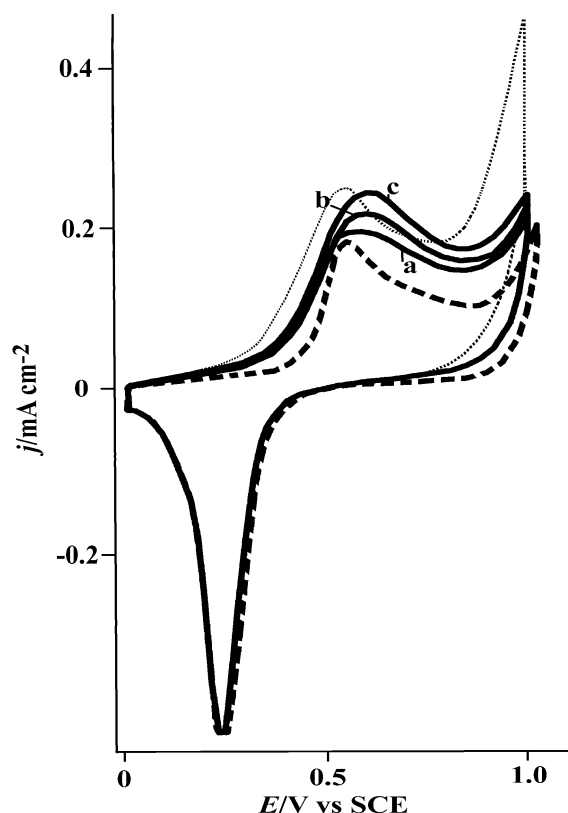
Voltometrija sa pravougaonim impulsima je brza, osetljiva tehnika sa niskom granicom detekcije koja je korišćena za određivanje nifedipina u β CD-Nif na elektrodi od zlata. Voltamogrami dobijeni voltametrijom sa pravougaonim impulsima za različite koncentracije nifedipina u β CD-Nif, u fosfatnom puferu u oblasti potencijala od 0 do 1,0 V sa brzinom skeniranja od 15 mV s⁻¹ su prikazani na slici 42. Pre svakog skeniranja, jedinjenje se akumulira na površini elektrode na 0,1 V tokom 180 s. Svaki voltamogram je okarakterisan dobro definisanim pikom na približno 0,45 V koji se pripisuje oksidaciji

adsorbovanog inkluzionog kompleksa. Struja anodnog "stripping" pika pokazuje linearnu zavisnost od koncentracije β CD-Nif. Linearna zavisnost anodnih struja od koncentracije nifedipina u β CD-Nif u opsegu: $4,44 - 8,72 \mu\text{g ml}^{-1}$ je dobijena na osnovu podataka sa slike 42. Linearna zavisnost je data jednačinom 2 u tabeli 6.



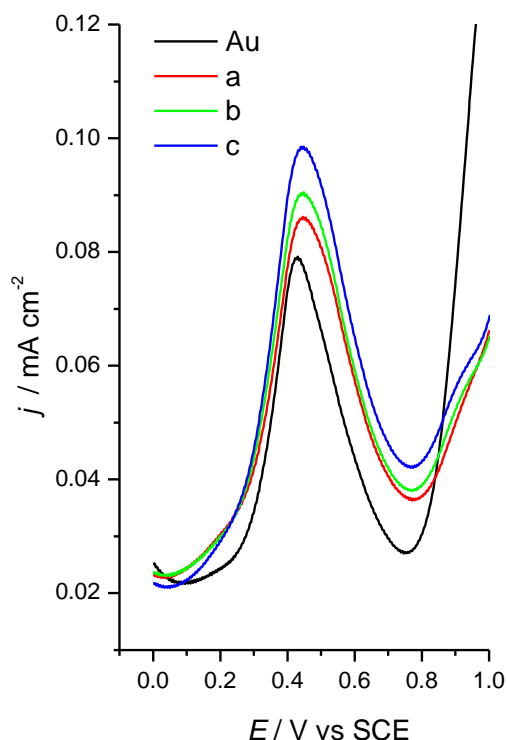
Slika 42. Voltamogrami dobijeni voltametrijom sa pravougaonim impulsima elektrode od zlata u fosfatnom puferu ($\text{pH}=11$) i u prisustvu β CD-Nif. Koncentracije nifedipina: a) $4,44 \mu\text{g ml}^{-1}$, b) $6,66 \mu\text{g ml}^{-1}$, c) $8,72 \mu\text{g ml}^{-1}$. Vreme akumulacije: 220 s na $E=0,1 \text{ V}$; step size 2 mV , pulse size 20 mV , frekvencija 8 Hz , scan rate 15 mV s^{-1} .

Ciklični voltamogrami HP β CD-Nif prikazani na slici 43 u fosfatnom puferu ($\text{pH}=11$) pokazuju isto elektrohemijsko ponašanje kao što je zapaženo za β CD-Nif (sl. 41). Linearna zavisnost anodnih struja od koncentracije nifedipina u HP β CD-Nif u opsegu: $1,82 - 3,60 \mu\text{g ml}^{-1}$ je dobijena na $0,65 \text{ V}$ na osnovu podataka sa sl. 43. Linearnoj zavisnosti odgovara jednačina 3 (tabela 6).



Slika 43. Ciklični voltamogram elektrode od zlata u fosfatnom puferu (pH=11) (isprekidana linija) i u prisustvu HP β CD-Nif. Koncentracije nifedipina: a) 1,82 $\mu\text{g ml}^{-1}$, b) 2,71 $\mu\text{g ml}^{-1}$, c) 3,60 $\mu\text{g ml}^{-1}$, sweep: 50 mV s^{-1} ; nifedipin standard 2,7 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (tačkasta linija).

Kvantitativno određivanje nifedipina u HP β CD-Nif na elektrodi od zlata je takođe izvedeno voltametrijom sa pravougaonim impulsima (SWV). Voltometrija sa pravougaonim impulsima HP β CD-Nif je pokazala slično ponašanje kao kod β CD-Nif pod istim eksperimentalnim uslovima. Rezultati su prikazani na slici 44. Ponovo, svaki voltamogram je okarakterisan dobro definisanim pikom na približno 0,45 V koji se pripisuje oksidaciji adsorbovanog inkluzionog kompleksa. Struja anodnog "stripping" pika pokazuje linearnu zavisnost od koncentracije HP β CD-Nif u opsegu: 1,82 – 3,60 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Navedena linearna zavisnost odgovara jednačini 4 (tabela 6).

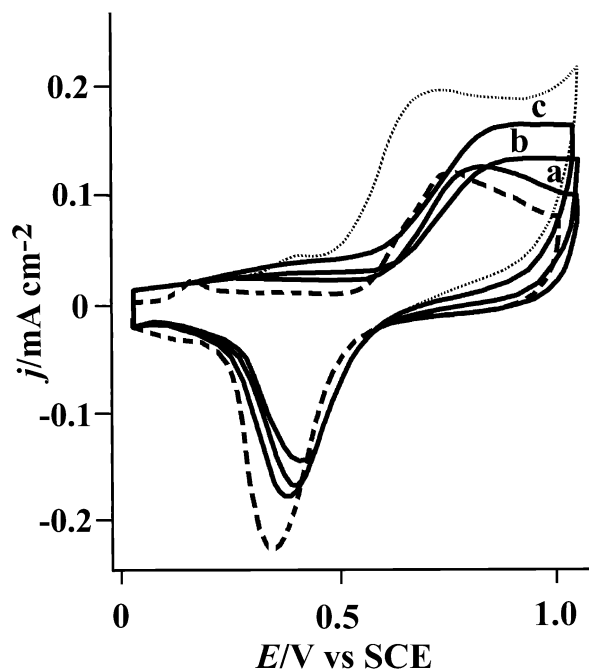


Slika 44. Voltamogrami dobijeni voltametrijom sa pravougaonim impulsima elektrode od zlata u fosfatnom puferu (pH=11) i u prisustvu HP β CD-Nif. Koncentracije nifedipina: a) 1,82 $\mu\text{g ml}^{-1}$, b) 2,71 $\mu\text{g ml}^{-1}$, c) 3,60 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Vreme akumulacije: 180 s na $E = 0,1$ V; step size 2 mV, pulse size 20 mV, frekvencija 8 Hz, scan rate: 15 mV s^{-1} .

