

*Univerzitet u Nišu
Prirodno–matematički fakultet
Odsek za hemiju*

Ivana Rašić Mišić

***Kinetičko–spektrofotometrijsko određivanje pojedinih
komponenata u farmaceutskim preparatima***

Doktorska disertacija

Niš, 2011.



PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
NIŠ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj, RBR:	
Identifikacioni broj, IBR:	
Tip dokumentacije, TD:	monografska
Tip zapisa, TZ:	tekstualni
Vrsta rada, VR:	Doktorska disertacija
Autor, AU:	Ivana Rašić Mišić
Mentor, MN:	Dr Gordana Miletić
Naslov rada, NR:	Kinetičko-spektrofotometrijsko određivanje pojedinih komponenata u farmaceutskim preparatima
Jezik publikacije, JP:	srpski
Jezik izvoda, JI:	srpski i engleski
Zemlja publikovanja, ZP:	Srbija
Uže geografsko područje, UGP:	Srbija
Godina, GO:	2011.
Izdavač, IZ:	autorski reprint
Mesto i adresa, MA:	Niš, Višegradska 33
Fizički opis rada, FO: (poglavljja/ strana/ citata/ tabela/ slika/ grafika/ priloga)	7 poglavljja, 198 strana, 157 citata, 39 tabela, 95 slika
Naučna oblast, NO:	hemija
Naučna disciplina, ND:	analitička hemija
Predmetna odrednica/Ključne reči, PO:	urea, streptomycin, neomicin, ampicilin, natrijum-salicilat, histidin, farmaceutski preparati, kinetička-spektrofotometrija, HPLC, mikrobiološka disk-difuziona metoda
UDK	543.23 + 535.243 : 615.45
Čuva se, ČU:	biblioteka
Važna napomena, VN:	Disertacija je rađena u laboratorijama PMF-a Univerziteta u Nišu
Izvod, IZ:	U ovom radu su predložene nove kinetičko-spektrofotometrijske metode za određivanje uree, streptomicina, neomicina, amplicilina, natrijum-salicilata i histidina, a na osnovu: uticaja streptomicina i neomicina na kinetiku reakcija modifikovane Berthelot-ove metode za određivanje uree, karakteristika kinetike procesa formiranja kompleksa amplicilina sa Ni(II) jonima u baznoj sredini i uticaja histidina na ovu reakciju, kao i karakteristike degradacije kompleksa Fe(III)-salicilata sa Fenton-ovim reagensom. Razrađene metode su primenjene na realne uzorke određivanjem navedenih supstanci u farmaceutskim preparatima.
Datum prihvatanja teme, DP:	07.07.2010. Nastavno-naučno Veće Fakulteta 12.07.2010. Naučno-stručno Veće Univerziteta
Datum odbrane, DO:	
Članovi komisije, KO:	Predsednik: } Član: } Član,mentor: }



PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
NIŠ

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, ANO:	
Identification number, INO:	
Document type, DT:	Monograph
Type of record, TR:	Textual
Contents code, CC:	PhD dissertation
Author, AU:	Ivana Rašić Mišić
Mentor, MN:	Gordana Miletić, PhD
Title, TI:	Kinetic-spectrophotometric determination of some components in pharmaceutical preparations
Language of text, LT:	Serbian
Language of abstract, LA:	Serbian and English
Country of publication, CP:	Serbia
Locality of publication, LP:	Serbia
Publication year, PY:	2011.
Publisher, PB:	Author's reprint
Publication place, PP:	Niš, Višegradska 33
Physical description, PD: (chapters/pages/ref./tables/pictures/graphs/appendixes)	7 chapters, 198 pages, 157 references, 39 tables, 95 pictures
Scientific field, SF:	Chemistry
Scientific discipline, SD:	Analytical Chemistry
Subject/Key words, S/KW:	Urea, streptomycin, neomycin, ampicillin, sodium-salicylate, histidine, pharmaceuticals, kinetic-spectrophotometry, HPLC, microbiological disc-diffusion method.
UC	543.23 + 535.243 : 615.45
Holding data, HD:	Library
Note, N:	The dissertation work was done at PMF, University of Niš laboratories
Abstract, AB:	New kinetic-spectrophotometric methods have been developed for the determination of urea, streptomycin, neomycin, ampicillin, sodium-salicylate and histidine, based on: the effect of streptomycin and neomycin on the reaction kinetics in the modified Berthelot method for the determination of urea, characteristics of the kinetic processes in formation of complex between nickel (II) ion and ampicillin and histidin impact on this reaction, as well as the characteristic of Fe(III)-salicylate complex degradation by Fenton reagent. Application of proposed methods was examined on real samples by determining mentioned components in pharmaceuticals.
Accepted by the Scientific Board on, ASB:	07.07.2010. – Faculty Academic Board 12.07.2010. – University Academic Board
Defended on, DE:	
Defended Board, DB:	President: Member: Member, Mentor:

*Mojoj majci, koleginci i najboljem prijatelju
hvala na bezuslovnoj ljubavi, požrtvovanosti i dragocenim savetima.*

Ova doktorska disertacija urađena je u laboratorijama Odseka za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu, kao sastavni deo naučno-istraživačkih projekata (1211 i 142015) koje je finansiralo Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

Izradom disertacije rukovodila je dr Gordana Milić, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu, koja me je uvela u oblast hemijske analize primenom kinetičko–spektrofotometrijskih metoda. Zahvaljujem joj na podršci, razumevanju i vremenu koje mi je posvetila. Hvala joj na savetima, primedbama i predlozima, koji su mi pomogli pri kreiranju istraživanja, organizaciji eksperimenta i prezentaciji rezultata ovog rada.

Zahvaljujem dr Snežani Mitić, redovnom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu, koja mi je pomogla korisnim sugestijama i savetima u toku razrade i primene predloženih metoda hemijske analize, kao i u prikazu rezultata. Posebno joj zahvaljujem na ukazanom poverenju, da ovo istraživanje realizujem u okviru navedenih projekata kojima je rukovodila.

Takođe se zahvaljujem dr Slavici Sunarić, docentu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu, koja se rado prihvatila ocene ovog rada.

Zahvaljujem dr Danijeli Kostić, vanrednom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu, na pomoći i saradnji, posebno u početnom periodu mog istraživačkog rada.

Nastavno-istraživačkom timu Katedre za Analitičku i Fizičku hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu zahvaljujem na saradnji tokom proteklih godina, kao i kolegama sa katedre za Organsku hemiju i biohemiju.

Srdačno zahvaljujem mr Nini Lazarević, višem lektoru Departmana za anglistiku Filozofskog fakulteta Univerziteta u Nišu i Aleksandri Stanojev na editovanju engleskih prevoda publikovanih delova ove disertacije, kao i Vladimiru Adamoviću, dipl. inž. arh. na pomoći u tehničkoj obradi ilustrovanih eksperimentalnih rezultata.

Beskrajno zahvaljujem suprugu na podršci i razumevanju.

SADRŽAJ

UVOD.....	15
1. TEORIJSKI DEO	21
1.1. Farmaceutski preparati	21
1.1.1. Urea	24
1.1.1.1. Metode za određivanje uree	25
1.1.1.1.1. Kinetičko–spektrofotometrijska (enzimska) metoda	27
1.1.2. Streptomicin	30
1.1.2.1. Metode za određivanje streptomicina	31
1.1.3. Neomicin	33
1.1.3.1. Metode za određivanje neomicina	34
1.1.3.1.1. Mikrobiološka metoda	35
1.1.4. Natrijum salicilat	37
1.1.4.1. Metode za određivanje natrijum salicilata	37
1.1.4.1.1. Osnovi Fenton-ove reakcije	39
1.1.5. Ampicilin	40
1.1.5.1. Metode za određivanje ampicilina	41
1.1.6. Histidin	43
1.1.6.1. Metode za određivanje histidina	44
1.2. Kinetičke metode analize	46
1.2.1. Kinetika hemijskih reakcija	46
1.2.2. Faktori koji utiču na brzinu hemijske reakcije	48
1.2.2.1. Uticaj temperature.....	48
1.2.2.2. Uticaj koncentracije reaktanata.....	49
1.2.2.3. Uticaj rastvarača.....	49
1.2.2.4. Uticaj katalizatora	50
1.2.2.4.1. Biokatalizatori (enzimi)	51
1.2.2.5. Uticaj aktivatora.....	58
1.2.3. Klasifikacija kinetičkih metoda analize.....	59
1.2.4. Primena kinetičkih metoda analize za određivanje katalizatora.....	60

1.2.4.1.	Diferencijalne metode.....	61
1.2.4.2.	Integralne metode.....	64
1.2.5.	Karakteristike kinetičkih metoda analize	67
1.3.	Hromatografija visoke efikasnosti (HPLC).....	74
1.4.	Regresiona i korelaciona analiza	77
1.4.1.	Regresiona analiza.....	77
1.4.2.	Korelaciona analiza	79
2.	EKSPERIMENTALNI DEO.....	81
2.1.	Program i metodika rada	81
2.2.	Eksperimentalni postupak	81
2.2.1.	Aparati	81
2.2.2.	Reagensi	82
2.3.	Eksperimentalni postupak	84
2.3.1.	Kinetičko–spektrofotometrijska metoda za određivanje brzine indikatorske reakcije	84
2.3.2.	Procedura za reakcioni sistem R_3 -urea-ureaza- R_4	85
2.3.3.	Procedura za reakcioni sistem R_3 -urea- <i>streptomycin</i> -ureaza- R_4	86
2.3.4.	Procedura za reakcioni sistem R_3 -urea- <i>neomicin</i> -ureaza- R_4	87
2.3.5.	Procedura za reakcioni sistem <i>Na-salicilat</i> -vodonik peroksid-Fe(II).....	88
2.3.6.	Procedura za reakcioni sistem <i>ampicilin</i> -Ni(II).....	89
2.3.7.	Procedura za reakcioni sistem <i>ampicilin-histidin</i> -Ni(II)	91
3.	REZULTATI I DISKUSIJA.....	93
3.1.	Kinetičko–spektrofotometrijsko određivanje uree	93
3.1.1.	Određivanje optimalnih uslova odigravanja reakcije	97
3.1.2.	Validacija kinetičko–spektrofotometrijske metode za određivanje uree.....	101
3.1.3.	Primena kinetičko–spektrofotometrijske metode za određivanje uree.....	104
3.2.	Kinetičko–spektrofotometrijsko određivanje streptomicina	105
3.2.1.	Određivanje optimalnih uslova odigravanja reakcije	108
3.2.2.	Validacija kinetičko–spektrofotometrijske metode za određivanje streptomicina	113
3.2.3.	Primena kinetičko–spektrofotometrijske metode za određivanje streptomicina	115
3.3.	Kinetičko–spektrofotometrijsko određivanje neomicina.....	118

3.3.1.	Određivanje optimalnih uslova odigravanja reakcije	122
3.3.2.	Validacija kinetičko–spektrofotometrijske metode za određivanje neomicina	127
3.3.3.	Primena kinetičko-spektrofotometrijske metode za određivanje neomicina	131
3.4.	Kinetičko–spektrofotometrijsko određivanje Na-salicilata	133
3.4.1.	Određivanje optimalnih uslova odigravanja reakcije	134
3.4.2.	Validacija kinetičko-spektrofotometrijske metode za određivanje Na-salicilata ..	138
3.4.3.	Termodinamičke karakteristike sistema	141
3.4.4.	Primena kinetičko–spektrofotometrijske metode za određivanje Na-salicilata	144
3.5.	Kinetičko–spektrofotometrijsko određivanje ampicilina	146
3.5.1.	Određivanje optimalnih uslova odigravanja reakcije	147
3.5.2.	Validacija analitičke metode za određivanje ampicilina	150
3.5.3.	Termodinamičke karakteristike sistema	152
3.5.4.	Primena kinetičko–spektrofotometrijske metode za određivanje ampicilina	155
3.6.	Kinetičko–spektrofotometrijsko određivanje histidina	158
3.6.1.	Određivanje optimalnih uslova odigravanja reakcije	159
3.6.2.	Validacija analitičke metode za određivanje histidina	162
3.6.3.	Termodinamičke karakteristike sistema	166
IZVOD		169
SUMMARY		175
LITERATURA		181
BIOGRAFIJA SA BIBLIOGRAFIJOM		195

UVOD

Kvantitativna analiza lekova i ostalih farmaceutskih preparata je sastavni deo kontrole ovih proizvoda obzirom na činjenicu da delotvorne koncentracije nisu uvek i bezbedne. Njihova primena je ograničena rokom trajanja, jer se tokom vremena mogu hemijski promeniti, pri čemu dolazi do gubitka njihovog aktivnog dejstva, a u nekim slučajevima i do pojave toksičnih efekata.

Terapijska kontrola lekova je od najveće koristi onda kada ozbiljnost kliničke situacije zahteva „agresivnu“ primenu leka. Često se javljaju i slučajna trovanja lekovima, npr. aspirin je odgovoran za veći broj slučajnog trovanja kod dece nego bilo koja druga supstanca. Kod osoba osetljivih na aspirin kao zamena primenjuje se natrijum salicilat, koji takođe može da izazove toksične efekte usled prekomerne administracije i/ili akumulacije u organizmu. Rasprostranjena primena antibiotika vodi ka povećanju faktora rezistencije itd. Laboratorijski nalazi daju osnovu za blagovremeno i racionalno prilagođavanje doze leka. Metabolizam lekova se odvija u jetri, dok je renalna ekskrecija glavni način za eliminaciju lekova i njihovih metabolita, kao i proizvoda metabolizma proteina, npr. uree. Smanjena bubrežna funkcija, uzrokovana različitim bolestima i/ili lekovima, dovodi do povećanja koncentracije lekova i metabolita u krvi.

Pored kontrole lekova važna je i kontrola pojedinih aminokiselina kao komponenata farmaceutskih preparata. Npr. kod osoba koje boluju od reumatoidnog artritisa ili katarakte treba davati histidin kao dodatak ishrani. Dok povećane vrednosti ove aminokiseline smanjuju nivo cinka u organizmu i dovode do alergijskih, čak i asmatičnih reakcija.

Iz ovih razloga postoji stalna potreba za razvojem novih i osetljivih analitičkih metoda za analizu i praćenje koncentracije navedenih supstanci u različitim vrstama uzoraka. Kinetičko–spektrofotometrijske metode hemijske analize su relativno brze i dovoljno selektivne za određivanje niskih koncentracija različitih supstanci u rastvoru. Pored toga, one ne zahtevaju skupu opremu i uglavnom koriste lako dostupne reagense, što ih čini pogodnim za primenu u laboratorijskim uslovima.

Cilj ove disertacije bio je:

- proučavanje uticaja streptomicina i neomicina na određivanje uree primenom modifikovane Berthelot-ove metode, kao i razrada i primena kinetičko–spektrofotometrijskih metoda za određivanje uree i navedenih antibiotika,
- razvoj i primena kinetičko–spektrofotometrijskih metoda za određivanje ampicilina i histidina i
- razvoj i primena kinetičko–spektrofotometrijske metode za određivanje salicilata primenom Fenton-ove reakcije.

Rad se sastoji iz sledećih delova: Teorijski deo, Eksperimentalni deo, Rezultati i diskusija, Izvod, Summary i Literatura.

U Teorijskom delu opisane su osobine, primena i literaturni pregled metoda za određivanje gore navedenih supstanci. Posebno su opisane metode korišćene u eksperimentalnom radu i obradi rezultata: modifikovana Berthelot-ova i UV metoda za određivanje uree, mikrobiološka metoda difuzije za određivanje antibiotika, osnovi Fenton-ove hemije, hemijska kinetika, regresiona i korelaciona analiza, UV/Vis spektrofotometrija i HPLC.

U Eksperimentalnom delu dat je program i metodika eksperimenta, pregled primenjenih reagenasa, aparature i eksperimentalne tehnike, kao i postupci pripreme uzoraka za određivanje navedenih supstanci primenom kinetičko–spektrofotometrijskih i uporednih (referentnih) metoda.

Posebna pažnja je posvećena poglavlju Rezultati i diskusija u kome su, u okviru šest delova, prezentovani obrađeni i analizirani eksperimentalno dobijeni rezultati za kinetičko–spektrofotometrijsko određivanje uree, streptomicina, neomicina, ampicilina, histidina i salicilata. Naime, prikazani su:

- apsorpcioni spektri reaktanata i ispitivanih sistema,
- rezultati određivanja optimalnih uslova odigravanja reakcija, odnosno zavisnosti brzine reakcija od koncentracije svakog učesnika i red reakcija u odnosu na svaki reaktant pojedinačno,
- kinetičke jednačine za ispitivane procese,
- radne krive i jednačine za određivanje navedenih supstanci,
- termodinamičke karakteristike reakcionih sistema,
- rezultati granice određivanja i granice detekcija,
- rezultati tačnosti i preciznosti određivanja,
- rezultati ispitivanja selektivnosti i
- rezultati primene kreiranih kinetičko–spektrofotometrijskih metoda na farmaceutske preparate.

U Izvodu su sumirani rezultati do kojih se došlo u ovom radu. Isti tekst je u engleskoj varijanti prezentovan u delu Summary.

Spisak korišćene literature je naveden u šestom delu i na kraju je data biografija i spisak objavljenih radova.

„Količina aktivnog sastojka je glavno merilo u kategorizaciji farmaceutskih proizvoda.“

prof. dr Nada Kovačević

1. TEORIJSKI DEO

1.1. Farmaceutski preparati

Farmaceutski preparati (gr. φαρμακεία = nauka o spravljanju i davanju leka; lat. *praeparatum* = nešto pripremljeno, npr. lek i dr.) (*Vujaklija, 1961, str. 762 i 997*) su lekovite aktivne supstance, pomoćne supstance i ostali proizvodi, koji se koriste za humanu i veterinarsku upotrebu. Farmaceutski oblik leka predstavlja kombinaciju aktivne supstance (*remedium*) i pomoćnih supstanci (*excipientia*) koja je prikladna za primenu. Izbor oblika za aplikaciju neke aktivne supstance zavisi od brojnih faktora kao što su: karakteristika same aktivne supstance i njene stabilnosti, terapijskog cilja, načina doziranja, mesta primene i stanja pacijenta. Jedna aktivna supstanca može biti formulisana u više različitih farmaceutskih oblika.

Farmakopejske monografije o lekovitim preparatima primenjuju se na sve preparate koji su obuhvaćeni tom definicijom. Farmaceutski preparat mora da odgovara zahtevima iste u toku celog perioda roka trajanja, a o naznačenom roku odlučuje ovlašćena ustanova na osnovu eksperimentalnih rezultata dobijenih u studijama stabilnosti.

Lekoviti preparati koje propisuju monografije, podeljeni su u tri grupe prema načinu primene, a ove na vrste i kategorije (*Jugoslovenska farmakopeja 2000, 2001, str. 331*):

1. preparati za oralnu upotrebu:

- *kapsule* (tvrde, meke, gastro–rezistentne i kapsule sa modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance),
- *granule* (šumeće, obložene, gastro–rezistente i granule sa modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance),
- *tečni preparati za oralnu upotrebu* (rastvori, emulzije i suspenzije),
- *praškovi za oralnu upotrebu* i
- *tablete* (neobložene, obložene, šumeće, rastvorljive, disperzibilne, gastro–rezistentne, tablete sa modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance i tablete za primenu u ustima);

2. preparati za kožu/spoljašnju upotrebu:

- *lekovite pene,*
- *tečni preparati za primenu na koži (šamponi i pene–losioni),*
- *štapići–stikovi (uretralni i štapići za unošenje u rane),*
- *praškovi za spoljašnju upotrebu,*
- *polučvrsti preparati za spoljašnju upotrebu (paste i hidrofilni i hidrofobni kremovi, geli i masti) i*
- *transdermalni flasteri i*

3. preparati za specifična mesta aplikacije:

- *preparati za uši (kapi, sprej, praškovi, tamponi, polučvrsti preparati i preparati za ispiranje),*
- *preparati za oči (kapi, losioni, oftalmološki inserti i polučvrsti preparati),*
- *preparati za nos (kapi, tečni sprej, praškovi, štapići, polučvrsti preparati i preparati za ispiranje),*
- *parenteralni preparati (implanti, injekcije, intravenske infuzije, koncentрати i praškovi za injekcije i intravenske infuzije),*
- *preparati pakovani pod pritiskom–aerosoli,*
- *preparati za inhalaciju (tečnosti, praškovi, preparati za raspršivanje i preparati za inhalaciju u inhalatorima pod pritiskom i sa dozatorom),*
- *preparati za irigaciju,*
- *rektalni preparati (supozitorije, kapsule, rastvori, suspenzije, praškovi, tablete, masti, gelovi, pene i tamponi),*
- *lekoviti tamponi,*
- *vaginalni preparati (pesari, tablete, kapsule, pene i tamponi) i*
- *ekstrakti (tečni, meki i suvi).*

Posebno su navedene i obrađene sledeće grupe preparata:

4. radiofarmaceutici,

5. droge,

6. zavojni i hirurški materijali i

7. vakcine, serumi i derivati krvi.

Posebna grupa proizvoda na farmaceutskom tržištu su dijetetski suplementi. To su preparati koji dopunjuju normalnu ishranu i predstavljaju koncentrovane izvore vitamina, minerala ili drugih supstanci sa hranljivim ili fiziološkim efektom pojedinačno ili u kombinaciji, a u prometu su u dizajniranim oblicima, tako da se mogu uzimati u doziranim količinama (kapsule, pastile, tablete, pilule, praškovi, kapi i sl.) (*Jugoslovenska farmakopeja 2000, 2001, str. 1085*).

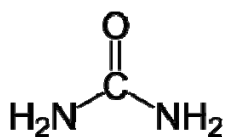
Kvantitativna analiza aktivnih supstanci u farmaceutskim preparatima predstavlja sastavni deo njihove kontrole kvaliteta i veoma je značajna, s obzirom na činjenicu da, pri određenim okolnostima, ovi preparati mogu, ne samo izgubiti aktivno dejstvo i pokazivati smanjenu efikasnost, već mogu pokazivati i toksične efekte.

Mehanizam delovanja aktivne komponente farmaceutskog preparata odnosi se na određene biohemijske ili fiziološke procese, koji izazivaju biološku reakciju. Lekovi uglavnom deluju preko receptora koji se nalaze na površini ćelije ili unutar nje. Važni receptori lekova su celularni proteini, kao što su enzimi, strukturni ili transportni proteini. Brzina odvijanja enzimskih procesa koji metabolišu većinu lekova obično slede kinetiku reakcije prvog reda. Drugim rečima brzina metabolizma srazmerna je koncentraciji leka.

Jetra je glavni organ odgovoran za metabolizam leka. Njena uloga se sastoji u tome da lipofilne nepolarne molekule pretvara u polarnije oblike koji se rastvaraju u vodi. Molekul leka može da se promeni reakcijama koje menjaju njegovu hemijsku strukturu (oksidacija, redukcija ili hidroliza), ili reakcijama koje konjuguju lek (glukuronidacija, sulfatacija), ili i jednim i drugim. Biološkom transformacijom lekova mogu nastati farmakološki aktivni i neaktivni metaboliti. Renalna ekskrecija predstavlja glavni put eliminacije lekova i njihovih metabolita (*Moyer, 1997, str. 891*).

1.1.1. Urea

Urea (karbamid, karbonil diamid) je jedinjenje azota (slika 1) prvi put otkriveno u urinu 1773. godine i prva je organska supstanca koja je veštački sintetisana iz neorganskog materijala 1828. godine. To je netoksična supstanca u obliku belog kristalnog praha ili transparentnih kristala, veoma rastvorna u vodi (51,8 g/100 cm³, 20 °C) i etanolu, praktično nerastvorna u hloroformu i etru. Topi se na temperaturi od 133 °C do 135 °C.



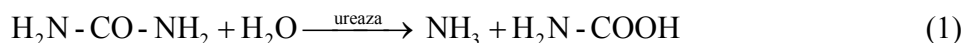
Slika 1. Hemijska struktura uree.

Zahvaljujući svojim karakterističnim svojstvima, urea se koristi u mnogim industrijskim granama za izradu adheziva, vezivnih proizvoda, zaptivnih smesa, smola, lepkova, punioca, katalizatora, humektanata i dehidracionih sredstava. Takođe se koristi kao đubrivo, zatim kao dodatak životinjskoj hrani i kao analitički reagens. Zbog znatne rastvorljivosti u *stratum corneum*-u, urea je važna za njegovu hidrataciju. Bolesti, kao što su, atopični dermatitis ili klinički suva koža su posledica smanjenog sadržaja uree. Za negu i lečenje takve kože koriste se različiti kozmetički proizvodi i dermatološki preparati sa sadržajem uree od 1–10 % (dezodoransi, šamponi, farbe za kosu, skidači boja, tečni sapuni i deterdženti, kreme, losioni itd.) radi pospešivanja rehidratacije. Kao keratolitički agens, urea (20 %) se koristi u preparatima za lečenje bolesti kao što su ihtioza vulgaris, hiperkeratoza dlanova i stopala, kseroza i keratozis pilaris (Robertson i Maibach, 1995, str. 932).

Urea je značajan endogeni proizvod metabolizma belančevina kod sisara. U ćelijama se neprekidno vrše procesi razgradnje hranom unetih proteina do peptida i amino kiselina i procesi sinteze proteina iz amino kiselina unetih u sklopu proteina. Glutamat je ključni molekul u ćelijskom metabolizmu proteina pri kome u telu nastaju amino kiseline kao metaboličko gorivo za druge funkcionalne procese. Ključni proces u degradaciji amino kiselina je reverzibilna reakcija transaminacije, pri čemu se NH₂-grupa amino kiseline donora prenosi na akceptor, odgovarajuću α -keto kiselinu. Kao akseptori amino grupe obično služe tri α -keto kiseline: pirogroždana, koja prelazi u alanin, oksalsirćetna, koja prelazi u asparaginsku i α -ketoglutarna, koja prelazi u glutaminsku. Iz alanina i asparaginske kiseline može nastati glutaminska kiselina dodatnim premeštanjem amino grupa. Ovo je važno jer se na taj način amino azot iz svih amino kiselina, koje podležu procesu transaminacije, može prevesti u glutaminsku kiselinu, iz koje se

procesom oksidativne dezaminacije oslobađa u obliku toksičnog amonijaka. Mehanizmi detoksikacije amonijaka u organizmu čoveka su: sinteza uree, stvaranje amida (glutamina i asparagina), reduktivna aminacija α -ketoglutarne kiseline i produkcija amonijumovih soli. U ovim procesima se oslobađa glutaminska kiselina, koja se putem krvi vraća do perifernih tkiva gde ponovo može da veže amonijak i da ga iz ćelija eksportuje u obliku glutamina.

Biosinteza uree uz pomoć enzima jetre predstavlja glavni put u detoksikaciji oraganizma od amonijaka. Kao rezultat ovog biološkog procesa produkuju se enormne količine uree: organizam svake odrasle osobe izluči u toku godine približno 10 kg uree, uglavnom urinom (> 90 %), a preko gastrointestinalnog trakta i kože veći deo preostale količine. Normalna koža sadrži približno 1 % uree. Poluvreme spontanog razlaganja uree je približno 3,6 godina, ali u prisustvu ureaze, hidroliza uree je 10^4 puta brža. Proizvodi ove reakcije su amonijak i karbaminska kiselina, koja potom spontano hidrolizuje u amonijak i ugljenu kiselinu:



Molekuli amonijaka se pri fiziološkoj vrednosti pH protonuju molekulima vode, a ugljena kiselina disosuje:



Ciklus sinteze uree je od vitalnog značaja za organizam, jer nemogućnost njenog formiranja dovodi do intoksikacije amonijakom koja se prati određenom kliničkom simptomatologijom (povraćanje, pospanost i mentalna retardacija), a potpuno odsustvo nekog od hepatičnih enzima dovodi do smrti.

Klinički značaj određivanja uree u plazmi ili serumu koristi se kao indikator funkcije bubrega i jetre, jer različita oboljenja ovih organa dovode do porasta koncentracije uree u krvi (*Nikolić, 2000, str. 444 i 448; Amtul et al., 2002*).

1.1.1.1. Metode za određivanje uree

Za određivanje uree korišćene su različite metode kao što su kolorimetrija, UV/Vis spektrofotometrija, potenciometrija, fluorimetrija, amperometrija, enzimske metode, HPLC hromatografija sa hidrofilnim interakcijama (HILIC), infracrvena spektrometrija sa Furijeovom transformacijom (FTIR), flow-injection analiza (FIA, protočna analiza injektovanjem),

hemiluminiscencija itd. Pregled nekih od ovih metoda dat je u tabeli 1. Navedene metode se često dele na direktne i indirektne. Direktne procedure su zasnovane na kondenzacionim reakcijama uree sa različitim jedinjenjima (reaktantima ili međuproizvodima) pri čemu nastaju proizvodi koji menjaju karakteristike sistema (boja, pH, apsorbancia, provodljivost itd.). Sve enzimske metode su indirektne procedure. One su degradivne jer počinju sa hidrolizom uree pomoću ureaze (urea amidohidrolaza, EC 3.5.1.5), pri čemu nastaje amonijum jon, koji se može određivati na različite načine. Npr. Berthelot-ova metoda i njena modifikovana verzija, kao i određivanje uree sa glutamat-dehidrogenazom (GLDH ili L-glutamat:NAD(P)⁺ oksidoreduktaza, EC 1.4.1.3) koriste spektrofotometrijski pristup u kvantitativnom merenju amonijaka i danas se primenjuju za rutinsko određivanje uree u kliničkim laboratorijama (Fransis et al., 2002; Fawcett i Scott, 1960; Patton i Crouch, 1977; Majkić-Singh et al., 1995, str. 497; Kavarić i Rakić, 1987, str.89).

Tabela 1. Metode za određivanje uree.

Metoda	Opseg linearnosti	Granica detekcije	RSD (%)	Uzorak	Literatura
HILIC	60 – 140 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	7,5 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	6,70	kozmetički preparati	Dallet et al., 2000
FTIR	0,125 – 0,375 $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}$	0,4 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	< 3,03	krema i vazelin	Otte et al., 2002
Spektrofotometrija	6 – 90 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	0,34 $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-3}$	2,10	dermatološki i kozmetički preparati	Bojić et al., 2008
	do 2 $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$	0,009 $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$	< 2,34	serum, urin	bioMerieux [®] sa
FIA spektrofotometrija	0 – 25 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	0,9 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	/	vina	Gonzalez-Rodriguez et al., 2002
	2 – 12 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$	/	1,40	životinjska plazma	Luca i Reis, 2001
FIA fluorimetrija	1 – 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$	/	3,00	alkoholna pića	Lida et al., 2004
Enzimska spektrofotometrija	50 – 500 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$	2,2 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$	< 6,62	urin serum	Orsonneau et al., 1992
	0 – 100 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$	0,047 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$	< 5,10		
Kinetičko–enzimska spektrofotometrija	0 – 714,3 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ 0 – 142,9 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$	0,066 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$	< 1,15 < 0,58	urin serum	Morishita et al., 1997
Potenciometrija	80 – 20 mg	/	< 0,40	čista supstanca	Villaseñor i Limpert, 1998
	$8,9\cdot 10^{-5}$ – $1,1\cdot 10^{-3}$ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$	/	< 3,50	serum	Sehitogullari et al., 2002

	0,1 – 1,0 mmol·dm ⁻³	/	< 5,60	serum	<i>Correia et al., 2005</i>
Diferencijalna pH–metrija	0 – 30 mg·dm ⁻³	0,3 mg·dm ⁻³	< 4,50	vina	<i>Larcher et al., 2007</i>
	0 – 5000 mg·dm ⁻³	/	< 1,50	mleko	<i>Luzzana i Giardino, 1999</i>
Amperometrija	2·10 ⁻⁵ – 2·10 ⁻⁴ mol·dm ⁻³	5·10 ⁻⁶ mol·dm ⁻³	< 5,60	đubriva	<i>Guilbault i Seo, 1994</i>
Konduktometrija	5 – 70 mmol·dm ⁻³	/	/	serum	<i>Thavarungkul et al., 1999</i>
HPTLC* denzitometrija	10 – 50 μg·cm ⁻³	1,87 μg·cm ⁻³	3,84	farm. preparati	<i>Knorst et al., 1997</i>
Spektrofotometrija	8 – 128 μg·cm ⁻³	5,18 μg·cm ⁻³	2,72	farm. preparati	

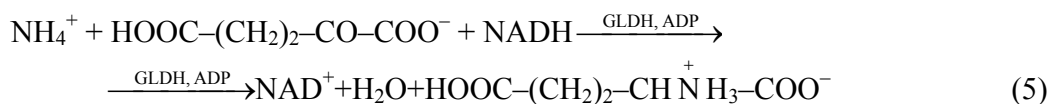
(*) High Performance Thin Layer Chromatography (tankoslojna hromatografija visoke efikasnosti)

Britanska i Jugoslovenska farmakopeja propisuju Kjeldahl-ovu metodu kao zvaničnu metodu za određivanje uree u dermatološkim i kozmetičkim preparatima (*British Pharmacopoeia, 2005, str. 1480; Jugoslovenska farmakopeja 2000, 2001, str. 1053*).

1.1.1.1.1. Kinetičko–spektrofotometrijska (enzimska) metoda

Ova metoda se zasniva na dvostrukoj enzimskoj katalizi i primeni Warburg-Christianovog optičkog testa. Koristi sistem koji sadrži ureazu i glutamat dehidrogenazu (GLDH) koja sadrži NAD ili NADP kao koenzim. Optički test se bazira na osobini redukovanih oblika piridin-koenzima (NADH₂ ili NADPH₂) da apsorbuju svetlost talasnih dužina 340–360 nm, dok njihovi oksidovani oblici (NAD ili NADP) ne apsorbuju svetlost u ovom području. Promena intenziteta apsorpcije svetlosti na 340 nm odražava brzinu katalizovane reakcije, a metode u kojima se primenjuje ovaj test spadaju u kinetičke procedure.

Dakle, oslobođeni amonijak, koji nastaje u reakciji razlaganja uree pomoću ureaze (jednačina 1), određuje se prema reakciji (jednačina 5) sa 2-ketoglutaratom i redukovanim koenzimom NADH (nikotinamid-adenin-dinukleotid), koju katalizuje enzim GLDH i pri čemu nastaje glutaminska kiselina i oksidovani oblik koenzima NAD⁺:

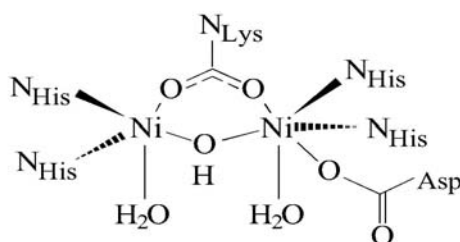


Adenozindifosfat (ADP) se dodaje da aktivira i stabilizuje GLDH. Meru za količinu prisutnog amonijaka nastalog razlaganjem uree predstavlja opadanje apsorbanca, koja je proporcionalna količini utrošenog NADH. U ovoj reakciji ne interferiraju druga azotna jedinjenja, bilirubin,

hemoglobin i lipemija. Preciznost metode je odlična, a primenjljiva je i za rad na automatskim analizatorima, što je čini metodom izbora za određivanje uree (*Hallet i Cook, 1971; Gutman i Bergmeyer, 1974, str. 1794*).

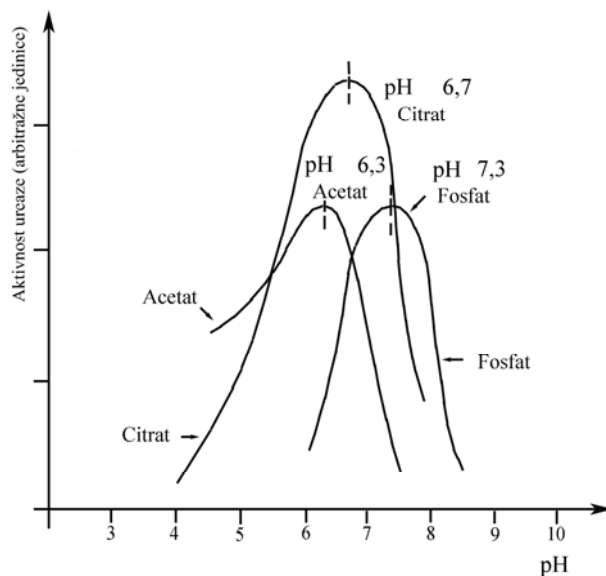
Ureaza

Ureaza je značajna u istoriji enzimologije kao prvi enzim koji je izolovan i prekrystalisan (James Sumner, 1926.). Pripada grupi metaloenzima i sastoji se iz dve polujedinice koje su čvrsto povezane kovalentnim vezama i ima dva aktivna centra (slika 2).



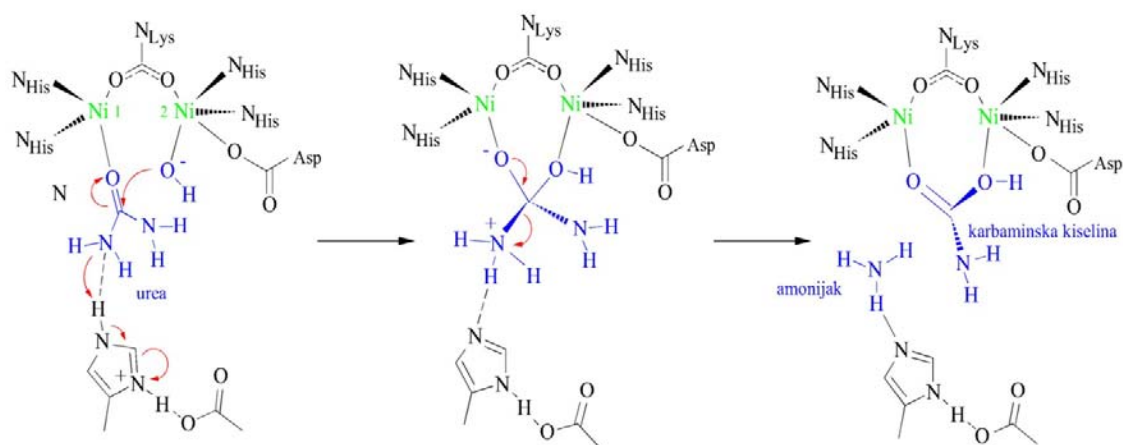
Slika 2. Aktivni centar ureaze.