4.3.2. Ciklična voltametrija i voltametrija sa pravougaonim impulsima kompleksa ciklodekstrina sa nifedipinom u 0,05 mol dm^{-3} NaHCO_3

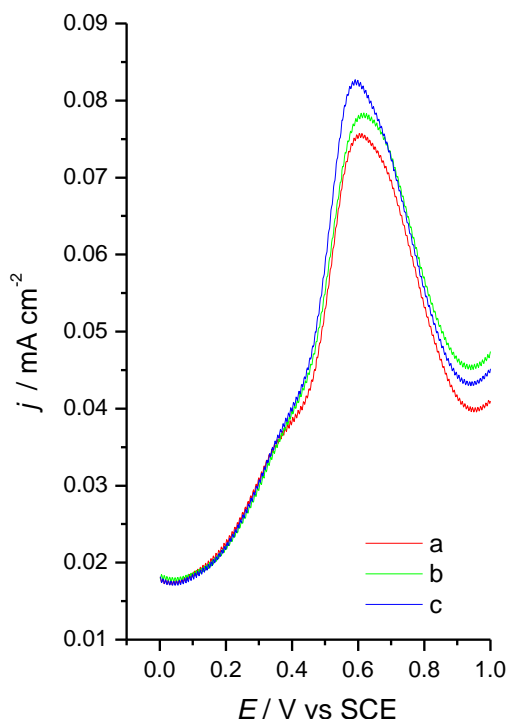
Iako je ranije pokazano [161] da je fosfatni pufer pogodniji za anodnu oksidaciju dihidropiridinske klase lekova, ispitivan je 0,05 mol dm^{-3} NaHCO_3 kao elektrolit. Svi ispitivani inkluzioni kompleksi pokazuju znatno nižu elektrohemijsku aktivnost nego u fosfatnom puferu. Niža aktivnost, ali dobra linearna zavisnost struja od koncentracija je zapažena samo u slučaju kompleksa HP β CD-Nif. Linearna zavisnost anodnih struja od koncentracija se pojavljuje na 300 mV pozitivnijem potencijalu nego u slučaju fosfatnog

pufera (sl. 43 i sl. 45). Linearna zavisnost u opsegu: $0,91 - 2,71 \mu\text{g ml}^{-1}$ dobijena na $0,95 \text{ V}$ na osnovu podataka sa slike 45 je data u tabeli 6 jednačinom 5.



Slika 45. Ciklični voltamogram elektrode od zlata u $0,05 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaHCO}_3$ (isprekidana linija) i u prisustvu $\text{HP}\beta\text{CD-Nif}$ (puna linija). Koncentracije nifedipina: a) $0,91 \mu\text{g ml}^{-1}$, b) $1,82 \mu\text{g ml}^{-1}$, c) $2,71 \mu\text{g ml}^{-1}$, sweep: 50 mV s^{-1} ; nifedipin standard $2,7 \mu\text{g ml}^{-1}$ (tačkasta linija).

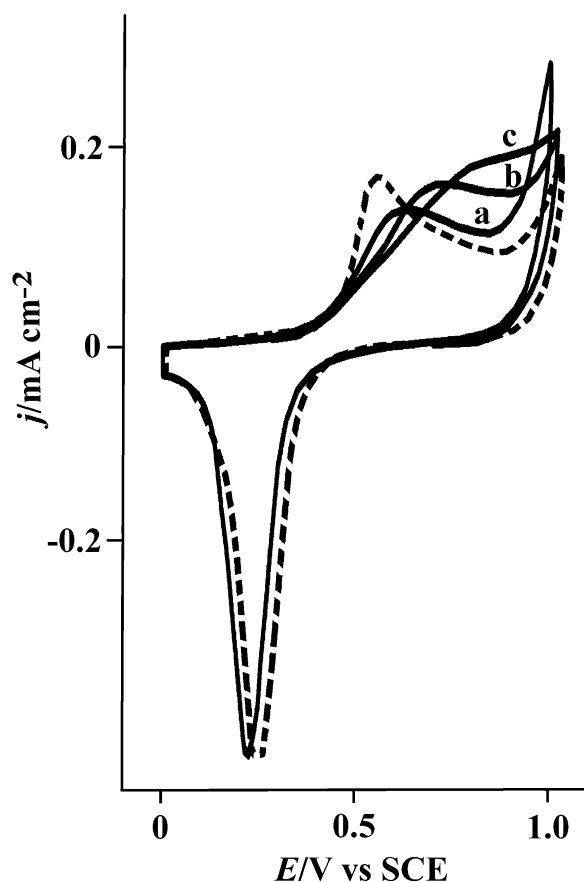
Voltametrijom sa pravougaonim impulsima takođe je pokazana manja elektrohemijska aktivnost nifedipina u $\text{HP}\beta\text{CD-Nif}$ u $0,05 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaHCO}_3$ (manje anodne struje) (sl. 46) nego u fosfatnom puferu (sl. 44). Svaki voltamogram je okarakterisan dobro definisanim pikom na približno $0,6 \text{ V}$ koji je za više od 100 mV pomeren ka pozitivnijem potencijalu u poređenju sa fosfatnim puferom. Linearna zavisnost struja od koncentracije nifedipina u $\text{HP}\beta\text{CD-Nif}$ u opsegu: $0,91 - 2,71 \mu\text{g ml}^{-1}$, je data jednačinom 6 (tabela 6).



Slika 46. Voltamogrami dobijeni voltametrijom sa pravougaonim impulsima elektrode od zlata u $0,05 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaHCO}_3$ i u prisustvu HP β CD-Nif. Koncentracije nifedipina: a) $0,91 \mu\text{g ml}^{-1}$, b) $1,82 \mu\text{g ml}^{-1}$, c) $2,71 \mu\text{g ml}^{-1}$. Vreme akumulacije: 180 s na $E = 0,1 \text{ V}$; step size 2 mV , pulse size 20 mV , frekvencija 8 Hz , scan rate: 15 mV s^{-1} .

4.3.3. Ciklična voltometrija i voltometrija sa pravougaonim impulsima kompleksa ciklodekstrina sa amlodipinom u fosfatnom puferu

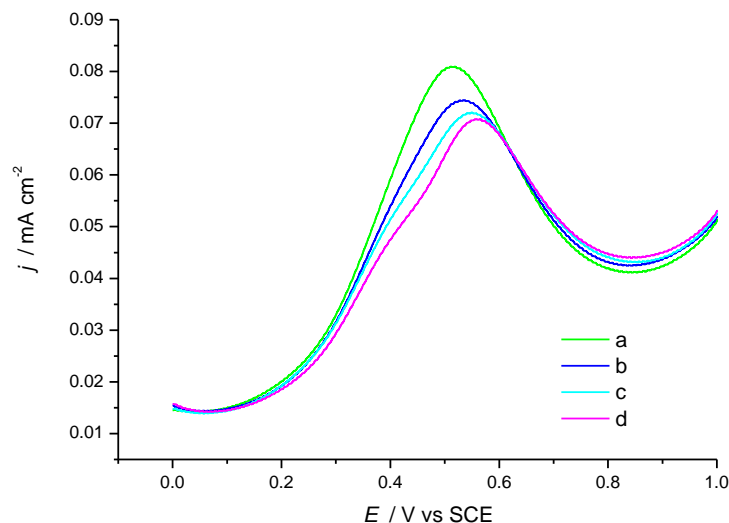
U inkluzionim kompleksima amlodipin pokazuje mnogo manju elektrohemijisku aktivnost u oba elektrolita u poređenju sa kompleksima nifedipina. Samo je HP β CD-Aml u fosfatnom puferu pokazao očiglednu elektrohemijisku aktivnost koja je prikazana na slici 47. Ciklični voltamogrami pokazuju povećanje anodne aktivnosti u celoj oblasti stvaranja oksida na elektrodi od zlata sa linearnom zavisnošću od koncentracija na $0,85 \text{ V}$. Linearna zavisnost struja od koncentracije amlodipina u HP β CD-Aml u opsegu: $3,26 - 9,58 \mu\text{g ml}^{-1}$ je predstavljena jednačinom 7 (tabela 6).



Slika 47. Ciklični voltamogram elektrode od zlata u fosfatnom puferu (pH=11) (isprekidana linija) i u prisustvu HP β CD-Aml. Koncentracije amlodipina: a) 3,26 $\mu\text{g ml}^{-1}$, b) 6,45 $\mu\text{g ml}^{-1}$, c) 9,58 $\mu\text{g ml}^{-1}$, sweep: 50 mV s^{-1}

Voltametrijom sa pravougaonim impulsima je pokazana značajna elektrohemijska aktivnost amlodipina u kompleksu HP β CD-Aml u fosfatnom puferu (sl. 48). Kao što ciklični voltamogrami pokazuju, linearna zavisnost je zabeležena na 0,85 V. Linearna zavisnost u opsegu: 9,58 – 14,17 $\mu\text{g ml}^{-1}$ je data jednačinom 8 (tabela 6).

Sve koncentracije nifedipina i amlodipina u ispitivanim kompleksima (pomoću CV i SWV) kao što je prikazano u tabeli 6 su potvrđene HPLC metodom.



Slika 48. Voltamogrami dobijeni voltametrijom sa pravougaonim impulsima elektrode od zlata u fosfatnom puferu (pH=11) i u prisustvu HP β CD-Aml. Amlodipin koncentracije: a) 9,58 $\mu\text{g ml}^{-1}$, b) 11,13 $\mu\text{g ml}^{-1}$, c) 12,65 $\mu\text{g ml}^{-1}$, d) 14,17 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Vreme akumulacije: 180 s na $E = 0,1 \text{ V}$; step size 2 mV, pulse size 20 mV, frekvencija 8 Hz, scan rate 15 mV/s.

Karakterizacija ciklohekstrinskih (CD) sistema elektrohemijским metodama, uglavnom cikličnom voltametrijom je opisana u literaturi [172-175] sa mišljenjem da prisustvo CD u rastvoru elektrolita prouzrokuje smanjenje vrha struje i takođe pomeranje u polu-talasnom potencijalu u cikličnoj voltametrijom.

Upoređivanjem sa elektrohemijским ponašanjem amlodipin [161] i nifedipin standarda pod identičnim eksperimentalnim uslovima primećeno je, za sve ispitivane komplekse, da formiranje kompleksa prouzrokuje dve glavne izmene u cikličnim voltamogramima u oba elektrolita. Npr. ovo je pokazano upoređivanjem kompleksa HP β CD-Nif (puna linija) i nifedipin standarda (tačkasta linija) (sl. 43 i sl. 45). Prvo, vrednost početnog potencijala anodne reakcije kao i vrednost potencijala maksimalnih anodnih struja je pomerena ka pozitivnijim vrednostima. Drugo, vrednost anodnih struja inkluzionih kompleksa je smanjena u poređenju sa anodnim strujama njihovih standarda.

Ove izmene u svim inkluzionim kompleksima [172-175] se pripisuju formiranju inkluzionih kompleksa i u slučaju prikazanom na sl. 45, kompleksu HP β CD-Nif.

Izmena početnog potencijala ukazuje na to da se molekuli amlodipina i nifedipina teže oksiduju kada se nalaze u inkluzionom kompleksu. Na primer, u slučaju indapamida i njegovog kompleksa sa β -ciklodekstrinom anodni pik je takođe pomeren ka pozitivnijim vrednostima potencijala u poređenju sa indapamidom, a anodne struje opadaju [176]. Isti efekat (pomeranje potencijala ka negativnijim vrednostima tokom elektoredukcije i opadanje struja) je zapažen kod inkluzionog kompleksa β -ciklodekstrina i furnidipina [177]. Smanjenje u elektrohemijском odgovoru je takođe primećeno tokom in vivo procene dejstva kontrolisanog oslobađanja medijator- β -ciklodekstrin kompleksa na mikrobiološku isporuku [178].

Upoređivanjem hemijskih struktura amlodipina i nifedipina, očigledno je da prisustvo NO₂ grupe sa jakim hidrofobnim uticajem (koeficijent hidrofobnosti, $\pi = -0,85$) [179] značajno smanjuje ukupne hidrofobne karakteristike nifedipina. S druge strane, prisustvo Cl grupe kao supstituenta ($\pi = + 0,36$) [179] povećava hidrofobna svojstva amlodipina. Važno je naglasiti da je doprinos hidrofobnog uticaja na stabilnost kompleksa lek/CD očigledan i značajan, ali da varira u zavisnosti od strukture leka [180]. Ove činjenice su u saglasnosti sa eksperimentalnim podacima da je kompleks HP β CD-Aml podložniji elektrohemijскоj adsorpciji i akumulaciji.

5. ZAKLJUČAK

1. Prvi put do sada proučavana je elektrohemijaska karakterizacija amlodipin-bezilata cikličnom voltametrijom na elektrodi od zlata u $0,05 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaHCO}_3$ i u fosfatnom puferu (pH=11) kao elektrolitima. Amlodipin-bezilata elektrohemijaski je ispitan kao čista supstanca i u komercijalnom proizvodu Alopres® tabletama. U $0,05 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaHCO}_3$ kao elektrolitu, bez akumulacije, dobijena je linearna zavisnost anodnih struja od koncentracija u opsegu od $1,50 - 3,38 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ za amlodipin-bezilata (na potencijalu $0,75 \text{ V}$) i od $4,0 - 11,5 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ za Alopres® tablete (na potencijalu $0,75 \text{ V}$). U fosfatnom puferu (pH=11) kao elektrolitu, dobijena je linearna zavisnost anodnih struja od koncentracije na potencijalu $0,75 \text{ V}$ u opsegu od $13,80 - 19,61 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ za amlodipin-bezilata i u opsegu od $13,80 - 17,68 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ za Alopres® tablete, bez akumulacije.

2. Cikličnom voltametrijom u fosfatnom puferu (pH=11) sa akumulacijom na $0,1 \text{ V}$ tokom 220 s oksidacija amlodipina u Alopres® tabletama se odigrava na višim vrednostima struja, i linearna zavisnost anodnih struja od koncentracija u opsegu $7,94 - 11,86 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ je dobijena na potencijalu koji je za $0,15 \text{ V}$ negativniji, u odnosu na proučavanje fenomena bez akumulacije. Voltametrijom sa pravougaonim impulsima određen je amlodipin-bezilata u Alopres® tabletama, u fosfatnom puferu (pH=11) i dobijena je linearna zavisnost anodnih struja od koncentracije amlodipina u opsegu od $7,94 - 11,86 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$.

3. Oksidacija amlodipina u Alopres® tabletama ispitivana je i na modifikovanoj elektrodi Au/o-MWCNT u fosfatnom puferu na pH=11 ($7,94 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$), sa akumulacijom na $0,1 \text{ V}$ tokom 220 s . Anodna aktivnost amlodipina u Alopres® tabletama mnogo je niža na modifikovanoj elektrodi Au/o-MWCNT nego na elektrodi od zlata. U poređenju sa elektrodom od staklastog ugljenika, pod istim eksperimentalnim uslovima, na pH=11 elektroda od zlata je bolji katalizator za anodnu oksidaciju amlodipin-bezilata standarda, kao i njegovog sadržaja u Alopres® tabletama dajući 50 puta veće struje.