Svaki aktivni centar sadrži dva atoma nikla povezana preko karboksilatne grupe karboksilatnog ostatka lizina (Lys) i hidroksidnog jona. Jedan atom nikla (Ni1) organizovan je u kvadratno piramidalnoj geometriji sa koordinacionim brojem pet, a drugi atom nikla (Ni2) u pseudooktaedarnoj geometriji sa koordinacionim brojem 6. Ni1 vezuje dva molekula histidina preko atoma azota iz svakog od imidazolovih prstena, a preko kiseonikovih atoma vezuje molekule lizina i vode, kao i hidroksidnu grupu. Ni2 vezuje dva molekula histidina preko atoma azota iz svakog od imidazolovih prstena, a preko kiseonikovih atoma vezuje molekule Lys, vode, asparagina i hidroksidnu grupu. Aktivni centar je visoko specifičan i vezuje samo ureu ili hidroksiureu, a optimalna pH vrednost za aktivnost ureaze je 7,3 u fosfatnom puferu (slika 3).



Slika 3. Kriva aktivnosti ureaze u zavisnosti od pH sredine (Moss et al., 1997, str. 366).

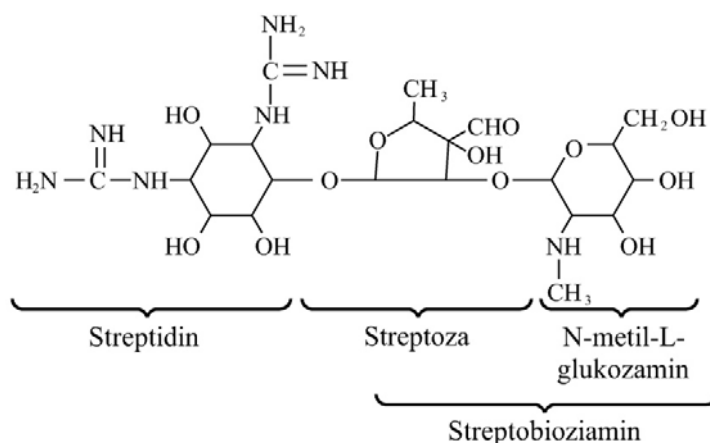
Prema jednom od mogućih mehanizama razgradnje uree pomoću ureaze, Ni1 reaguje kao Lewis-ova kiselina. Metalni jon polarizuje karbonilnu grupu uree i aktivira je prema nukleofilnom napadu. U ovom procesu su dva molekula vode zamenjena jednim molekulom uree. Drugi atom nikla (Ni2) vezuje OH⁻ jon, koji napada parcijalno pozitivno naelektrisan ugljenik iz karbonilne grupe molekula uree. Jedna od dve amino grupe uree se protonuje. Histidin ima ulogu kiseline. Rezultat reakcije je formiranje amonijaka i karbaminske kiseline, koja se spontano razgrađuje na amonijak i ugljen-dioksid (slika 4) i (jednačine 1–4).



Slika 4. Mehanizam razgradnje uree pomoću ureaze.

1.1.2. Streptomycin

Streptomycin sulfat (SMS) je prvi otkriveni aminoglikozidni antibiotik i prvi antibiotik dobijen iz bakterije. Izolovan je iz soja *Streptomyces griseus* 1944. godine. Streptomycin se, prema hemijskoj strukturi, sastoji od streptidina i streptobiozamina (slika 5). Streptidin je aglikon i derivat je inozitola sa dve guanidinske grupe (1,3-diguanidino-2,4,5,6-tetrahidroksi-cikloheksan). Streptobiozamin je disaharid izgrađen od dve šećerne komponente: furanoidne streptoze i *N*-metil-2-glukozamina, koji su povezani α -glikozidnom vezom. Veza između streptidina i streptobiozamina je takođe α -glikozidna. Streptoza sadrži slobodnu aldehydnu grupu na C-3 položaju. SMS je beli prah, bez mirisa, higroskopan, ali stabilan na uticaj svetlosti i vazduha. Dobro je rastvoran u vodi, vrlo slabo rastvoran u alkoholu i praktično nerastvoran u većini ostalih organskih rastvarača. Proizvodi se u obliku sulfatne soli zbog veće rastvorljivosti. Vodeni rastvori SMS pokazuju slabo kiselu ili skoro neutralnu reakciju i mogu biti čuvani na sobnoj temperaturi nedelju dana bez gubitka dejstva. Zagrevanjem rastvora dolazi do razlaganja streptomicina. Takođe, jake kiseline i alkalije mogu da izvrše inaktivaciju streptomicina.



Slika 5. Hemijska struktura streptomicina: *di[O-2-deoksi-2-metilamino- α -L-glukopiranozil-(1 \rightarrow 2)-O-5-deoksi-3-C-formil- α -L-liksofuranozil-(1 \rightarrow 4)-N, N'-diamidino-D-streptamin]*.

SMS se koristi u lečenju infekcija u humanoj i veterinarskoj medicini, kao i u oblasti agrikulture. Klinička primena se sastoji u tretiranju mikobakterijskih infekcija (tuberkuloze, meningitisa i dr.) u dnevnoj dozi od 0,5–1 g (30 mg/kg/d). Takođe se koristi u lečenju netuberkuloznih uzročnika kao što su: kuga, tularemija, bruceloza i dr. u dnevnoj dozi od 1g. U kombinaciji sa penicilinom primenjuje se kod lečenja infektivnog endokarditisa izazvanog enterokokama. SMS se slabo apsorbuje iz gastrointestinalnog trakta, a nakon intramuskularnog davanja njegova koncentracija u krvi se postiže izuzetno brzo (nakon 1–2 sata). Ona je proporcionalna dozi i u toku 5 časova opada ~ 50 %. SMS se vezuje za proteine plazme približno 20–30 %, metaboliše u bubrezima i izlučuje se nepromenjen u mokraći 30–90 % od parenteralne doze u toku 24 sata. Najozbiljniji toksični efekat koji uzrokuje SMS je narušavanje vestibularne funkcije (vertigo i gubitak ravnoteže). Frekventnost i ozbiljnost ovog disbalansa proporcionalni

su dužini administracije leka, nakon prestanaka terapije dolazi do delimičnog oporavka narušenih funkcija. Istovremenu ili sekvencijalnu upotrebu drugih aminoglikozida sa streptomycinom treba izbegavati, da bi se smanjila mogućnost ototoksičnog delovanja (Jawetz, 1995, str. 699; Moffat, 1986, str. 976).

1.1.2.1. Metode za određivanje streptomicina

Streptomycin je određivan različitim metodama kao što su spektrofotometrija, spektrofotometrija, hemiluminiscencija, HPLC sa različitim detektorima, imunohemijska detekcija, kapilarna elektroforeza i dr. Pregled nekih od ovih metoda dat je u tabeli 2.

Tabela 2. Metode za određivanje streptomicina.

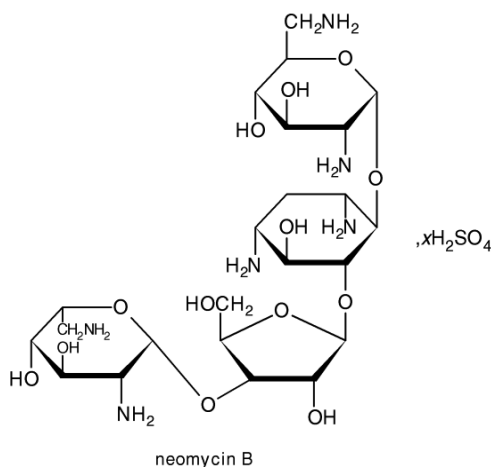
Metoda	Opseg linearnosti	Granica detekcije (LOD)	RSD (%)	Uzorak	Literatura
Kinetičko-spektrofotometrijska	0,15 – 1,94 1,94 – 15,48 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	0,02 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	< 9,30	injekcija	Mitić et al., 2006
Spektrofotometrija	1,87 – 279,8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	0,96 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	2,40	farm. preparati	Li i Gao, 2008
	0,8 – 4,0 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	/	/	lekovi	Sastry et al., 1998
	0,005 – 0,4 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	0,1 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	/	farm. preparati	Aman et al., 1995
	8 – 80 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	/	/	farm. preparati	Zakhari et al., 1990
Derivativna spektrofotometrija	do 30 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	0,42 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	/	injekcija	Morelli et al., 1994
Hemiluminiscencija	5 – 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	1,4 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	2,10	plazma	Huang et al., 2001
	$8,66\cdot 10^{-9} - 1,72\cdot 10^{-6}$ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$	$5,16\cdot 10^{-9}$ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$	1,94	mleko	Wan et al., 2006
LC sa fluorescentnim detektorom	0–2000 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	8 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	15,60	mleko	Suhren i Knappstein, 1998
HPLC sa fluorimetrijskim detektorom	10 – 400 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	0,005 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	< 3,50	med	Edder i Corvi, 1999
	5 – 40 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	1 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	2,75	serum	Kubo et al., 1987
Spektrofluorimetrija	5 – 60 ppm	/	/	farm. preparati	Rizk et al., 1995
	0,025 – 0,4 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	0,006 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	/	farm. preparati, plazma	Belal et al., 2001
HPLC	10 – 80 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	< 6,40	serum	Granados i Meza, 2007
	5 – 50 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	2 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	2,07	serum	Kurosawa et

					<i>al., 1985</i>
	24 – 240 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	2 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	1,10	/	<i>Whall, 1981</i>
Enzimaska imuno analiza	0,1 – 30 $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-3}$	5,1 $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-3}$ (mleko)	/	mleko, tkiva	<i>Haasnoot et al., 1999</i>
Kapilarna elektroforeza	0,05 – 1 $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}$	10 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	0,21- 0,44	/	<i>Flurer, 1995</i>
	20 – 200 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	6 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	0,22	baktericid i	<i>Maia et al., 2007</i>

Britanska i Jugoslovenska farmakopeja propisuju mikrobiološku difuzionu metodu za određivanje streptomicina (*British Pharmacopoeia, 2005, str. 1356; Jugoslovenska farmakopeja 2000, 2001, str. 959*).

1.1.3. Neomicin

Neomicin sulfat (NMS), izolovan rastom određenih sojeva *Streptomyces fradiae* 1949. godine, predstavlja smešu dva izomera, neomicina B i neomicina C, čiji je glavni sastojak neomicin B (slika 6). Neomicini B i C su glikozidi neamina (neomicin A) i neobiozamina B ili C. Centralni deo molekula neomicina je 2-dezoksistreptamin, aglikon koji je vezan za jedan monosaharidni i jedan disaharidni deo. Neomicin B se razlikuje od neomicina C po stereochemiji šećera vezanog terminalno za D-ribozu (*Hanko i Rohrer, 2007; Adams et al., 1998*). NMS je bela ili bledo žuta kristalna supstanca, higroskopna i fotosenzitivna, ali stabilna u širem intervalu pH. Vrlo lako je rastvorljiva u vodi, teško rastvorna u alkoholu, a gotovo nerastvorljiva u acetonu i etru.



Slika 6. Hemijska struktura neomicina B: 4-O-(2,6-diamino-2,6-dideoksi- α -D-glukopiranozil)-5-O-[3-O(2,6-diamino-2,6-dideoksi- β -L-idopiranozil)- β -D-ribofuranozil]-2-deoksi-D-streptamin.

Parenteralna primena neomicina je napuštena zbog njegove izrazite toksičnosti i njegova upotreba je ograničena na površinsku aplikaciju (inficirane površine, apscesi i dr.) i oralnu (kod hepatične kome, hiperlipidemije i dr.). Ukupan sadržaj leka u prvom slučaju je ograničen na 15 mg/kg/d, jer može dovesti do sistemske toksičnosti zbog njegove apsorpcije. Ukupan sadržaj leka u drugom slučaju je 1 g na svakih 6–8 sati u toku 1–2 dana. Lek se neznatno apsorbuje iz gastrointestinalnog trakta i ekskretuje se fecesom. Eventualno apsorbovane količine se izbacuju preko bubrega u urin (*Jawetz, 1995, str. 699; Brody et al., 1998, str. 288*).

1.1.3.1. Metode za određivanje neomicina

Neomicin je određivan različitim metodama kao što su spektrofotometrija, spektrofluorimetrija, hemiluminiscencija, HPLC sa različitim detektorima, imunoheмиjska detekcija, gasna hromatografija, kapilarna elektroforeza (CE), kapilarna izotahoforeza (cITP) i dr. Pregled nekih od ovih metoda dat je u literaturi (*Stead, 2000*) i u tabeli 3.

Tabela 3. Metode za određivanje neomicina.

Metoda	Opseg linearnosti	Granica detekcije (LOD)	RSD (%)	Uzorak	Literatura
Potenciometrija–mikrobiologija	0,17 – 3,33 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	0,05 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	/	krv, plazma	<i>Simpson i Kobos, 1983</i>
Spektrofotometrija	/	/	2,10	farm. preparati	<i>Gupta et al., 1983</i>
	$1,7\cdot 10^{-4}$ – $1,9\cdot 10^{-3}$ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$	/	1,00	farm. preparati	<i>Confino i Bontchev, 1990</i>
	0,8 – 28 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	/	0,89	farm. preparati	<i>Amin, 1996</i>
	10 – 55 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	/	/	farm. preparati	<i>Marques et al., 1989</i>
	6,15 – 28,68 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	1,22 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	< 1,71	farm. preparati	<i>Sunarić et al., 2007</i>
HPAEC–IPAD*	4 – 200 pmol	0,21 pmol	/	farm. preparati	<i>Hanko i Rohrer, 2007</i>
HPLC	0,45 – 4,0 $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}$	/	< 1,00	farm. preparat	<i>Tsuji et al., 1979</i>
	0,25 – 1 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ 1 – 10 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	/	4,40	plazma, urin	<i>Shaikh et al., 1991</i>
	75 – 125 %	/	< 1,00	mast (farm. preparat) veterinarske formulacije	<i>Binns i Tsuji, 1984</i>
HPLC–ESLD**	2 – 50 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ (logaritamska kalibraciona)	0,6 $\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$	1,70	farm. preparati	<i>Megoulas i Koupparis, 2004</i>
Tečna hromatografija	5 – 160 % (od 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)	/	< 1,30	farm. preparati	<i>Adams et al., 1997</i>
GLC***	3,0 – 4,6 mg	/	< 2,0	mast (farm. preparat)	<i>Van Giessen i Tsuji 1971</i>
Mikrobiologija (difuziona metoda)	0,5 – 2,5 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	/	/	serum	<i>Van Soestbergen 1969</i>
Spektrofluorimetrija–kinetika	0,07 – 1 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ 1 – 70 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	0,02 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	< 1,80	farm. preparati	<i>Gala et al., 1995</i>
	0,05 – 20 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ 20 – 70 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	0,03 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	< 1,30	farm. preparati	<i>Gala et al., 1995</i>
Kolorimetrija	0,4 – 58 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	0,04 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	< 1,19	farm. preparati	<i>Amin i Issa,</i>

					2003.
	0,5 – 5 mg·cm ⁻³	/	/	farm. preparati	<i>Agrawl et al., 1976</i>
CE–UV	0,76 – 1,26 mg·cm ⁻³	/	< 2,70	masti	<i>Huidobro et al., 2009</i>
(cITP) sa konduktometrijom	10 – 100 mg·dm ⁻³	5,69 mg·dm ⁻³	< 2,10	farm. preparati	<i>Kurzawa et al., 2009</i>
HILIC–MS–MS (LC–MS)	0,1 – 5 µg·cm ⁻³	/	< 7,90	serum	<i>Oertel et al., 2004</i>
LC	0,2 – 1 mg·kg ⁻¹	0,1 mg·kg ⁻¹	< 7,90	tkiva	<i>Posyniak, 2001</i>

(*) High Performance Anion Exchange Chromatography with Integrated Pulsed Amperometric Detection (hromatografija anjonske izmene visoke efikasnosti sa integrisanom pulsnom amperometrijskom detekcijom),
(**) Evaporative Light Scattering Detection (detekcija rasutog zračenja),
(***) Gas Liquid Chromatography (gasno – tečna hromatografija).

Britanska i Jugoslovenska farmakopeja propisuju mikrobiološku difuzionu metodu za određivanje neomicina (*British Pharmacopoeia, 2005, str. 957; Jugoslovenska farmakopeja 2000, 2001, str. 751*).

1.1.3.1.1. Mikrobiološka metoda

Aktivnost antibiotika se procenjuje poređenjem inhibicije rasta osetljivih mikroorganizama pod dejstvom poznatih koncentracija ispitivanog antibiotika i standardnog preparata. Standardni preparati su supstance čija je aktivnost precizno određena u odnosu na odgovarajući internacionalni standard ili internacionalni referentni preparat.

Određivanje mora biti planirano na način koji omogućava validaciju matematičkog modela, na kome se zasniva jednačina za izračunavanje aktivnosti. Ukoliko se izabere paralelno linijski model, dve log doza-odgovor (ili transformisan odgovor) linije ispitivanog i standardnog preparata moraju biti paralelne, linearne i izvan opsega doza korišćenih u obračunu. Ovi uslovi moraju biti verifikovani testovima validacije za datu verovatnoću, obično $P = 0,05$. Drugi matematički modeli, kao model odnosa nagiba, mogu da se koriste pod uslovom da je pružen dokaz o validnosti. Ukoliko u monografiji nije drugačije propisano, granice pouzdanosti tj. granice greške ($P = 0,95$) su od 95–105 % od izračunate aktivnosti. Jedan od načina izvođenja ogleđa je metoda difuzije.

Metoda difuzije

Potrebna količina odgovarajuće podloge se rastopi i zaseje na pogodnoj temperaturi, na primer 48–50 °C za vegetativne oblike, poznatom količinom suspenzije mikroorganizama, osetljivih na ispitivani antibiotik. Pod dejstvom antibiotika korišćenih u određivanju, treba da se formiraju dovoljno velike i jasno definisane zone inhibicije. Podloga se promeša i odmah razlije u

Petrijeve šolje ili velike četvrtaste posude. Tom prilikom se obrazuje sloj podloge debljine 2–5 mm. Druga mogućnost je upotreba dvoslojnih podloga. U tom slučaju zasejava se samo gornji sloj podloge. Površina podloge, u momentu upotrebe, treba da bude suva i bez primetnog rasta ili odumiranja mikroorganizama.

Koristeći odgovarajući rastvarač ili rastvor pufera pripreme se rastvori standardnih preparata i ispitivanog antibiotika u poznatim koncentracijama pod pretpostavkom da su istih aktivnosti. Rastvori se nanose na površinu podloge pomoću sterilnih cilindara od porcelana, nerđajućeg čelika ili nekog drugog pogodnog materijala. Mogu da se nanose u otvore napravljene na podlozi. U svaki cilindar ili otvor nanosi se ista količina rastvora. Alternativno se mogu koristiti papirnati diskovi od sterilnog apsorbujućeg papira odgovarajućeg kvaliteta, tako što se impregniraju rastvorima standardnog preparata ili ispitivanog antibiotika i ređaju na površinu zasejane hranljive podloge.

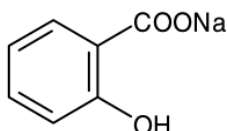
U cilju procene validnosti određivanja, koriste se najmanje tri doze standardnog preparata i tri doze ispitivanog antibiotika. Pretpostavljene aktivnosti doza ispitivanog antibiotika i standardnog preparata su iste. Daje se prednost korišćenju serije doza u geometrijskoj progresiji. Kada se linearnost sistema potvrdi odgovarajućim brojem eksperimenata kroz ogled tri-tačke, u rutinskim analizama može se primeniti ogled dve tačke, ukoliko odobre ovlašćena lica ili ustanova. U svim spornim slučajevima mora se primeniti ogled tri-tačke.

Pripremljeni rastvori se nanose u Petri šolje ili četvrtaste posude prema statistički pogodnom dizajnu. Rastvori ispitivanog antibiotika i standardnog preparata se raspoređuju tako da se izbegne interakcija koncentrovanijih rastvora. Vreme inkubacije na propisanoj temperaturi traje oko 18 h. Predifuzija traje obično 1–4 h na sobnoj temperaturi ili na oko 4 °C, kako bi se smanjio uticaj vremena potrebnog za nanošenje rastvora i poboljšao nagib regresionog pravca.

Prečnici zona inhibicija se mere sa preciznošću od najmanje 0,1 mm. Mogu se meriti i površine zona inhibicija sa odgovarajućom preciznošću. Aktivnost se izračunava pogodnom statističkom metodom. U cilju obezbeđenja zahtevane preciznosti određivanja, mora se koristiti dovoljan broj ponavljanja za svaku dozu. Određivanje se može ponoviti, a rezultati statistički kombinovati. Tako se dobija garancija da aktivnost ispitivanog antibiotika nije ispod zahtevanog minimuma (*Jugoslovenska farmakopeja 2000, 2001, str. 100*).

1.1.4. Natrijum salicilat

Natrijum salicilat (NaS), natrijumov estar salicilne kiseline (slika 10), pripada grupi nesteroidnih anti-inflamatornih lekova. NaS je jedan od nekoliko analoga acetilsalicilne kiseline (aspirina) koji se klinički koristi. Zbog metaboliziranja acetilsalicilata do salicilata, ovo neacetilovano jedinjenje ima slične farmakološke efekte kao aspirin u tretiranju inflamatornih bolesti kao što su osteoartritis i reumatoidni artritis. Ovaj lek predstavlja potencijalnu zamenu za aspirin kod ljudi alergičnih na njega (*Baranovskii i Bolotin, 2007; Brody et al., 1998, str. 415*). NaS se oralno daje u dozi do 10 g/d. Vezuje se za proteine plazme 50–90 %. Izlučuje se u nepromenjenom obliku kroz urin (*Moffat, 1986, str. 966*). Uprkos korišćenju salicilata kao antipiretika i analgetika, oni mogu biti prilično toksični ukoliko se koriste u velikim dozama. Kada je koncentracija salicilata u krvi veća od $2,2 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ($300 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$), on postaje toksičan, što zahteva praćenje koncentracije u serumu. Efikasan terapijski opseg se kreće od 1,1 do $2,2 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ($150\text{--}300 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$), što je veoma blizu granice toksičnosti, dok se preporučena terapijska doza ukupnih salicilata u plazmi kreće od 0,15 do $2,1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Koncentracija salicilata veća od $4,3 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (600 mg/l) se smatra smrtonosnom (*Junior et al., 2000; Smith i Smith, 1966; Stewart i Watson, 1987*). Salicilat se takođe koristi kao konzervans u proizvodnji hrane i pića, ali je njegovo korišćenje u ove svrhe u nekim zemljama zbog toksičnosti zabranjeno (*Swain et al, 1985*). Aspirin spada u najveće uzročnike slučajnog trovanja kod dece (*Proudfoot, 1983*). Američka asocijacija za kontrolu otrova je objavila da je u 2000. godini 1 % svih trovanja i 5,6 % svih smrtnih slučajeva bilo uzrokovano salicilatima (*Litovitz et al., 2001*).



Slika 10. Hemijska struktura natrijum salicilata:
natrijum-2-hidroksibenzenkarboksilat.

NaS je supstanca u obliku belog kristalnog praha ili sitnih bezbojnih kristala ili sjajnih pahuljica. Sadrži karboksilni anjon u položaju 1 i hidroksilnu grupu u položaju 2 benzenovog prstena, što ga čini potpuno rastvornim u vodi. Slabo se rastvara u alkoholu, a praktično je nerastvoran u etru i hloroformu (*Jugoslovenska farmakopeja 2000, 2001, str.774*).

1.1.4.1. Metode za određivanje natrijum salicilata

Najčešće korišćena metoda za određivanje salicilata zasnovana je na Trinderovoj reakciji: salicilati iz rastvora reaguju sa feri jonima i grade purpurni kompleks u kiselj sredini (*Trinder,*

1954). U ovoj reakciji se koristi i merkuri hlorid, koji je veoma toksičan (Stojanović et al., 1984, str. 650–651). Za određivanje natrijum salicilata korišćene su različite metode kao što su kolorimetrijske, spektrofotometrijske, spektrofluorimetrijske, enzimске, amperometrijske, potenciometrijske, polarografske, HPLC. Pregled nekih od ovih metoda dat je u tabeli 5.

Britanska Farmakopeja daje potenciometrijsku metodu za određivanje NaS titracijom perhlornom kiselinom (*British Pharmacopoeia*, 2005, str. 1313).

Tabela 5. Metode za određivanje natrijum salicilata.

Metoda	Opseg linearnosti	Granica detekcije (LOD)	RSD (%)	Uzorak	Literatura
Kolorimetrija	do 5 mmol·dm ⁻³	/	/	serum	Chubb et al., 1986
Derivativna spektrofotometrija	0 – 36 µg·cm ⁻³	/	< 2,00	farm. preparati	Tobias, 1983
Spektrofotometrija	do 1,4 µmol·dm ⁻³	6,5 nmol·dm ⁻³	/	urin, plazma	Bouvrette i Luong, 1996
Spektrofluorimetrija	0,1 – 0,3 µg·cm ⁻³	0,05 µg·cm ⁻³	/	serum	Damiani et al., 2002
	0,1 – 8 mmol·dm ⁻³	/	5,90	plazma	Gupta i Zamkanej, 1990
Enzimska	do 700 µg·cm ⁻³	15,7 µg·cm ⁻³	< 4,50	serum	You i Bitikofer, 1984
Amperometrija	do 7 mmol·dm ⁻³	/	/	puna krv	Frew et al., 1989
	2,3·10 ⁻⁶ – 1,4·10 ⁻⁵ mol·dm ⁻³	/	< 7,00	serum	Junior et al., 2000
Potenciometrija	1·10 ⁻⁵ – 1·10 ⁻¹ mol·dm ⁻³	5·10 ⁻⁶ mol·dm ⁻³	/	farm. preparati	Ardakani et al., 2007
	6·10 ⁻⁶ – 1·10 ⁻¹ mol·dm ⁻³	2·10 ⁻⁶ mol·dm ⁻³	/	farm. preparati	Xu et al., 2005
Polarografija	do 620 µg·cm ⁻³	/	< 6,50	serum	You, 1985
HPLC	0 – 400 µg·cm ⁻³ 0,2 – 4 mg·cm ⁻³ (ukupni salicilati)	/	7,90	plazma	Buskin et al., 1982
HPLC sa fluorescentnom detekcijom	1– 500 µg·dm ⁻³	1 µg·dm ⁻³	/	pijaća voda za životinje	Zuidema et al., 2006

1.1.4.1.1. Osnovi Fenton-ove reakcije

Fenton-ova hemija obuhvata reakcije peroksida (uglavnom H_2O_2) u prisustvu gvožđa i dobijanje visoko reaktivnih vrsta kao što su hidroksi radikali koji oksiduju organska ili neorganska jedinjenja prisutna u sistemu. Istorija Fenton-ove hemije počinje 1894. godine kada Henry J. Fenton saopštava da H_2O_2 može da se aktivira prisustvom soli Fe(II) i da pri tome oksiduje tartarnu kiselinu. Nakon toga, Fenton-ova i srodne reakcije postale su veoma značajne u sintezi, biološkoj hemiji, hemiji prirodnih i tretmanu otpadnih voda. Mehanizam ove reakcije je veoma složen, i još nedovoljno ispitan, a najčešće se prikazuje sledećim reakcijama (*Pignatello et al., 2006*):



Nagrađeni Fe^{3+} joni mogu dalje reagovati sa H_2O_2 u tzv. "Fenton-like" reakcijama u kojima se regeneriše Fe^{2+} , podržavajući na taj način Fenton-ov proces:



Reakcija (9) je za nekoliko redova veličine sporija od reakcije (6). Međutim, postoje drugi načini za redukciju Fe^{3+} do Fe^{2+} :



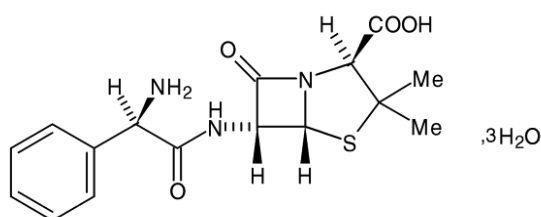
Hidroksi radikali, prisutni u veoma malim koncentracijama, reaguju na dobro poznat način sa organskim jedinjenjima, oduzimanjem vodonika iz C–H, N–H ili O–H veza, dodavanjem vodonika na C=C veze, ili adicijom na aromatične prstenove:



Kada je prisutan veliki višak H_2O_2 , ukupno Fe^{2+} dodato na početku reakcije biće brzo oksidovano do Fe^{3+} i nakon toga sistem će se ponašati nezavisno od početnog oksidacionog stanja gvožđa.

1.1.5. Ampicilin

Ampicilin (Amp) je semisintetski penicilinski antibiotik širokog spektra delovanja na gram–pozitivne mikroorganizme, osetljive i na druge peniciline, dok je aktivniji od drugih penicilina na neke gram–negativne bakterije i enterokokne infekcije. Ampicilin je u komercijalnoj upotrebi od 1961. godine u obliku farmaceutskih preparata kao što su kapsule, tablete, prašak za oralnu suspenziju, prašak za injekcije i intravenozne infuzije. Amino grupa u strukturi ovog leka (slika 7) omogućava njegovo prodiranje u spoljašnju membranu gram–negativne bakterije što ga razlikuje od ostalih penicilina.

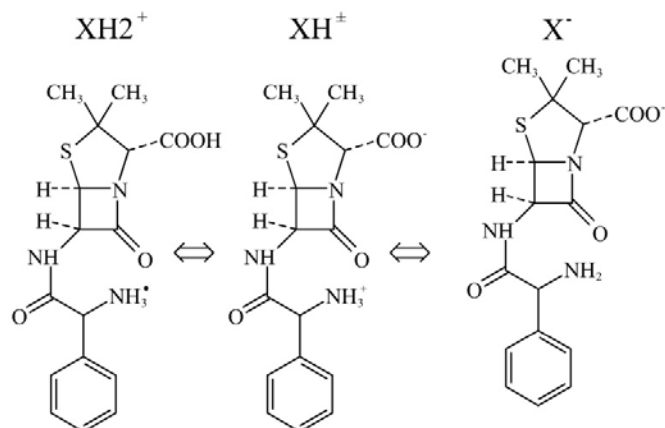


Slika 7. Hemijska struktura ampicilin trihidrata:
(2*S*, 5*R*, 6*R*)- [(*R*)-2-amino-2-fenilacetamido]-3,3-dimetil-
7-okso-4-tia-1-azabicyklo[3.2.0] heptan-2-karboksilna kiselina.

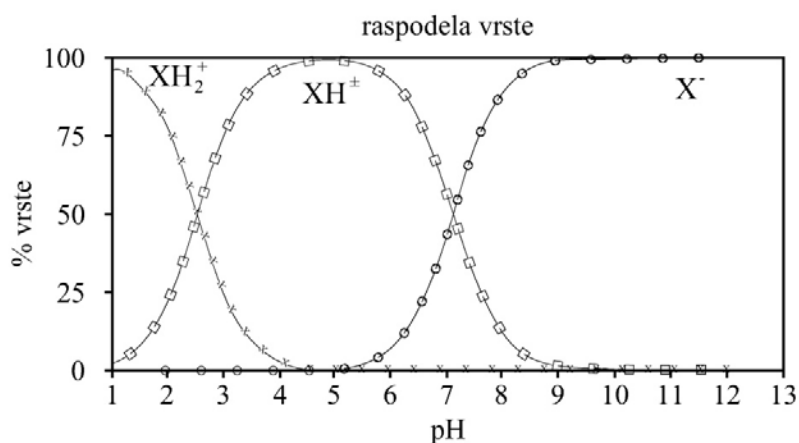
Ampicilin trihidrat je beli kristalni prah rastvoran u vodi, a praktično nerastvoran u etanolu, acetonu, ugljen tetrahloridu, hloroformu i etru. Rastvara se u razblaženim rastvorima kiselina i alkalnih hidroksida. Može da izazove alergijske reakcije u vidu svraba do visokog intenziteta u vidu anafilaktičkog šoka.

Terapeutska koncentracija ampicilina u plazmi dostiže vrednost od 2,65 do 4 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ nakon 2 h od oralne primene 500 mg leka. Približno 20 % se vezuje za proteine plazme, a ~ 30 % se ekskretuje u urin u nepromenjenom obliku tokom prvih 6 sati, dok se nakon parenteralne administracije ekskretuje čak 75 % u nepromenjenom obliku (*Moffat, 1986, str. 351*).

Prisustvo bazne amino i kisele karboksilne grupe omogućava ampicilinu da u neutralnoj sredini postoji u obliku zwitter-jona HX^{\pm} (slika 8 i 9). Upravo ova amfoterna priroda mu ograničava oralnu apsorpciju. U baznoj sredini je u obliku anjona X^{-} , a u kiseljoj sredini je u obliku katjona H_2X^{+} . Ima dve konstante disocijacije. Konstanta K_1 odgovara disocijaciji katjona koji gubi proton iz COOH grupe pri čemu nastaje zwitter-jon, a K_2 odgovara disocijaciji zwitter-jona koji gubi proton iz amino grupe i nastaje anjon X^{-} .



Slika 8. Ampicilin: jonizacija zwitter-jona.



Slika 9. Raspodela jonizovanih oblika ampicilina u zavisnosti od pH vrednosti rastvora.

1.1.5.1. Metode za određivanje ampicilina

Amp je određivan različitim metodama kao što su kolorimetrija, spektrofotometrija, spektrofluorimetrija, FIA, HPLC, polarografija, NMR i druge. Pregled nekih od ovih metoda dat je u tabeli 4.

Britanska i Jugoslovenska farmakopeja propisuju tečnu hromatografiju za određivanje ampicilina (*British Pharmacopoeia*, 2005, str. 85; *Jugoslovenska farmakopeja* 2000, 2001, str. 42).

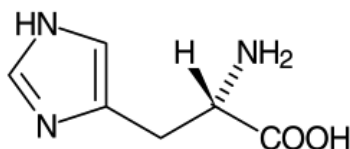
Tabela 4. Metode za određivanje ampicilina.

Metoda	Opseg linearnosti	Granica detekcije (LOD)	RSD (%)	Uzorak	Literatura
Spektrofotometrija	8 – 140 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	/	0,70	farm. preparati	<i>Devani et al., 1992</i>
	5 – 50 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	/	/	farm. preparati	<i>Smith et al., 1967</i>
	0,8 – 4 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	/	/	farm. preparati	<i>Sastry et al., 1998</i>
	20 – 100 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	/	0,44	farm. preparati	<i>Mahgoub i Ali, 1998</i>
	0,5 – 21 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	/	1,30	farm. preparati	<i>Amin et al., 1994</i>
Kolorimetrija	6 – 30 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	/	< 2,00	farm. preparati	<i>El-Shafie et al., 1996</i>
Kinetička spektrofotometrija	8 – 40 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	0,73 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	/	farm. preparati	<i>Belal et al., 2000</i>
Tečna hromatografija	0,5 – 8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	0,01 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	< 3,20	plazma	<i>Nelis et al., 1992</i>
HPLC	10 – 100 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	5 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	< 4,68	urin	<i>El-Sebai et al., 1988</i>
	0,2 – 4 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ 5 – 25 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	/	< 3,57	plazma	<i>Akhtar et al., 1993</i>
	0,19 – 9,41 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	/	/	serum	<i>Ishida et al., 1999</i>
	5 – 600 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	1,8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	< 0,70	farm. preparati	<i>Tsou et al., 2007</i>
	1 – 50 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$	0,6 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$	< 5,00	tkiva	<i>Luo et al., 1997</i>
Spektrofluorimetrija	0,01 – 15 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	0,003 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	< 1,10	mleko	<i>Gala et al., 1997</i>
	2 – 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$	4 · 10 ⁻⁷ mol · dm ⁻³ 5,2 · 10 ⁻⁷ mol · dm ⁻³ (FIA)	4,60	farm. preparati	<i>Fernández-González et al., 2003</i>
FIA	2 · 10 ⁻⁵ – 6 · 10 ⁻⁴ mol · dm ⁻³	8 · 10 ⁻⁶ mol · dm ⁻³	0,16	farm. preparati	<i>Garcia et al., 1994</i>
	70 – 450 mg · dm ⁻³	50 mg · dm ⁻³	4,20	farm. preparati	<i>Al-Momani, 2004</i>
	0,26 · 10 ⁻⁶ – 2 · 10 ⁻⁴ mol · dm ⁻³ 2,1 · 10 ⁻⁶ – 2 · 10 ⁻⁶ mol · dm ⁻³ (FIA)	0,26 · 10 ⁻⁶ mol · dm ⁻³ 2,1 · 10 ⁻⁶ mol · dm ⁻³ FIA	0,60 0,80	farm. preparati	<i>Fernandez-Gonzalez et al., 2002</i>
Polarografija	0,04 – 3,5 mg · cm ⁻³	/	< 0,86	farm. preparati	<i>El Sayed et al., 1994</i>
	8 – 200 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	/	/	farm. preparati	<i>Belal et al., 1998</i>
NMR	30 – 50 mg/0,5 cm ³	/	1,74	farm. preparati	<i>Shin et al., 1981</i>

1.1.6. Histidin

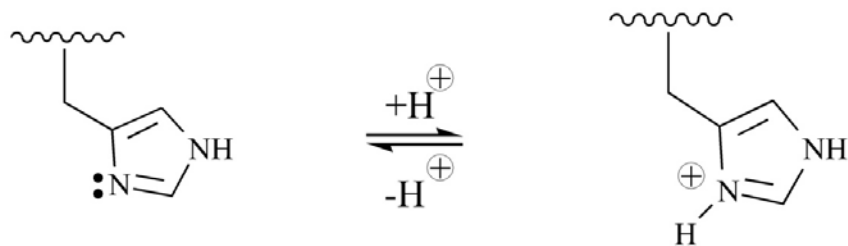
Histidin (His) je prvi put izolovan od strane nemačkog fizičara Albrehta Kossela 1896. Prvobitno se smatralo da je His esencijalna amino kiselina samo za decu, međutim dugoročna proučavanja su pokazala da je esencijalna i za odrasle (*Kopple i Swendseid, 1975*). To je supstanca u obliku belog kristalnog praha ili bezbojnih kristala rastvorna u vodi, vrlo slabo rastvorna u alkoholu, praktično nerastvorna u etru (*Jugoslovenska farmakopeja 2000, 2001, str. 432*).