4. AFM tehnikom dobijeni su podaci o izgledu površine amlodipin/Au i površine amlodipin/Au/o-MWCNT. Pokazano je da mali aglomerati amlodipin-bezilata pokrivaju elektrodu od zlata i uz to su kompaktni i uniformno raspoređeni sa prosečnim prečnikom

200 nm. Takođe je pokazano da nasumično orijentisane o-MWCNT homogeno pokrivaju celu površinu elektrode od zlata sa srednjim prečnikom od 100 nm. Amlodipin-bezilata na Au/o-MWCNT je dobro dispergovan, ukazujući da o-MWCNT mogu dobro vezati amlodipin za površinu i sprečiti njegovu oksidaciju što objašnjava bolju elektrokatalitičku aktivnost elektrode od zlata koja je pokrivena malim aglomeratima amlodipina.

5. Proučavani su degradacioni proizvodi amlodipin-bezilata u uslovima forsirane degradacije primenom izokratske RP-HPLC metode. Osnovni rastvori amlodipin-bezilata su podvrgnuti kiseloj i alkalnoj hidrolizi, hemijskoj i fotodegradaciji kao i elektrohemijskoj degradaciji u rastvoru $0,05 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaHCO}_3$ na elektrodi od zlata.

6. Potpuna degradacija amlodipin-bezilata je postignuta u $5 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaOH}$ na 80°C za 6 sati, a jedinjenje molekulske formule $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{NOCl}$ je identifikovano kao glavni degradacioni proizvod. Pod uticajem kiseline ($5 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HCl}$) na 80°C za 6 sati postignuto je 75,2% degradacije amlodipin-bezilata. U uslovima oksidativnog stresa u rastvoru 3% H_2O_2 -metanol (80:20, v/v) na 80°C tokom 6 sati postignuta je degradacija amlodipin-bezilata od 80,1%. Nakon 14 dana izlaganja rastvora amlodipin-bezilata fotodegradaciji u komori za fotostabilnost postignuta je degradacija od 32,2%. Masenom spektrometrijom potvrđeno je prisustvo dehidro derivata amlodipina molekulske formule $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_5\text{Cl}$ kao proizvoda forsirane degradacije u uslovima oksidacije i degradacije u kiseloj sredini.

7. Kod elektrohemijske degradacije, posle 9 sati cikliziranja, početak oksidacije amlodipina se pomerio za 200 mV ka negativnijim potencijalima, u odnosu na početak cikliziranja, pri čemu je ukupni efekat degradacije od 66,5%. Pri elektrohemijskoj degradaciji amlodipina dehidro derivat je nađen u tragovima.

8. Elektrohemijski su proučavani inkluzioni kompleksi amlodipina i nifedipina sa ciklodekstrinima: β -ciklodekstrin-amlodipin ($\beta\text{CD-Aml}$), β -ciklodekstrin-nifedipin ($\beta\text{CD-Nif}$), (2-hidroksipropil)- β -ciklodekstrin-amlodipin ($\text{HP}\beta\text{CD-Aml}$) i (2-hidroksipropil)- β -ciklodekstrin-nifedipin ($\text{HP}\beta\text{CD-Nif}$).

9. Cikličnom voltametrijom i voltametrijom sa pravougaonim impulsima u fosfatnom puferu i u $0,05 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaHCO}_3$ na elektrodi od zlata pokazano je da fosfatni pufer favorizuje elektrohemijsku aktivnost inkluzionih kompleksa nifedipina i nađena je značajna

elektrohemijska aktivnost i linearna zavisnost anodnih struja od koncentracija β CD-Nif i HP β CD-Nif. Inkluzioni kompleksi sa nifedipinom u $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ NaHCO₃ kao elektrolitu, pokazuju mnogo nižu elektrohemijsku aktivnost nego u fosfatnom puferu.

10. U fosfatnom puferu samo inkluzioni kompleks HP β CD-Aml pokazuje značajnu elektrohemijsku aktivnost, kao i linearnu zavisnost anodnih struja od koncentracija.

11. Pokazano je da kompleksiranje sa amlodipinom i nifedipinom u svim slučajevima prouzrokuje promene u vrednostima struje i potencijala dobijene cikličnom voltametrijom u poređenju sa njihovim standardima. Prvo, vrednost početnog potencijala anodne reakcije kao i vrednost potencijala maksimalnih anodnih struja je pomerena ka pozitivnijim vrednostima. Drugo, vrednost anodnih struja inkluzionih kompleksa je smanjena u poređenju sa anodnim strujama njihovih standarda.

12. Uočeni efekti ukazuju da su inkluzioni kompleksi uspešno formirani jer amlodipin i nifedipin inkorporirani u komplekse teže podležu elektrohemijskoj oksidaciji dajući manje vrednosti anodnih struja.

6. LITERATURA

- [1] J.M. Beale Jr., J.H. Block, *Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*, 12th ed. (2011) 622-627, Lippincott Williams & Wilkins
- [2] H.P. Rang, M.M. Dale, J.M. Ritter, P.K. Moore, *Pharmacology*, 5th ed. (2003) 264-284, Elsevier Science Limited (1. srpsko izd., Data status, 2005, Beograd)
- [3] J.G. Hardman, L.E Limbird, A.G. Gilman (ed.) *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th ed. (2001) The McGraw-Hill Companies, Inc.
- [4] P.A. van Zweiten, J.C. van Meel, *Prog. Pharmacol.* 5:1 (1982)
- [5] T.B. Bolton, *Physiol. Rev.* 59 (1979) 606-718
- [6] M. Berridge, *Nature* 361 (1993) 315-325
- [7] European Pharmacopoeia EP 7th ed. (2012) <http://online6.edqm.eu/ep706> [accessed January 16, 2013]
- [8] S.C. Sweetman (ed.) *Martindale The Complete Drug Reference*, 35th ed. (2007) Pharmaceutical Press
- [9] R. Rodenkirchen, R. Bayer, R. Steiner, F. Bossert, H. Meyer, E. Möller: Naunyn Schmiedebergs, *Arch. Pharmacol.* 310 (1979) 69-78
- [10] D.J. Triggle, *Calcium antagonists. In: Antonuccio, P. N. (ed.). Cardiovascular Pharmacology*, 3rd ed. New York, Raven Press (1990)
- [11] www.pharmacy-and-drugs.com
- [12] J. Lukša, Dj. Josić, M. Kremser, Z. Kopitar, S. Milutinović, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 703 (1-2) (1997) 185–193. [doi:10.1016/S0378-4347\(97\)00394-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(97)00394-0). [PMID 9448075](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9448075/)
- [13] www.wikipedia.org
- [14] USPI Norvasc: Highlights of Prescribing Information, October 2011, www.pfizer.com/products [accessed 29 August 2012]
- [15] <http://newport.thomson-pharma.com/newport/Product/profile> [accessed 7 July 2012]