Histidin sadrži imidazolovu grupu (slika 11) koja je najznačajnija u puferskoj ulozi proteina za odražvanje pH sredine u fiziološkim granicama. Pri pH = 7 histidin je u katjonskom obliku < 10 % (*Grant et al., 1997, str. 304*). Imidazolov bočni lanac ima pKa vrednost približno 6, dok pKa cele aminokiseline iznosi oko 6,5. Ovo znači da pri fiziološkom pH mala pomeranja pH vrednosti rastvora mogu da dovedu do promene ukupnog naelektrisanja kiseline. Ispod pH = 6 imidazolov prsten će biti uglavnom protonovan, što znači da će imati dve NH veze i imaće pozitivno naelektrisanje koje će biti podjednako raspoređeno između dva azotova atoma (slika 12). Imidazolov prsten histidina zadržava aromatična svojstva na svim pH vrednostima. Često je ligand u metaloproteinima i deo je katalitičkih mesta nekih enzima (npr. ureaza).



Slika 11. Hemijska struktura histidina:
(S)-2-amino-3(imidazol-4-il)propionska kiselina.

Značaj histidina u organizmu je u: izgradnji belančevina, formiranju dipeptida karnozina i anserina u mišićima i nastanku histamina. Glavni put u razgradnji histidina je preko urokaninske kiseline do konačnih metabolita: glutaminske kiseline, formijata i amonijaka. U inicijalnoj fazi razgradnje vrši se dezaminacija histidina u urokaninsku kiselinu pod dejstvom enzima histidaze. Dekarboksilacijom histidina dejstvom histidin dekarboksilaze nastaje biološki važno jedinjenje histamin. Histamin se ubraja u tkivne hormone. Iz ćelija se oslobađa pri alergijskim i upalnim procesima. Deluje vazodilatatorno, a istovremeno povećava permeabilitet krvnih sudova zbog čega dolazi do pojave edema i pada krvnog pritiska. Razgradnja histamina vrši se oksidativnom dezaminacijom pod dejstvom histaminaze (diaminooksidaze) pri čemu nastaje imidazolacetaldehid, koji pod dejstvom aldehid oksidaze prelazi u imidazol sirćetnu kiselinu koja se izlučuje urinom.



Slika 12. Protonizacija i deprotonizacija imidazolove grupe histidina (pH = 6–7).

Posledica deficita enzima histidaze je poremećaj u katabolizmu histidina u urokaninsku kiselinu. Bolest se naziva histidinemija, a simptomi su mentalna retardacija, epilepsija i poteškoće u govoru. Zbog poremećaja u razgradnji histidina u glavnom metaboličkom putu, on se gomila u krvi i pojačano izlučuje urinom. Ovaj poremećaj favorizuje sporedni put razgradnje procesom transaminacije, zbog čega se u urinu nalaze povećane koncentracije imidazol-pirogroždane, imidazol-mlečne i imidazol-sirćetne kiseline (Nikolić, 2000, str 497).

1.1.6.1. Metode za određivanje histidina

His je određivan različitim metodama kao što su kolorimetrija, spektrofotometrija, kinetička spektrofotometrija, spektrofluorimetrija, hemiluminiscencija, HPLC, voltometrija, kapilarna elektroforeza i druge. Pregled nekih od ovih metoda dat je u tabeli 6.

Farmakopeje daju potencijometrijsku metodu za određivanje His titracijom hlorovodoničnom kiselinom (*Jugoslovenska farmakopeja 2000, 2001, str. 433; British Pharmacopoeia, 2005, str. 713*).

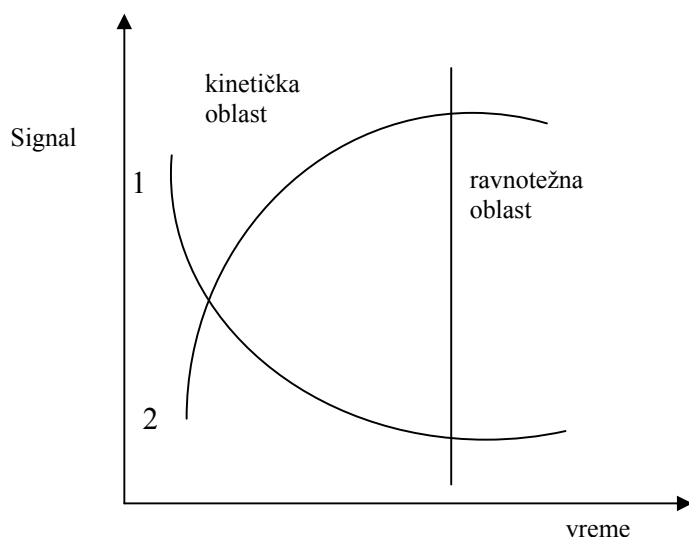
Tabela 6. Metode za određivanje histidina.

Metoda	Opseg linearnosti	Granica detekcije (LOD)	RSD (%)	Uzorak	Literatura
Kolorimetrija	1 – 60 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	/	3,00	/	Newman i Turnbull, 1960
Kapilarna elektroforeza	$1\cdot 10^{-6}$ – $1\cdot 10^{-3}$ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$	10^{-6} $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$	/	koža	Hermann i Abeck, 2000
Spektrofluorimetrija	5 – 7,5 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	/	/	serum	Gerber, 1970
	100 – 500 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	/	/	serum	Ambrose et al., 1969
Spektrofotometrija	2,2 – 5,13 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	/	< 1,00	farm. preparati	Patel et al., 2009
Kinetička spektrofotometrija	0,15 – 1,56 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	0,03 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	/	farm. preparati	Mitić et al., 2004
Hemiluminiscencija	$1\cdot 10^{-6}$ – $1\cdot 10^{-3}$ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$	0,56 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$	1,60	farm. preparati	Zhu et al., 2002
	0,05 – 5 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$	0,01 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$	0,93	riba	Kiba et al., 2006
Mikrobiološka metoda	2 – 20 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	/	/	proteini, hrana	Horn et al., 1948
HPLC sa fluorescentnom derivatizacijom	0,002 – 100 $\text{nmol}\cdot\text{cm}^{-3}$	0,0015 $\text{nmol}\cdot\text{cm}^{-3}$	0,58	serum, urin, koža	Tateda et al., 2001
HPLC	50 – 150 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	2,2 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	< 2,00	farm. preparati	Shieh et al., 2007
	3,7 – 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$	1,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$	< 3,23	tkiva	Wadud, 2002
Voltometrija	$6\cdot 10^{-4}$ – $2\cdot 10^{-3}$ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$	/	/	model sistem	Jaselskis, 1958
	$5\cdot 10^{-8}$ – $1\cdot 10^{-6}$ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$	/	5,20	/	Moreira i Fogg, 1991

1.2. Kinetičke metode analize

1.2.1. Kinetika hemijskih reakcija

Hemijska kinetika (gr. κινετικός = pokretan) (Vujaklija, 1961, str. 428) je nauka o brzini hemijskih reakcija. Hemijska reakcija je proces u kome iz jednih hemijskih vrsta (reaktanata) nastaju druge hemijske vrste (produkti). Svi hemijski procesi, bez obzira na prirodu, odvijaju se konačnim brzinama, težeći ravnotežnom stanju, uključujući pri tome dve oblasti: kinetičku (dinamičku), u kojoj se sistem približava ravnoteži, i ravnotežnu (statičku), kada svi procesi u sistemu dostignu ravnotežu (slika 13).



Slika 13. Kinetička i ravnotežna oblast hemijske reakcije.
Promena analitičkog signala sa vremenom za reaktante (1) i produkte (2).

Sve reakcije nisu pogodne za ravnotežna merenja, jer se u mnogima javljaju sporedni procesi, ili se ravnoteža dostiže veoma sporo, ili prinos proizvoda reakcije nije kvantitativan. U ovakvim slučajevima se primenjuju kinetičke metode, koje se zasnivaju na merenju brzine hemijskih reakcija dovoljno stabilnih reakcionih sistema. Brzina reakcije se definiše kao broj molova supstance, koja se troši ili nastaje po jedinici zapremine i u jedinici vremena. Za reakciju opšteg tipa:



brzina reakcije u vremenu t jednaka je promeni koncentracije bilo kog učesnika reakcije sa vremenom:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d[B]}{dt} \quad (16)$$

Takođe, brzina reakcije može da se predstavi kao veličina proporcionalna koncentracijama reaktanata:

$$v = k[A][B] \quad (17)$$

gde je k konstanta brzine i predstavlja reakcinu brzinu po jedinici koncentracije reaktanata.

Ako je jedan od reaktanta iz jednačine (17) u znatnom višku, npr. B, promena njegove koncentracije u toku reakcije je zanemarljiva. Zato se koncentracija tog reaktanta može objediniti sa konstantom brzine k u novu konstantu k' . Tada je reakcija pseudo nultog reda u odnosu na reaktant B i pseudo prvog reda u odnosu na reaktant A:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k[A][B]_{const} = k'[A] \quad (18)$$

Koncentracija supstance A u ovom izrazu može biti zamenjena bilo kojom merljivom veličinom (optička rotacija, apsorbanca, dielektrična konstanta, provodljivost, pritisak, indeks prelamanja itd.), koja je direktno proporcionalna koncentraciji, što omogućava primenu različitih analitičkih tehnika u cilju praćenja i određivanja brzine reakcije.

Suma eksponenata u izrazu (17) definiše red reakcije. Ovi eksponenti često nisu jednaki stehiometrijskim koeficijentima. Zbog toga se u opštem slučaju iz jednačine (17) ne može zaključiti o redu reakcije u odnosu na dati reaktant. Red reakcije je empirijski parametar i, kako ukupni, tako i pojedinačni, ne mora biti uvek ceo broj. U takvim slučajevima mehanizam reakcije je složeniji. Dobija se jedino eksperimentalnim određivanjem za datu hemijsku reakciju pri odabranim uslovima.

Da bi se postavila kinetička jednačina odabranog reakcionog sistema potrebno je odrediti parcijalne redove posmatrane reakcije u odnosu na različite promenljive koje utiču na proces. Parcijalni redovi reakcije mogu se dobiti na dva načina zavisno od toga da li se koristi diferencijalni ili integralni oblik kinetičke jednačine. Diferencijalna metoda je zasnovana na merenju inicijalne brzine reakcije ($\text{tg } \alpha$) i uglavnom se koristi za određivanje parcijalnih redova. Parcijalni red reakcije n povezan je sa koncentracijom preko jednačine za inicijalnu brzinu reakcije:

$$v = \text{tg } \alpha = -\frac{d[A]}{dt} = k_A [A]^n \quad (19)$$

gde je:

A – vrsta za koju se određuje parcijalni red,
 k_A – konstanta brzine pseudo n -tog reda.

Logaritmovanjem ovog izraza dobija se jednačina prave:

$$\log(\text{tg } \alpha) = \log k_A + n \log [A] \quad (20)$$

čiji je nagib n , a odsečak $\log k_A$.

U praksi, određivanje parcijalnog reda po svakom reaktantu koji utiče na sistem vrši se tako što se koncentracija tog reaktanta menja, dok se koncentracije ostalih održavaju konstantnim ili u velikom višku. Kada je na taj način određen uticaj svake promenljive i njene koncentracije na reakciju, može se postaviti kinetička jednačina. Jednačine brzine reakcije mogu sadržati i koncentraciju katalizatora i H_3O^+ jona.

1.2.2. Faktori koji utiču na brzinu hemijske reakcije

Generalno, postoje dva tipa reakcija koje se vezuju za kinetičke metode: spore reakcije (čije je polu-vreme 10 s ili duže) i brze reakcije (koje dostižu tačku polureakcije za manje od 10 s). Određivanje kinetike sporih reakcija zahteva neko vreme i smatra se nepraktičnim za reakcije sa polu-vremenom dužim od 2 h. Ukoliko je reakciji potrebno više od 2 h ili manje od 10 s da se razvije, njena brzina može biti podešena tako da polu-vreme bude u nekom prihvatljivom praktičnom opsegu sporih reakcija biranjem pogodnije temperature reakcionog sistema, promenom koncentracija reaktanata, korišćenjem drugog rastvarača, podešavanjem pogodne vrednosti jonske sile reakcione sredine itd.

1.2.2.1. Uticaj temperature

U opštem slučaju brzina hemijske reakcije povećava se sa povećanjem temperature, jer konstanta brzine reakcije zavisi od temperature. Još je Van't Hoff ustanovio 1884. godine da se pri povećanju temperature za 10 °C brzina reakcije povećava dva do tri puta. Kvantitativno ovu zavisnost možemo izraziti Arrhenius-ovom jednačinom:

$$\log k = \log A - \frac{E_a}{2,303RT} \quad (21)$$

ili u eksponencijalnom obliku:

$$k = A \cdot e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (22)$$

gde je:

k – konstanta brzine hemijske reakcije,

A – faktor učestanosti sudara (Arrhenius-ova integralna konstanta),

T – apsolutna temperatura,

E_a – energija aktivacije i

R – univerzalna gasna konstanta ($8,31441 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$).

Jednačina (21) koristi se za određivanje energije aktivacije i faktora učestanosti (A), ako je konstanta brzine izmerena na različitim temperaturama. Grafički se to postiže prikazivanjem zavisnosti:

$$\log k = f(1/T) \quad (23)$$

gde je nagib prave jednak:

$$\text{tg } \alpha = -\frac{E_a}{2,303R} \quad (24)$$

a energija aktivacije:

$$E_a = -2,3030 R \text{tg } \alpha \quad (25)$$

U kinetičko–katalitičkim istraživanjima često se određuje E_a (u nekim slučajevima i entropija aktivacije), jer njena vrednost doprinosi određivanju mehanizma reakcije (*Müller et al., 1983, str. 26*).

1.2.2.2. Uticaj koncentracije reaktanata

Uticaj koncentracije reaktanata na brzinu hemijske reakcije dat je osnovnim zakonom hemijske kinetike, zakonom o dejstvu masa (C. M. Guldberg i P. Vage), prema kome se reakcije sa malim konstantama brzina mogu ubrzati korišćenjem reaktanata velikih koncentracija.

1.2.2.3. Uticaj rastvarača

Uticaj rastvarača na brzinu reakcije između reaktanata A i B, koja se odvija preko nastajanja aktiviranog kompleksa AB^* , može se prikazati Kirkwood-ovom jednačinom (*Laidler, 1965, str. 227*):

$$\ln k = \ln k_0 \frac{e^2}{2kT} \left(1 - \frac{1}{\varepsilon}\right) M - \frac{3}{8kT} \left(\frac{1 - \varepsilon}{1 + \varepsilon}\right) N \quad (26)$$

gde je:

$$M = \frac{(Z_A + Z_B)}{r_{AB^*}} - \frac{Z_A^2}{r_A} - \frac{Z_B^2}{r_B}$$

$$N = \frac{\mu_A^2}{r_A^3} + \frac{\mu_B^2}{r_B^3} - \frac{\mu_{AB^*}^2}{r_{AB^*}^3}$$

k_0 – konstanta brzine reakcije u rastvoru rastvarača beskonačne relativne permitivnosti,

ε – relativna permitivnost rastvarača,

μ_A^2 , μ_B^2 i $\mu_{AB^*}^2$ – dipolni moment reaktanata A, B i njihovog aktiviranog kompleksa,

Z_A i Z_B – naelektrisanje vrsta A i B,

r_A , r_B , i r_{AB^*} – jonski radijusi reaktanata A, B i njihovog aktiviranog kompleksa i

e – naelektrisanje protona ($1,602 \cdot 10^{-19}$ C).

Limitirajući faktor hemijske reakcije sa učešćem rastvarača jeste entalpija solvatacije reaktanata i aktiviranog kompleksa. Većina katalitičkih reakcija, koje se primenjuju u kinetičkim metodama, odigravaju se u vodenoj sredini. Međutim, ukoliko je jedan od reaktanata nerastvoran u vodi, ili kada je potrebno odvojiti katalizator od matriksa ekstrakcijom, potrebni su vodeno-organski sistemi. Tada obavezno treba razmatrati promenu brzine reakcije od sastava rastvarača. Prema uticaju, rastvarači se dele u sledeće grupe (*Hauptmann et al., 1977*):

- nepolarne aprotične,
- polarne aprotične i
- protogenične (sadrže –OH ili –NH grupe).

Kod jonskih reakcija, povećanje dielektrične konstante rastvarača povećava brzinu reakcije jona istog naelektrisanja i smanjuje brzinu reakcije jona različitog naelektrisanja. Brzina reakcije između neutralnih molekula, koji grade izrazito polaran aktiviran kompleks, povećava se sa povećanjem polarnosti rastvarača. Kod reakcija jon-molekul gde nastaje slabo polaran aktiviran kompleks, brzina se neznatno menja.

1.2.2.4. Uticaj katalizatora

Katalizator je supstanca koja menja brzinu hemijske reakcije bez uticaja na položaj ravnoteže. Učestvuje u reakciji menjajući njen mehanizam, kontinualno se regeneriše u nekom od stupnjeva i na kraju reakcije izlazi hemijski nepromenjen. Male količine su često dovoljne da

prouzrokuju odigravanje reakcije u znatnoj meri, tako što smanjuju energiju aktivacije. Reakcije koje se odigravaju u prisustvu katalizatora zovu se *katalitičke*. Ukoliko se reakcija odvija u jednoj fazi radi se o *homogenoj katalizi*, a ako se reakcija odigrava na granici faza onda govorimo o *heterogenoj katalizi*. Homogeno katalitičke reakcije se najčešće primenjuju kod katalitičkih metoda analize.

Reakcije koje se primenjuju za određivanje koncentracije katalizatora nazivaju se indikatorske reakcije, a supstanca čija promena koncentracije služi kao mera za brzinu proticanja reakcije naziva se indikatorska supstanca (*Jacimirskii, 1967*).

1.2.2.4.1. Biokatalizatori (enzimi)

Enzimi (gr. ἐνζυμο = u kvascu) ili fermenti (lat. *fermentatio* = vrenje) (*Koraćević, 2000, str. 3*) su prvi katalizatori biološkog porekla. Njihova funkcija se sastoji u ubrzavanju hemijskih procesa pretvaranja organske materije (supstrata) u proizvod hemijskih reakcija. Biokatalizatori su proteinske prirode, a nemaju ni energetske, niti gradivnu ulogu. Njihova aktivnost je neophodna za odvijanje procesa bitnih za život ćelija i funkcionisanje organizma kao celine. Kao i neorganski, i ovi katalizatori su aktivni u minimalnim količinama, ne nalaze se u konačnim produktima i ne menjaju konstantu ravnoteže reakcija koje katalizuju. Enzimi imaju i određena svojstva po kojima se razlikuju od neorganskih katalizatora:

- mnogo su efikasniji,
- pokazuju manje ili više izraženu specifičnost prema supstratu i prema vrsti hemijske reakcije koju katalizuju,
- podležu procesima denaturacije pod uticajem visoke temperature, soli teških metala, jakih baza i kiselina,
- podležu procesima razgradnje i resinteze njihovih molekula jer im je vreme trajanja u ćelijama ograničeno,
- njihova aktivnost podleže kontrolnim mehanizmima, tj. regulaciji pod uticajem različitih faktora: alosterijskih efektor, koncentracije supstrata, kofaktora, aktivatora, inhibitora, kovalentne modifikacije itd.,
- ispoljavaju katalitičku aktivnost pri relativno niskim temperaturama, pri skoro neutralnim pH vrednostima i uz nizak atmosferski pritisak,
- omogućavaju ekonomičan tok složenih metaboličkih procesa,
- veoma su bitni u održavanju homeostaze, tj. u očuvanju normalnih koncentracija sastojaka važnih za biološke funkcije ćelija, tkiva i organizma kao celine i
- odlikuju se specifičnom strukturom molekula i poseduju aktivni centar.

Prema hemijskoj građi molekula, enzimi su proteini, što znači da se sastoje iz jednog ili više peptidnih lanaca. U zavisnosti od toga da li u svojim molekulima, pored aminokiselina, sadrže i neku neproteinsku materiju, izvršena je njihova podela na dve osnovne grupe:

- *proteini-enzime* u čiju strukturu ulaze samo aminokiseline i
- *proteid-enzime*, koji pored aminokiselina imaju i nebelančevinsku komponentu (koenzim).

Kod proteid-enzima proteinska komponenta (*apoenzim*) i neproteinski deo (*koenzim*) zajedno grade kompletan ferment (*holoenzim*). Apofermenti su nosioci specifičnosti enzima prema supstratu. Kofermenti, po hemijskoj prirodi obično organske materije složene strukture (npr. B-vitamini ili njihovi derivati), određuju tip hemijske reakcije koju enzim katalizuje. Predstavljaju delove *aktivnih centara* složenih fermenata, direktno učestvuju u stvaranju kompleksa sa supstratom i termostabilniji su od apoenzima. Veća grupa enzima može da ima isti koenzim (na primer, mnoge dehidrogenaze sadrže NAD i zbog toga katalizuju procese oksidacije–dehidrogenacije), ali koji će supstrat biti oksidovan zavisi od apoenzima. Koenzimi su, prema hemijskoj građi, svrstani u dve grupe:

- koenzimi vitaminske i
- koenzimi nevitaminske strukture.

Koenzimi vitaminske prirode su na primer koenzimi piridin-dehidrogenaza (NAD i NADP), koji u svom sastavu sadrže amid nikotinske kiseline ili vitamin PP. Vezujući H-atome preuzete od supstrata direktno učestvuju u katalitičkom procesu jer su veoma slabo vezani za proteinsku komponentu enzima. Pri tome je jedan atom vodonika vezan za koenzim, a drugi se nalazi u rastvoru u obliku jona vodonika. Otuda se redukovani oblici označavaju kao $\text{NADH} + \text{H}^+$, tj. $\text{NADPH} + \text{H}^+$. Predavanjem vodonika drugim akceptorima, oni se reoksiduju i tada imaju pozitivan naboj (NAD^+ i NADP^+). Glutamat dehidrogenaza je jedan od najvažnijih dehidrogenaza koja sadrži NAD kao koenzim.

Neki od enzima, bez obzira na grupu, sadrže određeni metal kao strukturni sastojak molekula (slika 2), i označavaju se kao *metaloenzimi* (npr. katalaza sadrži gvožđe, karboanhidraza sadrži cink, ureaza sadrži nikel itd.). Za razliku od onih jona metala koji igraju ulogu enzimskih aktivatora ili inhibitora, ovde je metal čvrsto vezan sa apoenzimom. Ovi enzimi obično sadrže po jedan ili dva atoma metala na svaku subjedinicu molekula. Funkcija jona metala može biti različita zavisno od prirode metala i prirode apoenzima. Tako metal može imati jednu ili više sledećih uloga:

- učestvuje u izgradnji aktivnog centra fermenta,
- pomaže održavanje tercijarne strukture enzimskog molekula koja je adekvatna za

- interakciju sa supstratom,
- aktivira enzim-supstrat kompleks čime direktno uzima učešće u katalitičkoj promeni supstrata,
 - učestvuje u prenošenju elektrona u toku enzimske reakcije,
 - vrši povezivanje enzima sa supstratom i
 - omogućava spajanje koenzima sa apoenzimom i tako stabilise strukturu proteid-enzima.

Ukoliko prisustvo metala određuje katalitičku aktivnost enzima, ferment gubi katalitička svojstva uklanjanjem metala iz njegovog molekula. Ali, kada joni metala imaju ulogu aktivatora, njihovo odvajanje od enzima izaziva pad aktivnosti, a ne i gubitak katalitičke sposobnosti fermenta.

Aktivni centar i specifičnost enzima

Aktivni centar je deo molekula enzima koji neposredno učestvuje u vezivanju supstrata pri njegovoj katalitičkoj transformaciji. Struktura i prostorna organizacija aktivnog centra predstavlja osnovu značajne karakteristike enzima, *specifičnost*. Ovaj centar je sastavljen iz malog broja funkcionalnih grupa i predstavlja samo minimalni deo peptidnog lanca. Ukoliko je enzim iz grupe proteid-fermenta, u sastav aktivnog centra ulazi i koenzim (i jon metala kod metaloenzima). Najčešće u sastav aktivnih centara ulaze neke od sledećih funkcionalnih grupa aminokiselina: imidazolov prsten histidina, epsilon amino grupa lizina, karboksilna grupa glutaminske kiseline, gvanidino grupa arginina, indolovo jezgro triptofana, karboksilna grupa asparaginske kiseline, sulfhidrilna grupa cisteina, hidroksilna grupa serina i treonina. Ove grupe imaju sposobnost da formiraju vodonične mostove, što je važno za održavanje tercijarne strukture enzima. Takođe, one mogu da grade komplekse sa jonima različitih metala. Karakteristična sposobnost aktivnog centra uslovljena je ne samo hemijskom prirodom aminokiselinskih ostataka koji ga izgrađuju, već i prirodom okolnih aminokiselina. Poznato je da izvesni enzimi mogu da imaju iste aktivne centre, a da ispoljavaju različito delovanje. Pri razaranju aktivnog centra ili njegovim blokiranjem hemijskim agensima, ferment gubi svoju katalitičku moć.

Specifičnost delovanja enzima je važan biološki fenomen jer obezbeđuje celishodnost procesa u živoj ćeliji. Ukoliko ona ne bi bila izražena, svaki ferment bi delovao na svaku organsku materiju, hemijske reakcije bi se odvijale haotično, što bi vodilo u nekontrolisanu razgradnju organskih supstanci, a time i do prestanka života.

Faktori koji utiču na aktivnost enzima

Aktivnost enzima je adekvatna brzini katalizovane reakcije, a označava količinu supstrata koja se pod uticajem enzimskih molekula u jedinici vremena transformiše u produkt reakcije. Najvažniji faktori koji utiču na aktivnost enzima su:

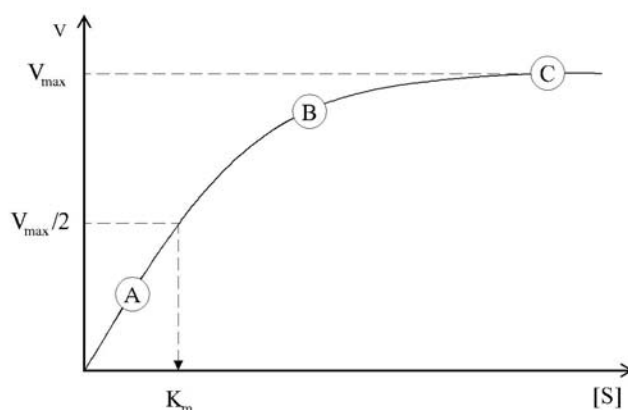
- *koncentracija enzima*, broj molekula enzima u jedinici zapremine, ili na jedinicu težine. Brzina reakcije je pri optimalnim uslovima (temperatura, pH, višak supstrata, prisustvo aktivatora i koenzima) direktno proporcionalna koncentraciji enzima:

$$v = k [E] \quad (27)$$

gde je v brzina katalizovane reakcije, tj. aktivnost enzima, $[E]$ je koncentracija enzima i k je konstanta brzine reakcije. Grafički prikaz odnosa koncentracije enzima i brzine reakcije je prava linija, a svako odstupanje od pravolinijskog oblika ukazuje na prisustvo inhibitora ili na istovremeno odigravanje neke sporedne reakcije supstrata. Ova zakonitost je od velikog praktičnog značaja u dijagnostici i naučno-istraživačkom radu, jer omogućava određivanje enzimске aktivnosti umesto koncentracije enzima;

- *koncentracija jona vodonika* je vrlo manifestna kod svih fermentata. Enzimi su maksimalno aktivni u uskom intervalu pH vrednosti. Smatra se da je uticaj pH najbitniji na enzimске molekule, mada je koncentracija jona vodonika važna i za stepen jonizacije supstrata ukoliko njegovi molekuli podležu disocijaciji. Uticaj pH na proteinsku prirodu enzima kao polielektrolita povezuje se sa njegovim raznovrsnim jonskim oblicima koji nastaju od velikog broja grupa koje mogu da disosuju različito zavisno od pH vrednosti sredine. Optimalna vrednost ove konstante je ona pri kojoj molekuli enzima imaju onu jonsku formu koja je najadekvatnija za kontakt supstrata sa njegovim aktivnim centrom. Zavisno od pH može da se promeni jonizacija hemijskih grupa koje izgrađuju aktivni centar, kao i grupa koje učestvuju u vezivanju jona metala, ili omogućuju spajanje apoenzima sa koenzimom;

- *koncentracija supstrata* na enzimsku aktivnost je specifična, jer biološki katalizatori pokazuju *fenomen zasićenja supstratom*. Kod svih enzima je karakteristično zasićenje supstratom, samo je za različite fermente potrebna različita koncentracija supstrata da se zasićenje postigne. Zavisnost brzine reakcije, v , od koncentracije supstrata, $[S]$, ilustruje grafik na slici 14.



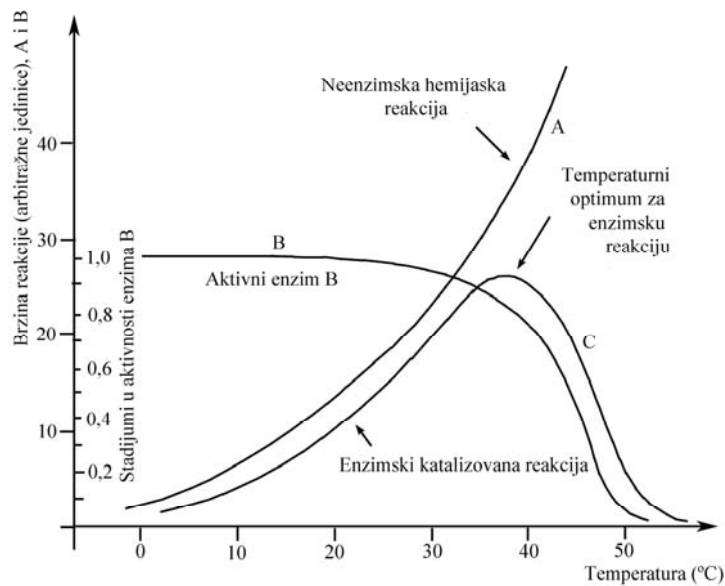
Slika 14. Uticaj koncentracije supstrata na enzimsku aktivnost (Koraćević, 2000, str. 21).

Sa grafika se vidi da se pri niskim koncentracijama supstrata brzina reakcije povećava srazmerno porastu koncentracije supstrata, segment (A) je linearan. Pri daljem povećanju koncentracije supstrata brzina reakcije raste sporije i nije proporcionalna koncentraciji supstrata, segment (B). Pri daljem povećanju koncentracije supstrata brzina reakcije dostiže najveću vrednost i na tom nivou se dalje održava, segment (C). Dostignuta brzina na ovom segmentu se naziva *maksimalna* ili *granična brzina* (V_{max}). U ovim uslovima brzinu katalizovane reakcije ograničava koncentracija enzima, a ne koncentracija supstrata. Ona koncentracija supstrata, pri kojoj se dostigne polovina maksimalne brzine, označava se kao K_m vrednost, ili *Michaelis-Menten*-ova konstanta, koja se izražava brojem mola (ili mmola) na liter. Ovaj parametar je uvek stalna vrednost za određeni enzim i određeni supstrat, a njegove vrednosti takođe zavise od temperature, pH i prisustva efektor (aktivatora ili inhibitora). Recipročna vrednost K_m konstante u praksi se definiše kao *afinitet enzima prema supstratu*. Ukoliko enzim ima manju K_m konstantu za određeni supstrat, utoliko će se efikasnije vršiti pretvaranje supstrata u produkt reakcije (veći je njegov afinitet za dati supstrat), i obrnuto.

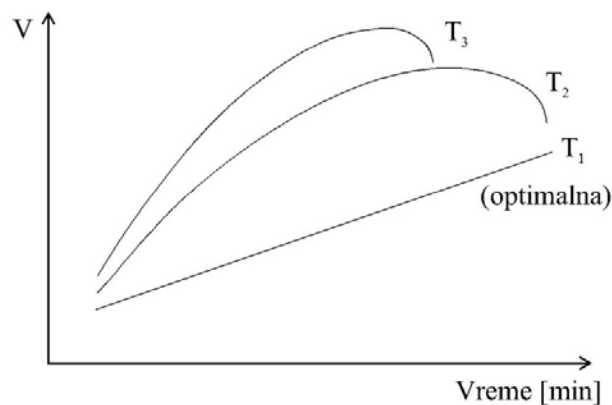
Specifičan uticaj koncentracije supstrata na brzinu enzimske reakcije ispoljava se zbog toga što se u toku katalize gradi intermedijarno jedinjenje (kompleks enzim-supstrat, [ES]), koje se potom razlaže na produkt reakcije i enzim. Kad je [S] vrlo veliko u poređenju sa K_m , sav enzim je zasićen supstratom i praktično je u obliku [ES] kompleksa, što omogućuje maksimalnu brzinu reakcije. Dalje povećanje [S] ne povećava brzinu reakcije jer nema slobodnih molekula enzima za vezivanje supstrata.

U fiziološkim uslovima u ćelijama i tkivima [S] je najčešće bliska K_m vrednosti za dati enzim i enzimi nisu zasićeni supstratom. Zato su brzine biohemijskih reakcija *in vivo* pod uticajem [S], ali pri određivanju aktivnosti enzima *in vitro*, neophodno je da je [S] višestruko veće od K_m kako bi se postiglo da reakciona brzina zavisi samo od koncentracije enzima, a ne od koncentracije supstrata;

- *temperatura*. Od 30 °C do 40 °C većina enzima ima svoj optimum, pri kome je enzimska aktivnost najveća, a enzimski molekuli najstabilniji. Karakteristično je da se pri povećanju temperature za svakih 10 °C (između 10 °C i 40 °C), aktivnost enzima povećava 1,5–2 puta. Na temperaturama većim od 50 °C mnogi enzimi se denaturišu, a iznad 80 °C inaktiviraju se skoro svi enzimi (slika 15). Izuzetno mali broj enzima je stabilan pri kratkotrajnom zagrevanju pri visokim temperaturama (npr. ribonukleaza je postojana na 100 °C tokom nekoliko minuta). Inaktivacija enzima visokim temperaturama je ireverzibilan proces, dok je inaktivacija enzima na niskim temperaturama (– 25 °C i niže) reverzibilne prirode, što omogućava čuvanje enzimskih uzoraka. Na optimalnoj temperaturi aktivnost enzima (brzina reakcije) se linearno povećava u određenom vremenskom intervalu, jer se toplota pretvara u kinetičku energiju i povećava se broj sudara reagujućih čestica u jedinici vremena, a time i brzina reakcije (slika 16);



Slika 15. Šematski dijagram uticaja temperature na brzinu enzimske i neenzimske katalizovane reakcije (Moss et al., 1997, str. 367).



Slika 16. Uticaj temperature na aktivnost enzima (Koraćević, 2000, str. 18).

- efektori enzima su aktivatori i inhibitori. Prvi su supstance koje povećavaju aktivnost enzima, a drugi su supstance koje smanjuju katalitički uticaj fermenta. Da bi izvršili svoj uticaj, efektori treba prethodno da se vežu za specifična mesta na površini enzimskog molekula. Zato se svrstavaju u tzv. *ligande*. Aktivatori enzima su najčešće joni pojedinih elemenata (K, Mg, Ca, Zn, Mn, Fe, Cu, Cl, Br, I i dr.). Neki joni u određenim koncentracijama deluju kao aktivatori, a u drugim kao inhibitori istog fermenta. Pored jona, kao aktivatori nekih enzima mogu da deluju druga jedinjenja, a i neki fermenti mogu da transformišu neke neaktivne u druge aktivne vrste enzima. Postoji bitna razlika u stvaranju kompleksa enzim-supstrat i enzim-inhibitor. U prvom slučaju se kompleks ES pretvara u produkt, a enzim se oslobađa i može ponovo da deluje na nove molekule supstrata. U drugom slučaju ne dolazi do transformacije inhibitora. Enzim ostaje blokiran inhibitorom i ne može da vrši svoju katalitičku funkciju.

Ulogu inhibitora često imaju normalni metaboliti, koji se stvaraju pri katabolizmu ili biosintezi organskih materija, kao i neki katjoni ili anjoni, mnogi lekovi i druge materije koje iz spoljašnje sredine dospevaju u organizam. Inhibitorno delovanje može da bude povratnog ili nepovratnog karaktera. Pri odstranjivanju inhibitora, kod nepovratnog oblika delovanja, enzim ostaje neaktivan, dok kod povratne inhibicije dolazi do uspostavljanja enzimske aktivnosti nakon odvajanja inhibitora. Povratna inhibicija može da se ispolji na četiri načina: kao konkurentna (kompetitivna), nekonkurentna (nekompetitivna), bezkonkurentna (akonkurentna) i mešovita. Osim konkurentne, ostali tipovi inhibicije mogu često da budu nepovratnog karaktera.

Nazivi i klasifikacija enzima

Do sada je otkriveno i proučeno oko 2000 različitih enzima. U ranijem periodu je za označavanje enzima korišćena takozvana trivijalna (radna) nomenklatura, po kojoj su nazivi fermenta formirani ili prema prirodi njihove funkcije, ili prema imenu supstrata na koji deluju. Tako je npr. veliki broj enzima dobio naziv tako što je na koren latinskog imena supstrata dodat nastavak *-aza*: ureaza (enzim koji hidrolizuje ureu), amilaza (enzim koji deluje na škrob), itd. Mnogi od tih radnih naziva su zadržani i danas u svakodnevnoj upotrebi. Ali se javila sasvim logična potreba da se izvrši njihova adekvatna sistematizacija i nomenklatura, što je i urađeno prema preporuci Komisije za enzimologiju Internacionalne unije za biohemiju. Principi savremene nomenklature obezbeđuju da se u naziv enzima uključi i ime supstrata i tip hemijske reakcije koju ferment katalizuje.

Prema vrsti reakcije na koju deluju, svi enzimi su podeljeni u šest osnovnih klasa:

- EC 1. oksidoreduktaze,
- EC 2. transferaze,
- EC 3. hidrolaze,
- EC 4. liaze,
- EC 5. izomeraze i
- EC 6. ligaze,

gde EC skraćenica dolazi od engleskih reči **Enzyme Commission**.

Prema vrsti hemijske veze koja se transformiše, odnosno prema prirodi hemijskog ostatka koji služi kao donor, svaka klasa je podeljena na određeni broj grupa (podklasa) i svaka od ovih je podeljena na podgrupe prema prirodi akceptora hemijskih grupa ili na bazi preciznijeg utvrđivanja hemijskog ostatka koji učestvuje u reakciji.