- [16] G. Ananchenko, J. Novaković, J. Lewis, *Amlodipine besylate, Profiles Drug Subs. Excip. Related. Methodol.* 37 (2012) 31-77
- [17] P.A. Meredith, H.L. Elliott, *Clin. Pharmacokinet.* 22 (1992) 22-31
- [18] D.A. Stopher, A.P. Beresford, P.V. Macrae, M.J. Humphrey, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 12 (Suppl.7) (1988) S55-S59
- [19] C.M.A. Brett, A.M.O. Brett, *Electrochemistry, Principles, Methods and Applications* (1993) (reprinted 2005) Oxford University Press
- [20] A. Scoog, D.M. West, F.J. Holler, *Analytical Chemistry* (1991) Saunders College Publishing
- [21] A. Despić, *Elektrohemijske tehnike i tehnologije*, Srpska akademija nauka i umetnosti (2005) Beograd
- [22] <http://www.files.chem.vt.edu/chem-ed/echem/linsweep.html>, updated 04/05/2013 11:49:40
- [23] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, 2nd ed. (2000) Wiley-VCH
- [24] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, 2nd ed. (2001) John Wiley & Sons, Inc.
- [25] A. Despić, *Elektrohemijska*, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva (2003) Beograd
- [26] G. Altiokka, D. Dogrukol-Ak, M.Tuncel, H.Y. Aboul-Enein, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 2 (2002) 104
- [27] A.A. K. Gazy, *Talanta*, 62 (2004) 575
- [28] M. Kazemipour, M. Ansari, A. Mohammadi, H. Beitollahi, R. Ahmadi, *J. Anal. Chem.* 64 (2009) 65
- [29] R. N. Goyal, S. Bishnoi, *Bioelectrochemistry*, 79 (2010) 234
- [30] V. K. Gupta, R. Jain, K. Radhapyari, N. Jadon, S. Agarwal, *Anal. Biochem.* (2010) doi: 10.1016/j.ab.2010.09.027
- [31] P. Tompe, N.A. Halbauerne, *Acta Pharm. Hung.* 60(4) (1990) 130-142
- [32] L.J. Nunez-Vergara, S. Bollo, J. Fuentealba, J.C. Sturm, J.A. Squella, *Pharm. Res.* 19(4) (2002) 522-529
- [33] Z. Senturk, S.A. Ozkan, Y. Ozkan, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 16 (1998) 801-807
- [34] N.A. El-Maali, *Bioelectrochemistry*, 64 (2004) 99-107

- [35] N.Ozaltin, C. Yardimci, I. Suslu, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002) 573-582
- [36] M.M. Ghoneim, A. Tawfik, P.Y. Khashaba, *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (3) (2003) 369-375
- [37] R.E. Ardrey, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction* (2003) John Wiley & Sons Ltd., The Atrium, Southern Gate, Chichester, England
- [38] Wilfried M.A. Niessen, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, 3rd ed. (2006) CRC Press Taylor & Francis Group, LLC
- [39] S. Lindsay, *High Performance Liquid Chromatography* (1992) ACOL Series, Wiley, Chichester, UK
- [40] K. Robards, P. R. Haddad, P. E. Jackson, *Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods* (1994) Academic Press, London
- [41] V. R. Meyer, *Practical High Performance Liquid Chromatography* (1994) Wiley, Chichester, UK
- [42] K. Sridhar, C.S.P. Sastry, M.N. Reddy, D.G. Sankar, K.R. Srinivas, *Anal. Lett.* 30 (1997) 121
- [43] P.N. Dhabale, K.B. Burade, A.H. Hosmani, I.D. Gonjari, S.U. Rakesh, P.R. Patil, *Arch. Pharm. Sci. Res.* 1 (2009) 158
- [44] N. Rahman, M. Singh, Md. N. Hoda, *Il Farmaco*, 59 (11) (2004) 913-919
- [45] N. Rahman, S.N.H. Azmi, *Acta Biochim. Pol.* 52(4) (2005) 915-922
- [46] N. Rahman, S.N.H. Azmi, *Science Asia*, 32 (2006) 429-435
- [47] B. Hemmateenejad, R. Miri, R. Kamali, *J. Iran. Chem. Soc.* 6(1) (2009) 113-120
- [48] N. Hamidi, T.W. Wong, M.N. Taib, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 3(5) (2011) 410-417
- [49] O.S. Shelke, K.S. Sable, V.S. Neharkar, B.V. Mathdevru, *Int. Res. J. Pharm.* 3(4) (2012) 360-364
- [50] S.A. Aderibigbe, O.A. Adegoke, O.S. Idowu, *International Journal of Industrial Chemistry (IJIC)* 3:5 (2012) 2-8
- [51] H.M. Abdel-Wadood, N.A. Mohamed, A.M. Mahmoud, *Spectrochim. Acta, Part A* 70 (2008) 564
- [52] S.M. Al-Ghannam, A.M. Al-Olyan, *Cent. Eur. J. Chem.* 6(2) (2008) 222-228
- [53] B. Uslu, S.A. Ozkan, *Anal. Lett.* 44(16) (2011) 2644-2702

- [54] J.A. Squella, E. Barnafi, S. Perna, L.J. Nunez-Vergara, *Talanta*, 36(3) (1989) 363-366
- [55] M.M. Hefnawy, M. Sultan, H. Al-Johar, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 32 (2009) 2923
- [56] J. Zhang, J. Konecny, Z. Glatz, J. Hoogmartens, A. Van Schepdael, *Curr. Anal. Chem.* 3(3) (2007) 197-217(21)
- [57] N.T. Nguyen, R.W. Siegler, *J. Chromatogr., A* 735(1-2) (1996) 123-150
- [58] V.B. Patravale, V.B. Nair, S.P. Gore, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23 (2000) 623-627
- [59] A.Y. Kamble, M.V. Mahadik, L.D. Khatal, S.R. Dhaneshwar, *Anal. Lett.* 43 (2010) 251
- [60] N.R. Vekariya, M.B. Patel, G.F. Patel, R.B. Dholakiya, *Pharm. Anal.* 1 (2009) 259
- [61] A. Sharma, B. Patel, R. Patel, *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* 1 (2010) 339
- [62] S.J. Varghese, T.K. Ravi, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 34 (2011) 981-994
- [63] United States Pharmacopoeia USP 35th ed. (2012) [accessed March 08, 2013] (str. 2185 amlodipin-bezilat, str. 4050 nifedipin)
- [64] British Pharmacopoeia BP Volume I & II (2012) Updated available at <http://www.pharmacopoeia.co.uk/bp2012updated> [accessed February 04, 2013]
- [65] H.D. Leite, Maria Ines R. M. Santoro, Joao M.A. Porto, P.L. Garcia, M.M. de Almeida, V. F. Tavares, Erika R.M. Kedor-Hackmann, *Latin American Journal of Pharmacy*, 30(3) (2011) 527-533
- [66] A. Sharma, M. Tailang, B. Gupta, A. Acharya, *Asian Journal of Research in Chemistry*, 3(1) (2010) 129-131
- [67] S.U. Rakesh, P.R. Patil, P.N. Dhabale, K.B. Burade, *International Journal of Chemical Sciences*, 7(4) (2009) 2756-2762
- [68] A.B. Baranda, O. Berasaluce, R.M. Jimenez, R.M. Alonso, *Chromatographia*, 61(9/10) (2005) 447-453
- [69] S.K. Acharjya, M. Mathrusri Annapurna, S. Koya, *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* 1(4) (2010) 161-170
- [70] A. Jena, M. Madhu, S. Latha, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 1(11) (2010) 100-106

- [71] D.A. Shah, K.K. Bhatt, M.B. Shankar, R.S. Mehta, T.R. Gandhi, S.L. Baldania, *Indian J. Pharm. Sci.* 68(6) (2006) 796-799
- [72] M.V. Kumudhavalli, K. Anand Babu, B. Jayakar, *International Research Journal of Pharmacy*, 2(6) (2011) 144-147
- [73] C. Saravanan, S. Srinivasan, V.B. Narayanaswamy, S. Suresh, T. Sivakumar, *Int. J. Ph. Sci.* 2(3) (2010) 822-826 (<http://www.ijps.info>)
- [74] P.S. Patil, H.N. More, S.A. Pishwkar, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 3(3) (2011) 146-149 (<http://www.ijppsjournal.com>)
- [75] C. Parthiban, R.M. Bhagavan, M. Sudhakar, K.D. Sathis, K.V. Aneesa, *International Journal of Pharm Tech Research*, 3(1) (2011) 32-36
- [76] M. Sudhakar, R.J. Venkateshwara, G.S. Devika, P.T. Ramesh, *International Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 1(2) (2010) 28-33
- [77] A.B. Baranda, R.M. Jimenez, R.M. Alonso, *J. Chromatogr., A* 1031(1-2) (2004) 275
- [78] M. Josefsson, B. Norlander, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15(2) (1996) 267
- [79] M. Josefsson, A.L. Zackrisson, B. Norlander, *J. Chromatogr., B: Biomedical Applications*, 672(2) (1995) 310
- [80] S. Nalwade, V.R. Reddy, D.D. Rao, I.K. Rao, *Sci. Pharm.* 79 (2011) 69-84 (doi:10.3797/scipharm.1006-10)
- [81] Q. Zou, Y. Zhan, Z. Ge, P. Wei, P. Ouyang, *Arzneim. Forsch.* 59(8) (2009) 383-391
- [82] J.C. Pico, G. Dominquez, A.L. Negri, J.C. Caubet, N.A. Terragno, *Arzneim. Forsch.* 58(7) (2008) 323-327
- [83] J. Bhatt, S. Singh, G. Subbaiah, B. Shah, S. Kambli, S. Ameta, *Biomed. Chromatogr.* 21(2) (2007) 169-175
- [84] R.V.S. Nirogi, V.N. Kandikere, K. Mudigonda, M. Shukla, S. Maurya, *Biomed. Chromatogr.* 20(9) (2006) 833-842
- [85] Q. Yu, Z-Y. Hu, F-Y. Zhu, J-H. Zhu, L-L. Wan, Y. Li, C. Guo, *Chromatographia*, 73(3-4) (2011) 257-262
- [86] A.S. Pereira, B. Bicalho, J.S. Ilha, G. De Nucci, *J. Chromatogr. Sci.* 46(1) (2008) 35-41

- [87] F. Scharpf, K.D. Riedel, H. Laufen, M. Leitold, *J. Chromatogr., B* 655 (1994) 225
- [88] S.C. Monkman, J.S. Ellis, S. Cholerton, J.M. Thomason, R.A. Seymour, J.R. Idle, *J. Chromatogr., B: Biomedical Sciences and Applications*, 678(2) (1996) 360-364
- [89] A.A. Burkin, M.A. Burkin, *Appl. Biochem. Microbiol.* 44(3) (2008) 323-327
- [90] D.M. Milenović, M.L. Lazić, V.B. Veljković, Z.B. Todorović, *Acta Chromatographica*, 20(2) (2008) 183-194
- [91] J.A. Lopez, V. Martinez, R.M. Alonso, R.M. Jimenez, *J. Chromatogr., A* 870(1-2) (2000) 105-114
- [92] S. Reddy, I. Ahmad, N. Nayak, S. Thangam, A. Mukhopadhyay, *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6(1) (2013) 83-86
- [93] O. Gonzalez, R.M. Alonso, N. Ferreiros, W. Weinmann, R. Zimmermann, S. Dresen, *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 879(3-4) (2011) 243-252
- [94] M. Anschuetz, M. Wonnemann, B. Schug, C. Toal, F. Donath, A. Pontius, K. Pauli, E. Brendel, H. Blume, *Int. J. Clin. Pharm. Th.* 48(2) (2010) 158-170
- [95] S. Dresen, N. Ferreiros, H. Gnann, R. Zimmermann, W. Weinmann, *Anal. Bioanal. Chem.* 396(7) (2010) 2425-2434
- [96] D. Baviskar, R. Sharma, D. Jain, *Asian J.Chem.* 21(9) (2009) 7309-7315
- [97] Y. Guo, J. Dai, G. Qian, N. Guo, Z. Ma, XingJie Guo, *Int. J. Pharm.* 341(1-2) (2007) 91-96
- [98] C.A. Mueller, Ana B.B. Gonzalez, W. Weinmann, *J. Mass Spectrom.* 39(6) (2004) 639-646
- [99] D.P. Patel, P. Sharma, M. Sanyal, P. Singhal, P.S. Shrivastav, *Biomed. Chromatogr.* 26(12) (2012) 1509-1518
- [100] H. Miyanishi, T. Nemoto, M. Mizuno, H. Mimura, S. Kitamura, Y. Iwao, S. Noguchi, S. Itai, *Pharm. Res.* 30(2) (2013) 502-511

- [101] ICH Q 1 A (R2) Stability testing of new drug substances and products CPMP/ICH/2736/99, August 2003, available at <http://www.ema.europa.eu> [accessed 3/8/2013]
- [102] ICH Q 1 B Photostability testing of new active substances and medicinal products CPMP/ICH/279/95, January 1998, available at <http://www.ema.europa.eu> [accessed 3/8/2013]
- [103] ICH Q 1 C Stability testing: requirements for new dosage forms CPMP/ICH/280/95, January 1998, available at <http://www.ema.europa.eu> [accessed 3/8/2013]
- [104] ICH Q 1 D Bracketing and matrixing designs for stability testing of drug substances and drug products CPMP/ICH/4104/00, August 2002, available at <http://www.ema.europa.eu> [accessed 3/8/2013]
- [105] ICH Q 1 E Evaluation of stability data CPMP/ICH/420/02, August 2003, available at <http://www.ema.europa.eu> [accessed 3/8/2013]
- [106] Commission Regulation (EC) No 1234/2008 of 24 November 2008, concerning the examination of variations to the terms of marketing authorisations for medicinal products for human use and veterinary medicinal products, available at <http://www.ema.europa.eu> [accessed 3/8/2013]
- [107] ICH Q 3 A (R2) Impurities in new drug substances, CPMP/ICH/2737/99 Rev.2, August 2002, <http://www.ich.org/> [accessed 3 August 2012]
- [108] ICH Q 3 B (R2) Impurities in new drug products, CPMP/ICH/2738/99, August 2003 (with revised attachment on thresholds for degradation products in new drug products, June 2006, <http://www.ich.org/> [accessed 3 August 2012]
- [109] ICH Q 2 (R1) Validation of analytical procedures: Text and methodology, CPMP/ICH/381/95, June 1995, <http://www.ich.org/> [accessed 3 August 2012]
- [110] G. Ragno, A. Garofalo, C. Vetuschi, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 27 (2002) 19-24
- [111] E. Fasani, A. Albini, S. Gemme, *Int. J. Pharm.* 352 (2008) 197-201
- [112] P.K.F. Yeung, S.J. Mosher, P.T. Pollak, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 9 (1991) 565-571
- [113] M.C. Nahata, R.S. Morosco, T.F. Hipple, *J. Am. Pharm. Assoc.* 39 (1999) 375-377
- [114] A. Abdoh, M.M. Al-Omari, A.A. Badwan, A.M.Y. Jaber, *Pharm. Dev. Techn.* 9 (2004) 15-24