U cilju identifikacije enzima uz njihov naziv se stavlja specifičan sistemski (klasifikacioni) broj koji je uvek sastavljen iz četiri cifre međusobno odvojene tačkama. Prva cifra, od 1 do 6,

označava osnovnu klasu kojoj taj enzim pripada. Drugi broj označava grupu u datoj klasi, a treći podgrupu u odgovarajućoj grupi. Četvrti broj je individualni broj svakog fermenta u odgovarajućoj podgrupi kojoj pripada, npr. klasifikacioni broj enzima ureaze je EC 3.5.1.5.

1.2.2.5. Uticaj aktivatora

Aktivator je supstanca koja sama ne katalizuje datu homogeno-katalitičku reakciju, ali bitno povećava njenu brzinu u prisustvu katalizatora. Univerzalni aktivatori ne postoje, jer supstanca koja je u jednoj reakciji aktivator, u drugoj može biti inhibitor, ili neće pokazivati uticaj na brzinu reakcije. U zavisnosti od mehanizma dejstva, koncentracija aktivatora može, ali ne mora da se promeni za vreme odvijanja reakcije (*Bončev, 1972*). Prema mehanizmu delovanja, aktivatori se dele u tri grupe:

1. aktivatori koji olakšavaju kontakt katalizator-supstrat:

- smanjenjem elektrostatičkog odbijanja među njima,
- stvaranjem prelaznog kompleksa sa katalizatorom ili s nekim od liganada u njegovoj koordinacionoj sferi i
- putem velikog trans ili cis uticaja;

2. aktivatori koji povoljno utiču na uzajamno dejstvo između katalizatora i supstrata:

- povećanjem polarizujućeg uticaja katalizatora ili povećanjem mogućnosti supstrata da bude polarizator,
- stabilizovanjem određenog aktivnog oblika katalizatora, reaktanata ili produkata (intermedijarni ili krajnji) i
- favorizovanjem određene prostorne orijentacije katalizatora i supstrata;

3. aktivatori koji ne utiču direktno na reakciju katalizator-supstrat, već indirektno ubrzavaju dobijanje proizvoda reakcije:

- dejstvom na više različitih etapa istog katalitičkog procesa i
- kombinovanjem dejstva s drugim aktivatorima prisutnim u rastvoru.

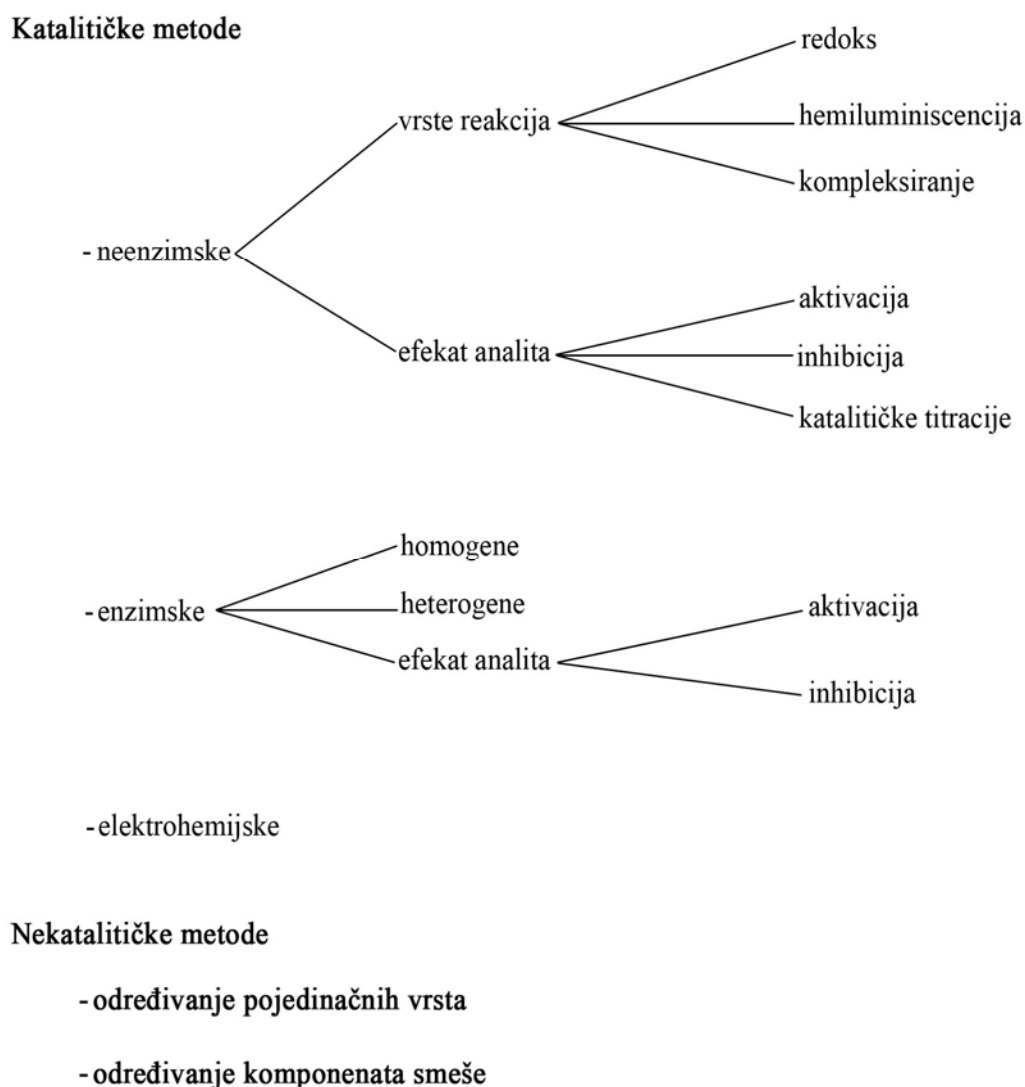
Ispitivanja su pokazala da je dejstvo aktivatora najjače kod reakcija sa slobodno-radikalnim mehanizmom ili mehanizmom sa prenosom naelektrisanja. Procesi koordiniranja, koji igraju suštinsku ulogu pri nastanku efekta aktiviranja, mogu biti uzrok i jedne nepoželjne pojave kod homogeno-katalitičkih reakcija, a to je inhibiranje reakcije. Prisustvo koordiniranog aktivatora može ubrzati reakciju samo ako u koordinacionoj sferi katalizatora ima dovoljno slobodnih mesta, koja može zauzeti supstrat ili neko intermedijarno jedinjenje. Međutim, ako

aktivator-ligand gradi takav kompleks sa katalizatorom, da zauzima sva mesta u njegovoj koordinacionoj sferi, doći će do smanjenja brzine reakcije, o čemu treba voditi računa pri izboru aktivatora.

1.2.3. Klasifikacija kinetičkih metoda analize

Kinetičke metode analize mogu se klasifikovati prema različitim kriterijumima (primenjena metodologija, instrumentacija i tehnika rada), ali najbolja je podela na katalitičke i nekatalitičke metode (tabela 7).

Tabela 7. Opšta podela kinetičkih metoda analize.



Kinetičke metode analize, uprkos teškoćama koje uključuju merenja u jednom dinamičkom sistemu, imaju neke prednosti u odnosu na ravnotežne metode i mogu se primeniti na:

- širok spektar hemijskih reakcija kod kojih se ravnotežna merenja ne mogu primeniti zbog njihove sporosti,
- spore reakcione sisteme, koji generalno dovode do povećanja broja sporednih reakcija,
- nekvantitativne reakcije,
- analizu tragova analita zbog veće osetljivosti, naročito kod analitičkih reakcija i
- analizu sličnih komponenata smeše reakcijom sa zajedničkim reagensom pri različitim brzinama.

Kontinualni razvoj kinetičkih metoda analize pripisuje se:

- konstantnoj potrebi za analiziranjem veoma malih količina analita u materijalima visoke čistoće, u biološkim i u uzorcima iz životne sredine,
- potrebi za boljim poznavanjem reakcionih mehanizama i
- progresivnom razvoju instrumentalne tehnike.

1.2.4. Primena kinetičkih metoda analize za određivanje katalizatora

Primena bilo koje kinetičke metode za određivanje koncentracije katalizatora podrazumeva grafičku zavisnost promene merene osobine sa vremenom. Takve krive, kao što se može videti na slici 12, mogu biti rastuće ili opadajuće u zavisnosti od toga da li su posmatrane vrste produkti ili reaktanti. Katalizator se određuje sa kalibracione prave dobijene primenjenom metodom, za svaki pojedinačni slučaj.

Kinetičke metode se mogu klasifikovati prema kinetičkom redu indikatorske reakcije na:

- diferencijalne ili metode pseudo nultog-reda i
- integralne ili metode prvog, pseudo-prvog ili metode drugog reda.

Za obe vrste metoda mogu se koristiti: metoda tangensa, fiksnog vremena i fiksne koncentracije. Kao posebne metode navode se metode zasnovane na merenju indukcionog perioda kod Landolt-ovih reakcija, kao i metode koje se primenjuju kod nekatalitičkih reakcija. Diferencijalne i integralne metode se najčešće koriste za katalitičke reakcije. Diferencijalna varijanta tangensne metode je poznata kao „metoda inicijalne brzine“.

Ako posmatramo reakciju:



njena brzina je:

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = k[A][C]_0 + k_1[A] \quad (29)$$

ili

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k([A]_0 - [P])[C]_0 + k_1([A]_0 - [P]) \quad (30)$$

gde je $[A]_0$ inicijalna koncentracija reaktanta A, a $[P]$ je koncentracija obrazovanog proizvoda, dok k i k_1 predstavljaju konstante brzina katalitičke i nekatalitičke reakcije. U oba slučaja, reakcija mora biti pseudo-prvog reda u odnosu na posmatrani reaktant, jer se koncentracija katalizatora, po definiciji, ne menja tokom reakcije.

1.2.4.1. Diferencijalne metode

Diferencijalne metode uključuju reakcije pseudo-nultog reda, jer one koriste merenja napravljena na početku procesa, kada su promene koncentracije reaktanata ili produkata praktično zanemarljive.

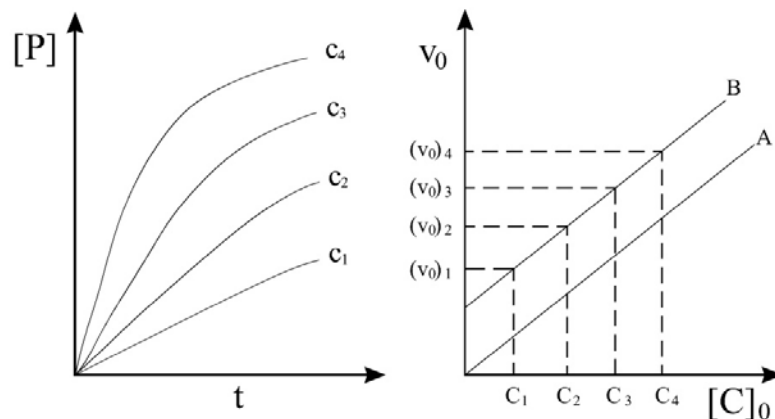
Metoda inicijalne brzine. Kod ove metode $[P]$ može biti zanemareno u poređenju sa $[A]_0$ u jednačini (30) i integralni oblik jednačine za interval vremena od 0 do t je:

$$[P] = (k[A]_0[C]_0 + k_1[A]_0)t = k'[C]_0t + k_1t \quad (31)$$

Grafička zavisnost $[P]$, odnosno neke merene njoj proporcionalne osobine, u funkciji od vremena za različite koncentracije katalizatora daje prave linije. Metoda se još zove tangensna metoda, zato što je nagib prave funkcija samo koncentracije katalizatora:

$$v_0 = \frac{d[P]}{dt} = \tan \alpha \cong \frac{\Delta[P]}{\Delta t} = k'[C]_0 + k_1 \quad (32)$$

Zato, nanošenje v_0 u funkciji koncentracije katalizatora, $[C]_0$, za seriju uzoraka koji sadrže poznate koncentracije katalizatora, daće pravu liniju, sa odsečkom koji se razlikuje od nule ili je nula, u zavisnosti da li se nekatalizovana reakcija odvija do zanemarljivog ili merljivog stepena (krive A i B, slika 17). Takva linija se koristi kao kalibraciona prava.



Slika 17. Metoda inicijalne brzine.

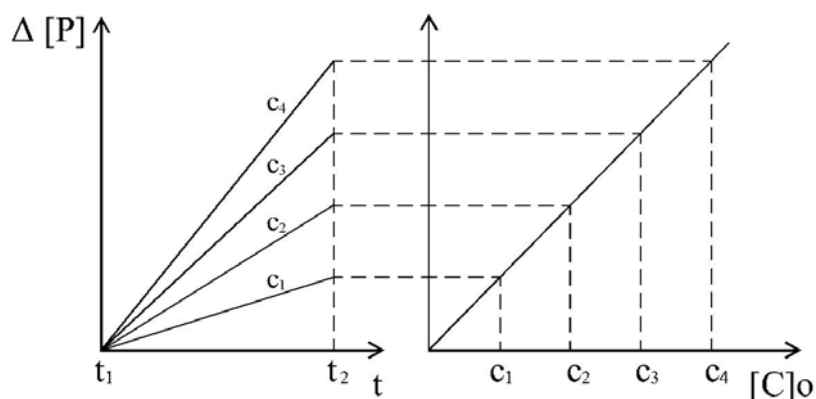
Inicijalna brzina je linearno povezana sa koncentracijom katalizatora, bilo da je početni deo kinetičke krive linearan ili ne, što omogućava da, ukoliko je ovaj deo nelinearan, sva merenja v_0 budu izvršena nakon istog vremenskog intervala za različite koncentracije katalizatora kako bi se obezbedila konstantnost faktora proporcionalnosti. Prednosti ove metode su:

- vrlo male promene koncentracije reaktanata i pokoravanje reakcije kinetici pseudo-nultog reda,
- zanemarljiv stepen odvijanja povratne reakcije, jer je količina formiranog proizvoda veoma mala, tako da sveukupna brzina nije modifikovana,
- zanemarljivo mali broj komplikacija koje potiču od mogućih sporednih reakcija,
- preciznija merenja inicijalne brzine od merenja u kasnijim fazama reakcije, jer veća brzina na početku reakcije daje bolje signale i
- primenljivost na reakcije sa isuviše malim konstantama brzina, koje ne bi bile pogodne za merenje ravnotežnim metodama.

Metoda fiksnog vremena. Metoda obuhvata merenje koncentracije reaktanta ili produkta u određenom odabranom momentu od početka odigravanja reakcije. Jednačina (32) može se napisati u obliku:

$$\Delta[P] = (k' [C]_0 + k_1') \Delta t = k' [C]_0 \Delta t + k_1' \Delta t \quad (33)$$

Ako je $\Delta t = \text{const.}$ (npr. ako se meri $[P]$ pri fiksnom vremenu), koncentracija katalizatora biće direktno proporcionalna promeni koncentracije proizvoda indikatorske reakcije, P . Grafička zavisnost $\Delta[P] = f([C]_0)$ daje pravu liniju sa nagibom $k' \Delta t$ i odsečkom $k_1' \Delta t$. Dalje, ako je $k_1' \approx 0$, tada je $\Delta[P] = k' \Delta t [C]_0 = k'' [C]_0$ i kriva će imati odsečak nula (slika 18).



Slika 18. Metoda fiksnog vremena.

Do sada, Δt je uzimano od početka reakcije, npr. $t_1 = 0$ ($t_2 - t_1 = t_2$) i samim tim $\Delta t = t_2$. Zato, u primeru na slici 18, ovo vreme pada u okviru pravog dela kinetičke krive. Ova metoda je podjednako važeća za merenja napravljena tokom bilo kog vremenskog intervala Δt , za koji je $t_1 = 0$, pod uslovom da nisu napravljena suviše daleko od početka reakcije. Dokazano je da su $\Delta[P]$ i $[C]_0$ proporcionalni čak i u slučaju reverzibilnih reakcija, i da je postupak fiksnog vremena i teorijski i praktično superiorniji za reakcije pseudo-prvog reda ili za procese koji uključuju merenja koncentracije enzimskih supstrata.

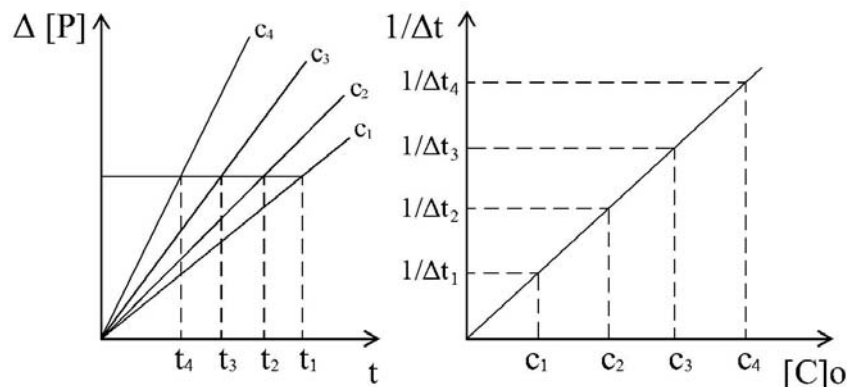
Metoda fiksne koncentracije (metoda varijabilnog vremena). Ova metoda obuhvata merenje vremena potrebnog za dostizanje prethodno zadate promene merene osobine rastvora, koja je inače proporcionalna koncentraciji npr. proizvoda reakcije. Rešavanjem jednačine (33) po $1/\Delta t$ dobija se:

$$\frac{1}{\Delta t} = \frac{k' [C]_0 + k_1'}{\Delta [P]} \quad (34)$$

Kako je $\Delta [P] = \text{const.}$, grafička zavisnost $1/\Delta t = f([C]_0)$ biće prava linija sa nagibom $k'/\Delta [P]$ i odsečkom $k_1'/\Delta [P]$. Ako je nekatalitička reakcija isuviše spora, tada se jednačina (34) svodi na oblik:

$$1/\Delta t = k'' [C]_0 \quad (35)$$

gde je $k'' = k'/\Delta [P]$ i kriva ima odsečak nula (slika 19).



Slika 19. Metoda fiksne koncentracije.

U praksi, ova metoda zahteva fiksiranje granice za mereni parametar (npr. apsorbancu) i merenje vremena potrebnog da serija uzoraka sa poznatim koncentracijama katalizatora postigne zadatu vrednost. Dobijanje validnih rezultata zahteva odigravanje reakcije do izvesnog stepena proporcionalnog vremenu u toku intervala Δt ($t_1 \neq 0$).

1.2.4.2. Integralne metode

Kada nije moguće zanemariti $[P]$ u poređenju sa $[A]_0$, jednačina (30) se integriše u određenom vremenskom intervalu $\Delta t = t_2 - t_1$:

$$\ln \left(\frac{[A]_1}{[A]_2} \right) = (k[C]_0 + k_1)(t_2 - t_1) \quad (36)$$

koja se, pod pretpostavkom da je $t_1 = 0$ (početak reakcije) svodi na:

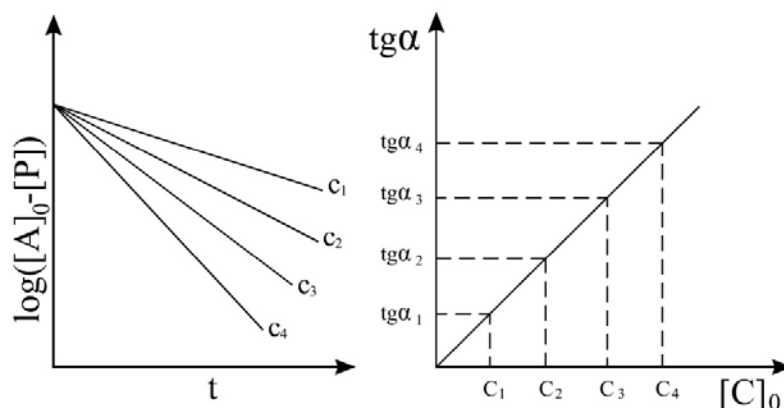
$$\ln \frac{[A]_0}{[A]_0 - [P]} = (k[C]_0 + k_1)t \quad (37)$$

Kada se reakcija prati preko jednog od reaktanata (što nije uvek moguće), t_1 može biti različito od nule, a ako se prati preko proizvoda, pogodno je uzeti $t_1 = 0$ tako da se može upotrebiti pojednostavljen izraz (37). Ova jednačina je osnova svih integralnih metoda.