- [115] A. Siva Lakshmi Devi, Y. Srinivasa Rao, M. Satish, G. Jyothi, K. Babu Rao, T. Omdutt, *Magn. Reson. Chem.* 45 (2007) 688-691
- [116] K. Swaroopa Rani, A. Swapna, A. Padma, K. Chaithanya, P. Ramalingam, Hari Hara Teja D., *Res. J. Pharm., Biol. Chem. Sci.* 2 (2011) 470-479
- [117] A.B. Thomas, S.N. Jagdale, R.K. Nanda, L.P. Kothapalli, A.D. Deshpande, *J. Pharm. Res.* 10 (2011) 66-72; CAN155:313622
- [118] D. Mahesh, C. Darshana, S. Mayur, V. Racha, M.C. Damle, *Eurasian J. Anal. Chem.* 5 (2010) 161-169
- [119] K. Kamat, S.C. Chaturvedi, *Indian J. Pharm. Sci.* 67 (2005) 236-239
- [120] A. Mohammadi, N. Rezanour, M. Ansari Dogaheh, F. Ghorbani Bidkorbeh, M. Hashem, R.B. Walker, *J. Chromatogr., B* 846 (2007) 215-221
- [121] D.A. Shah, R.S. Nakrani, S.L. Baldania, U.K. Chhalotiya, K.K. Bhat, *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* 17 (2011) 341-348
- [122] U.K. Chhalotiya, K.K. Bhat, D.A. Shah, S.L. Baldania, J.R. Patel, *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* 18 (2012) 35-42
- [123] S. Sharma, M.C. Sharma, R. Sharma, A.D. Sharma, *J. Pharm. Res.* 4 (2011) 1579-1581
- [124] S.S. Chitlange, K. Bagri, D.M. Sakarkar, *Asian J. Res. Chem.* 1 (2008) 15-18
- [125] D.A. Shah, K.K. Bhatt, R.S. Mehta, S.L. Baldania, T.R. Gandhi, *Indian J. Pharm. Sci.* 70 (2008) 754-760
- [126] S.J. Joshi, P.A. Karbhari, S.I. Bhoir, *Chromatographia*, 70 (2009) 557-561
- [127] A.R. Fakhari, S. Nojavan, S. Haghgoo, A. Mohammadi, *Electrophoresis*, 29 (2008) 4583-4592
- [128] T. Murakami, N. Fukutsu, J. Kondo, T. Kawasaki, F. Kusu, *J. Chromatogr., A* 1181 (2008) 67-76
- [129] I.A. Majeed, W.J. Murray, D.W. Newton, S. Othman, W.A. Alturk, *J. Pharm. Pharmacol.* 39 (1987) 1044
- [130] Y. Mastuda, R. Teraoka, I. Sugimoto, *Int. J. Pharm.* 54 (1989) 211
- [131] I. Matsuura, M. Imaizumi, M. Sugiyama, *Chem. Pharm. Bull.* 38 (1990) 1692

- [132] Y. Kawabe, H. Nakamura, E. Hino, S. Suzuki, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47(3) (2008) 618-624
- [133] R.O.C. Filho, P.I.B.M. Franco, E.C. Conceicao, M.I.G. Leles, *J. Therm. Anal. Cal.* 97(1) (2009) 343-347
- [134] L. Almeida e Sousa, A. Beezer, D. Clapham, L. Hansen, S. Gaisford, *J. Pharm. Pharmacol.* 62(10) (2010) 1214-1215
- [135] H.R. Memarian, M. Abdoli-Senejani, D. Döpp, *J. Chin. Chem. Soc.* 54 (2007) 131-139
- [136] M.Lj. Mihailović, *Osnovi teorijske organske hemije i stereochemije*, Građevinska knjiga, Beograd (1990) str. 330
- [137] V.T. D'Souza, K.B. Lipkowitz, *Chem. Rev.* 98 (1998) 1749
- [138] R.A. Rajewski, V.J. Stella, *J. Pharm. Sci.* 85 (1996) 1142
- [139] V. Nikolić, M. Stanković, A. Kapor, Lj. Nikolić, D. Cvetković, J. Stamenković, *Pharmazie* 59 (2004) 845
- [140] V. Nikolić, Lj. Nikolić, M. Stanković, A. Kapor, M. Popsavin, D. Cvetković, *J. Serb. Chem. Soc.* 72(8-9) (2007) 737-746
- [141] J.Szejtli, *Chem. Rev.* 98 (1998) 1743
- [142] P.Giastas, K. Yannakopoulou, I.M. Mavridis, *Acta Cryst.* B59 (2003) 287
- [143] V. Nikolić, D. Ilić, Lj. Nikolić, M. Stanković, M. Cakić, Lj. Stanojević, A. Kapor, M. Popsavin, *Cent. Eur. J. Chem.* 8(4) (2010) 744-749
- [144] M.M. Pop, K. Goubitz, G. Borodi, M. Bogdan, D.J.A. De Ridder, R. Peschar, H. Schenk, *Acta Cryst.* B58 (2002) 1036-1043
- [145] H.J. Schneider, F. Hacket, V. Rüdiger, H. Ikeda, *Chem. Rev.* 98 (1998) 1755
- [146] A. Kapor, V. Nikolić, Lj. Nikolić, M. Stanković, M. Cakić, Lj. Stanojević, D. Ilić, *Cent. Eur. J. Chem.* 8(4) (2010) 834-841
- [147] N. Škalko, M. Brandl, M. Bećirević-Laćan, J. Filipović-Grčić, I. Jalšenjak, *Eur. J. Pharm. Sci.* 4 (1996) 359
- [148] J. Mielcarek, *Pharmazie* 51 (1996) 477
- [149] K.L. Andrew Chan, S. G. Kazarian, *Mol. Pharm.* 1 (2004) 331

- [150] G. Ragno, E. Cione, A. Garofalo, G. Genchi, G. Ioele, A. Risoli, A. Spagnoletta, *Int. J. Pharm.* 265 (2003) 125-132
- [151] M. Aujla, A.C. Rana, N. Seth, R. Bala, *Journal of Drug Delivery and Therapeutics* 2(5) (2012) 55-60
- [152] L. Zhao, Y-M. Wei, Y. Yu, W-W. Zheng, *Arch. Pharm. Res.* 33 (2010) 443-450
- [153] N. Li, D.S. Kommireddy, Y. Lvov, W. Liebenberg, L.R. Tiedt, M.M. De Villiers, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 6(9/10) (2006) 3252-3260
- [154] N. Li, M.D. Degennaro, W. Liebenberg, L.R. Tiedt, A.S. Zahn, M.V. Pishko, M.M. De Villiers, *Pharmazie*, 61(7) (2006) 595-603
- [155] G. Vuković, A. Marinković, M. Obradović, V. Radmilović, M. Čolić, R. Aleksić, P.S. Uskoković, *Appl. Surf. Sci.* 255 (2009) 8067
- [156] G. D. Vuković, A. D. Marinković, M. Čolić, M. Đ. Ristić, R. Aleksić, A. A. Perić-Grujić, P. S. Uskoković, *Chem. Eng. J.* 57 (2010) 238
- [157] G. D. Vuković, S. Z. Tomić, A. D. Marinković, V. Radmilović, P. S. Uskoković, M. Čolić, *Carbon*, 48 (2010) 3066
- [158] M. D. Obradović, G. D. Vuković, S. I. Stevanović, V. V. Panić, P. S. Uskoković, A. Kowal, S. Lj. Gojković, *J. Electroanal. Chem.* 634 (2009) 22
- [159] T. J. Schmidt, H. A. Gasteiger, R. J. Behm, *Electrochem. Commun.* 1 (1999) 1
- [160] J. Wang, M. Musameth, Y. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 2408
- [161] Z. Ž. Stoiljković, M. L. Avramov-Ivić, S. D. Petrović, D. Ž. Mijin, S. I. Stevanović, U. Č. Lačnjevac, A. D. Marinković, *Int. J. Electrochem. Sci.* 7 (2012) 2288
- [162] K. M. Drljević-Đurić, V. D. Jović, U. Č. Lačnjevac, M. L. Avramov-Ivić, S. D. Petrović, D. Ž. Mijin, S. B. Đorđević, *Electrochim. Acta*, 56 (2010) 47
- [163] Amlodipine Besylate Summary Validation Report, Jul 27, 2012, <http://www.usp-mc.org> [accessed 4 February, 2013]
- [164] G.S. Sadana, A.B. Ghogare, *J. Pharm Sci.* 80 (1991) 895
- [165] V. Marinković, D. Agbaba, K. Karljković-Rajić, S. Vladimirov, J. Nedeljković, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 929
- [166] V.D. Marinković, D. Agbaba, K. Karljković-Rajić, J. Comor, D. Živanov-Stakić, *Farmaco*, 55 (2000) 128

- [167] K.P.R. Chowdary, G.K. Reddy, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 64 (2002) 142
- [168] M. Bećirević-Laćan, J. Filipović-Grčić, N. Skalko, J. Jalsenjak, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 22 (1996) 1231
- [169] J. Mielcarek, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15 (1997) 681
- [170] J. Mielcarek, *Acta Pol. Pharm.* 52 (1995) 459
- [171] R. Greaf, R. Peat, R. L. Peter, D. Pletcher, J. Robinson, *Instrumental Methods in Electrochemistry*, Ellis Horwood, Chichester, UK (1985) str. 178
- [172] A. Ferancová, J. Labuda, *Anal. Bioanal. Chem.* 370 (2001) 1
- [173] A. Ferancová, J. Labuda, J. Barek, J. Zima, *Chem. Listy*, 96 (2002) 856
- [174] P. M. Bersier, J. Bersier, B. Klingert, *Electroanalysis*, 3 (1990) 443
- [175] A-E. Radi, S. Eissa, *The Open Chemical and Biomedical Methods Journal*, 3 (2010) 74
- [176] A-E. Radi, S. Eissa, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 71 (2011) 95
- [177] C. Yanez, R. Salazar, Lj. Nunez-Vergara, J.A Squella, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35 (2004) 51
- [178] Q. Lu, J. Zhao, M. Wang, Z. Wang, *Int. J. Electrochem. Sci.* 6 (2011) 3868
- [179] C. Hansch, A. Leo, *Exploring QSAR: Hydrophobic, Electronic and Steric Constants*, ACS, Washington DC (1995) str.219-222
- [180] M.M. Al Omari, M.I. El-Barghouthi, M.B. Zughul, J.E.D. Davies, A.A. Badwan, *J. Mol. Liq.*, 155 (2010) 103

7. BIOGRAFIJA KANDIDATA

Zora Stoiljković je rođena 5. novembra 1960. godine u Leskovcu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Na Tehnološki fakultet u Leskovcu upisala se školske 1979/80. godine. Diplomirala je 1984. godine, na Biohemijskom odseku, Farmaceutsko-kozmetički smer (prosečna ocena položenih ispita 9,27) odbranivši diplomski rad na temu „Razdvajanje lanatozida ekstrakcijom tečnost-tečnost“ sa ocenom 10. Školske 1985/86. godine upisala je magistarske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu u Beogradu, na studijskom programu Reakcioni mehanizmi na Katedri za organsku hemiju, pod mentorstvom prof. dr Slobodana Petrovića. U okviru magistarskih studija položila je sve ispite predviđene nastavnim planom i programom sa prosečnom ocenom 9,71, kao i završni ispit na temu „Izolovanje flavonolignana iz ploda *Silybum marianum* L.“ sa ocenom 10. Po završetku osnovnih studija od 1985. godine radi u Farmaceutsko-hemijskoj industriji Zdravlje A.D. Leskovac, u Centru za istraživanje i razvoj i intenzivno se bavi naučno-istraživačkim radom. Kao istraživač, a zatim od 1997. godine kao istraživač saradnik učestvovala je u radu na realizaciji osam naučno-istraživačkih projekata, u oblasti Tehnološkog razvoja, finansiranih od strane Ministarstva za nauku i tehnologiju Republike Srbije i Centra za istraživanje i razvoj Zdravlja A.D. Leskovac. Od 2005. godine u kompaniji Zdravlje Actavis radi na poslovima registracije lekova u zemlji i inostranstvu.

Zora Stoiljković je koautor pet radova objavljenih u međunarodnim časopisima (M22 – 2 rada, M23 – 3 rada), osamnaest radova saopštenih na međunarodnim skupovima, jedanaest radova u časopisima nacionalnog značaja, i više od četrdeset radova saopštenih na nacionalnim skupovima. Koautor je osam tehnologija uvedenih u proizvodnju, dvadeset i sedam novih tehnoloških postupaka, jednog priznatog patenta na nacionalnom nivou i dve patentne prijave. Iz oblasti istraživanja iz koje je predložena tema doktorske disertacije, kandidat je koautor 3 naučna rada objavljena u naučnim časopisima i 3 saopštenja na međunarodnim i nacionalnim skupovima.

Zora Stoiljković govori engleski jezik.

Član je Srpskog hemijskog društva.

Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine deo teze**Rad u međunarodnom časopisu (M22)**

1. Z. Ž. Stoilković, M. L. Avramov-Ivić, S. D. Petrović, D. Ž. Mijin, S. I. Stevanović, U. Č. Lačnjevac, A. D. Marinković, Voltammetric and Square-Wave Anodic Stripping Determination of Amlodipine Besylate on Gold Electrode, *Int. J. Electrochem. Sci.* 7 (2012) 2288-2303
2. Z.Ž. Stoilković, V.V. Jovanović, D.Ž. Mijin, V. Nikolić, Lj. Nikolić, S.D. Petrović, M.L. Avramov Ivić, The Electrochemical Investigation of Inclusion Complexes of Nifedipine and Amlodipine with β -Cyclodextrin and 2-(Hydroxypropyl)- β -cyclodextrin, *Int. J. Electrochem. Sci.* 8 (2013) rad primljen za štampu

Rad u međunarodnom časopisu (M23)

1. Zora Ž. Stoilković, Milka B. Jadranin, Svetlana Lj. Đurić, Slobodan D. Petrović, Milka L. Avramov Ivić, Dušan Ž. Mijin, Investigation of forced and total degradation products of amlodipine besylate by liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry, *Chemical Industry&Chemical Engineering Quarterly*, DOI:10.2298/CICEQ121226011S (2013)

Rad saopšten na međunarodnom skupu štampan u izvodu (M34)

1. M. L. Avramov-Ivić, Z. Ž. Stoilković, S. D. Petrović, D. Ž. Mijin, S. I. Stevanović, U. Č. Lačnjevac, A. D. Marinković, Voltammetric and Square-Wave Anodic Stripping Determination of Amlodipine Besylate on Gold Electrode, 63rd Meeting ISE, Prag, Czech Republic, 19-24.08.2012.
2. M.L. Avramov Ivić, Z.Ž. Stoilković, S.D. Petrović, D.Ž. Mijin, S.I. Stevanović, U.Č. Lačnjevac, A.D. Marinković, Gold electrode and a gold electrode modified by oxidized multi-wall carbon nanotubes (o-MWCNT) used in electrooxidation of amlodipine besylate, First International Conference on Processing, Characterization and Application of

Nanostructured Materials and Nanotechnology, Belgrade, Serbia, 2012, Book of Abstracts, p.96

Rad saopšten na skupu nacionalnog značaja štampan u izvodu (M64)

1. Z. Stoilković, M. Avramov Ivić, S.D. Petrović, D. Mijin, S. Stevanović, U. Lačnjevac, S. Đurić, A. Marinković, P. Uskoković, Electrochemical behavior of amlodipine on gold electrode in neutral electrolyte followed by HPLC and AFM, IX Simpozijum Savremene tehnologije i privredni razvoj sa međunarodnim učešćem, Zbornik izvoda radova str.117, Tehnološki fakultet, Leskovac, 21. i 22.10.2011, Leskovac

8. IZJAVA O AUTORSTVU

Potpisani-a ZORA Ž. STOILJKOVIĆ _____

broj upisa _____ (studenti upisuju br. indeksa, a doktoranti koji su direktno prijavili doktorsku disertaciju ostavljaju prazno)

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

ODREĐIVANJE AMLODIPINA I NIFEDIPINA ELEKTROHEMIJSKIM I DRUGIM
ANALITIČKIM METODAMA

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____

Zora Stoilković

9. IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE

Ime i prezime autora ZORA Ž. STOILJKOVIĆ _____

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada ODREĐIVANJE AMLODIPINA I NIFEDIPINA ELEKTROHEMIJSKIM I
DRUGIM ANALITIČKIM METODAMA

Mentor DR SLOBODAN D. PETROVIĆ

Potpisani **ZORA Ž. STOILJKOVIĆ**

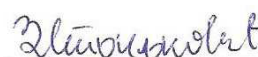
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____



10. IZJAVA O KORIŠĆENJU

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:
ODREĐIVANJE AMLODIPINA I NIFEDIPINA ELEKTROHEMIJSKIM I DRUGIM
ANALITIČKIM METODAMA

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

U Beogradu, _____

Potpis doktoranda