Tangensna metoda. Iz jednačine (37) može se izvesti sledeći izraz:

$$\log ([A]_0 - [P]) = \log [A]_0 - (1/2,303)(k[C]_0 + k_1)t \quad (38)$$

Kriva zavisnosti $\log ([A]_0 - [P])$ od vremena je prava linija, sa nagibom koji je funkcija koncentracije katalizatora, i odsečkom koji je konstantan ako je inicijalna koncentracija A, $[A]_0$, fiksna za svaku analizu (slika 20).



Slika 20. Tangensna metoda.

Nagibi ovih pravih u funkciji koncentracije katalizatora daju kalibracionu pravu.

Metoda fiksnog vremena. Iz jednačine (36) i pod pretpostavkom da je $\Delta t = t_2 - t_1 = \text{const.}$ sledi:

$$\ln \frac{[A]_1}{[A]_2} = \Delta(\ln [A]) = k'[C]_0 + k'_1 \quad (39)$$

gde je $k' = k\Delta t$ i $k'_1 = k_1\Delta t$. Grafička zavisnost $\Delta(\ln [A])$ u funkciji od $[C]_0$ za fiksnu koncentraciju A, $[A]_0$, daje kalibracionu pravu. Ukoliko su svi reakcioni uslovi konstantni, odnos $[A]_1/[A]_2$ biće takođe konstantan za bilo koju koncentraciju katalizatora tokom unapred izabranog vremenskog intervala, tada se može izračunati ukupna konstanta brzine reakcije pseudo-prvog reda, k_T :

$$k_T = \frac{\Delta(\ln [A])}{\Delta t} = k[C]_0 + k_1 \quad (40)$$

koja, predstavljena kao zavisnost od koncentracije katalizatora daje kalibracionu pravu.

Ako se reakcija prati preko formiranja proizvoda, P, pre nego preko utroška reaktanta, A, i ako je $t_1 = 0$, tada je $[A]_1 = [A]_0$ i $[A]_2 = [A]_0 - [P]$, tako da sledi:

$$\ln \frac{[A]_0}{[A]_0 - [P]} = k'[C]_0 + k'_1 \quad (41)$$

i nanošenje $\ln\{[A]_0/([A]_0 - [P])\}$ kao funkcije koncentracije katalizatora daje takođe kalibracionu pravu.

Metoda fiksne koncentracije (metoda varijabilnog vremena). Iz jednačine (36) ako je $\Delta[A] = \text{const.}$ sledi:

$$\frac{1}{\Delta t} = k'' [C]_0 + k_1'' \quad (42)$$

gde je:

$$k'' = k/\Delta(\ln[A]) \text{ i } k_1'' = k_1/\Delta(\ln[A]).$$

Izraz (42) je podjednako validan bilo da se reakcija prati preko reaktanata ili preko proizvoda. Grafička zavisnost $1/\Delta t$ od koncentracije serije standarda katalizatora daje traženi kalibracioni grafik. U stvari, Δt može biti bilo koji vremenski interval tokom praćenja kinetičke krive, mada se najbolji rezultati dobijuju kada se izabere linearni deo krive. Vreme, t , uglavnom odgovara početku reakcije.

Integralne metode se primenjuju u uslovima odigravanja reakcije u većem stepenu. Takvi uslovi mogu da dovedu do gubitka linearnosti pri promeni $[P]$ sa vremenom, tako da je primena metode fiksne koncentracije više ograničena od njene diferencijalne forme. Međutim, metoda fiksnog vremena je uopštenija, jer se primenjuje i važi čak i kad se koristi na nelinearni deo krive merene osobine kao funkcije vremena.

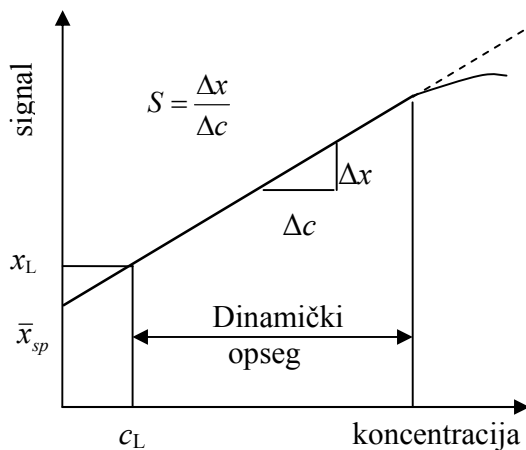
Reakcioni tok se može pratiti hemijskim ili fizičko–hemijskim metodama. *Hemijske metode* su praktično primenljive samo kod metode fiksnog vremena. Nakon odabranog vremena reakcija se zaustavlja, a koncentracija nastalog proizvoda ili koncentracija neutrošene indikatorske supstance najčešće se određuje volumetrijski. Glavna prednost hemijskih metoda je mogućnost merenja apsolutnih koncentracija reaktanata ili proizvoda reakcije. *Fizičko–hemijske metode* zasnivaju se na merenju promena neke fizičko–hemijske veličine koja je proporcionalna promeni koncentracije indikatorske supstance, kao što su: apsorbanca, elektroprovodljivost, indeks prelamanja, zapremina oslobođenog gasa, jačina difuzione struje, potencijal indikatorske elektrode, intenzitet fluorescencije, itd. Njihova prednost je što su brže od hemijskih i ne narušavaju ravnotežu u sistemu.

1.2.5. Karakteristike kinetičkih metoda analize

Kinetičke metode se ne primenjuju samo za određivanje mikrokoličina, već i za određivanje relativno velikih količina elemenata i jedinjenja u vrlo malim količinama uzoraka (mikro uzorci, tanke prevlake, uzorci toksičnih supstanci). Posebna oblast primene kinetičkih metoda analize je u određivanju niskih koncentracija organskih supstanci, kao što su amino kiseline, pesticidi, antibiotici, alkaloidi, itd. Postoje široke mogućnosti za nova istraživanja u ovoj oblasti. Posebno veliki izazov predstavlja povećanje osetljivosti i selektivnosti kinetičkih metoda za određivanje organskih jedinjenja i biomolekula.

Osetljivost

Pojam osetljivosti još uvek je jedan od najkontraverznijih pojmova u analitičkoj hemiji. Iako se jasno razlikuje od limita detekcije i dalje se u nekim radovima ovi pojmovi koriste kao sinonimi. Koncept osetljivosti se identifikuje sa nagibom kalibracione krive, tj. sa IUPAC-ovom analitičkom osetljivošću. Osetljivost treba računati kao odnos nagiba i njegove standardne devijacije. Prema tome, osetljivost raste sa porastom nagiba i smanjenjem standardne devijacije. Ovo je dobar kriterijum za poređenje analitičkih metoda i tehnika, jer što je veća osetljivost, uži je interval pouzdanosti i veća je preciznost. Primenom kalibracione krive definišu se neke veličine koje služe za poređenje različitih metoda (slika 21).



Slika 21. Kalibraciona kriva i veličine koje se definišu preko nje: \bar{x}_{sp} - srednja vrednost slepe probe, x_L - granični signal merenja, S – nagib kalibracione prave = osetljivost.

Osetljivost, S , je svojstvo instrumenta, a u instrumentalnoj analizi izražava se kao nagib kalibracione krive $y = f(x)$:

$$S = \frac{\Delta y}{\Delta x} \quad (43)$$

Linearni deo kalibracione krive naziva se dinamičkim opsegom za datu metodu, a nagib ovog dela krive daje osetljivost metode. Što je veća osetljivost i veći odnos signal/šum, merenje je preciznije i tačnije.

Prema IUPAC-ovoj definiciji, *limit detekcije*, c_L , je najmanja koncentracija ili količina analita za koju se može tvrditi da se statistički razlikuje od slepe probe. Izražava se u jedinicama koncentracije ili količine za datu analitičku metodu, a iskazuje se jednačinom:

$$c_L = \frac{x_L - \bar{x}_{sp}}{m} \quad (44)$$

gde je: x_L – granični analitički signal koji odgovara koncentraciji c_L ,
 \bar{x}_{sp} – srednja vrednost slepe probe za n ispitivanja (obično $n \geq 20$) i
 m – analitička osetljivost.

Detekcioni limit se može izraziti preko standardne devijacije slepe probe, standardne devijacije fitovanja kalibracione prave ili standardne devijacije odsečka (S):

$$c_L = \frac{k \cdot S}{m} \quad (45)$$

gde je k numerički faktor izabran prema željenom nivou pouzdanosti. Obično se uzima da je $k = 3,3$, što bi trebalo da odgovara verovatnoći od 99,86 % , tj. verovatnoći da će se 99,86 % x_L nalaziti u datom intervalu pouzdanosti. Međutim, u većini slučajeva ova vrednost za k odgovara verovatnoći od 95 %, jer se Gausova kriva ne primenjuje striktno.

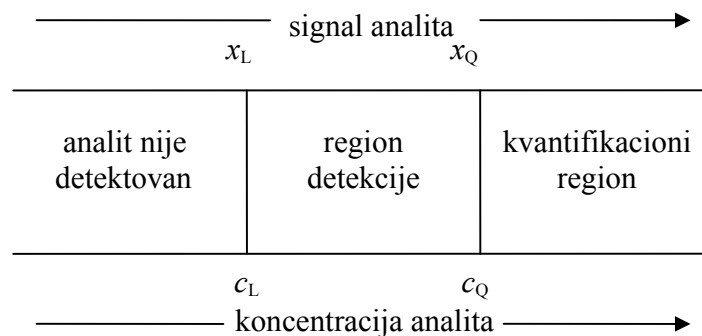
Kvantifikacioni limit (granica određivanja) je najmanja koncentracija ispitivane supstance u uzorku koja može biti određena sa prihvatljivom preciznošću i tačnošću, pod datim eksperimentalnim uslovima i izračunava sa na osnovu jednačine:

$$c_Q = \frac{10 \cdot S}{m} \quad (46)$$

Postoje tri glavna analitička regiona (slika 22) povezana sa određivanjem supstance:

- region u kome se analit ne može pouzdano odrediti, za koncentracije manje od c_L ,
- detekcioni region, za koncentracije između c_L i c_Q i

- kvantifikacioni region, za koncentracije veće ili jednake c_Q .



Slika 22. Regioni analitičkog određivanja.

Poznato je da su visoka osetljivost i nizak limit detekcije, koji se pripisuju kinetičkim metodama, rezultat katalitičkih reakcija. Jacimirskii razmatra pojam minimalne koncentracije supstance koja se može odrediti ovim metodama. Ona je ograničena na merenje inicijalne brzine reakcije $A + B \xrightarrow{C} P$, koja je katalizovana katalizatorom, C:

$$\frac{d[P]}{dt} = k \cdot \pi_c \cdot [C_0] = k' \cdot [C_0] \quad (47)$$

gde je π_c faktor koji uključuje koncentracije reaktanata (npr. $[A]_0 [B]_0$), a doprinos nekatalitičke reakcije uzima se da je jednak nuli. Koncentracija katalizatora je:

$$[C_0] = \frac{\frac{d[P]}{dt}}{k\pi_c} = \frac{\Delta[P]}{k\pi_c \Delta t} \quad (48)$$

Iz jednačine (48) sledi da minimalna koncentracija katalizatora koja se može odrediti zavisi od minimalne promene koncentracije proizvoda koja se može izmeriti određenom instrumentalnom tehnikom. Duže vreme Δt , veća koncentracija reaktanata i veća konstanta brzine smanjuju koncentraciju katalizatora koja se može odrediti.

Teorijski i praktični detekcioni limit se najčešće ne slažu za nekoliko redova veličine. Postoje različiti razlozi za ovo neslaganje, od kojih je najznačajniji efekat pozadine koji potiče od nekatalizovane reakcije. Ako se njen doprinos uzme u obzir, ukupna brzina reakcije je $v = v_c + v_o$, odnosno

$$\frac{d[P]}{dt} = k \cdot \pi_c [C]_o + k' \pi_c \quad (49)$$

Što je manja brzina nekatalizovane reakcije, niža će biti $[C]_{o,\min}$. Doprinos nekatalizovane reakcije kroz efekat pozadine može se izraziti preko faktora α , koji varira između 0 (odsustvo nekatalitičke reakcije) i 1 (odsustvo katalitičke reakcije). Takav doprinos se može izraziti sledećom jednačinom:

$$[C]_{o,\min} = \frac{\Delta[P]_{\min}}{\Delta t_{\max} k \cdot \pi_C} + \frac{\alpha \cdot v_o}{k \cdot \pi_C} \quad (50)$$

koja za $v_o = k' \pi_C [C]_{o,\min}$ ima vrednost:

$$[C]_{o,\min} = \frac{\Delta[P]_{\min}}{\Delta t_{\max} k \cdot \pi_C} + \alpha \frac{k'}{k} \quad (51)$$

gde je:

$$\frac{k'}{k} = \exp[-(E_o - E_{kat}) / RT]$$

E_o i E_{kat} – energija aktivacije nekatalitičke i katalitičke reakcije, respektivno.

Najniži detekcioni limit dobija se kada se k'/k zanemari (jednačina 51).

Mottola je dao izraz za izračunavanje osetljivosti i detekcionog limita katalitičkih metoda inicijalne brzine, fiksnog i varijabilnog vremena:

$$-\frac{\Delta[A]}{\Delta t} = [A]_o (k' + k[C]_o) \quad (52)$$

i detekcioni limit identifikovao sa odsečkom ($[A]_o \cdot k'$) krive $-\Delta[A] / \Delta t = f([C]_o)$.

U tabeli 8 dati su izrazi koji definišu osetljivost i limit detekcije u kinetičkim metodama primenjenim na katalitičke reakcije.

Tabela 8. Osetljivost i detekcioni limit u kinetičkim metodama određivanja.

Metoda	Kalibraciona prava	Osetljivost	Detekcioni limit
inicijalne brzine	$\Delta[P] / \Delta t = k \pi_C [C]_o$	$k \pi_C$	$3S_B / k \pi_C$
fiksnog vremena	$\Delta[P] = k \pi_C \Delta t [C]_o$	$k \pi_C \Delta t$	$3S_B / k \pi_C \Delta t$
varijabilnog vremena	$1 / \Delta t = k \pi_C [C]_o / \Delta[P]$	$k \pi_C / \Delta[P]$	$3S_B \Delta[P] / k \pi_C \Delta t$

Zbog jednostavnosti, izrazi u tabeli ne uključuju doprinos nekatalitičke reakcije. Ako je udeo nekatalitičke reakcije značajan, izrazi za detekcioni limit se modifikuju delom koji je

proporcionalan odnosu konstanti brzine nekatalizovane i katalizovane reakcije (jednačina 51), dok izraz za osetljivost ne treba menjati. Može se zaključiti da:

- osetljivost raste, a detekcioni limit opada sa povećanjem konstante brzine i koncentracije reaktanata,
- u metodi fiksnog vremena Δt utiče na isti način na ove parametre, i poželjno je koristiti integralni oblik i
- u metodi varijabilnog vremena $\Delta[P]$ treba da bude što manje, i preporučuje se primena diferencijalnog oblika.

Visoka osetljivost i nizak detekcioni limit katalitičkih reakcija zahtevaju posebnu brigu u pripremi, čuvanju i prenosu rastvora niske koncentracije koji se koriste, kako bi se izbegle greške usled gubitaka ili kontaminacije uzorka. Posebno pažljivo treba prati stakleno laboratorijsko posuđe, jer može izazvati kontaminaciju metalima u tragovima. Tragovi metala u reagensima, mineralnim kiselinama i vodi koji se koriste u pripremi rastvora i standarda ograničavaju detekcioni limit. Najbolji način za dobijanje vode visoke čistoće je kombinacija destilacije i jonske izmene. Plastika ima prednost u odnosu na staklo, mada skladištenje u polietilenskim bocama može dovesti do kontaminacije plastifikatorima koji apsorbuju UV zračenje i mogu biti potencijalni reduktori. Drugi problem kod razblaženih rastvora je mogućnost adsorpcije jona na zidove suda, što se može izbeći upotrebom politetrafluoroetilenskih boca i čuvanjem rastvora na niskom pH i u frižideru, a ukoliko je moguće, dodati i maskirajući agens koji ne smeta prilikom kinetičkih određivanja.

Osetljivost i detekcioni limit kinetičkih metoda se mogu poboljšati optimizacijom eksperimentalnih uslova (temperatura, pH vrednost, koncentracija reaktanata, jonska jačina, dielektrična konstanta rastvarača) primenom separacionih tehnika i pre svega upotrebom aktivatora. Primenom različitih aktivatora može se povećati osetljivost kinetičkih metoda za nekoliko redova veličine, a da se pri tome reproduktivnost i selektivnost bitno ne menjaju. U odnosu na spektrofotometrijske metode, kinetičke metode su za jedan do pet redova veličine osetljivije (*Houston, 2001; Perez-Bendito i Silva, 1988*).

Selektivnost

Krajnji stepen selektivnosti je odsustvo interferencija. Prema IUPAC-u, selektivnost je stepen interferiranja drugih supstanci na određivanje analita datom metodom. Interferent je supstanca koja dovodi do sistematske greške u određivanju analita, i može biti aktivan (direktno interaguje sa analitom, nekom komponentom indikatorske reakcije ili rastvaračem) i inertan (doprinosi pozitivno ili negativno analitičkom signalu bez interakcije sa komponentama reakcionog sistema).

Kinetičke metode su selektivnije od ravnotežnih, jer se zasnivaju na diferencijalnim, a ne apsolutnim merenjima. Zato izostaje interferencija signala od drugih komponenti uzorka sve dok one ne interaguju sa nekom komponentom sistema. Njihova veća selektivnost proizilazi iz dinamike procesa. Kratko vreme mešanja uzorka i reagenasa i činjenica da merenje počinje odmah nakon mešanja smanjuje efekat interferenata. Uticaj interferenata kod ravnotežnih metoda je znatno veći, što je posledica dugog vremena potrebnog za postizanje ravnoteže, u toku kog aktivni interferenti mogu reagovati sa jednom ili više komponenti sistema, uključujući i analit.

Postoje katalitički selektivne i analitički selektivne indikatorske reakcije. Postoji veliki broj indikatorskih reakcija koje su katalizovane samo jednim ili manjim brojem elemenata. Na primer, reakciju između tiosulfata i Fe(III) katalizuju samo joni Cu(II), u tom slučaju je reakcija katalitički selektivna. Međutim na brzinu nekog katalitički selektivnog procesa mogu da utiču druga jedinjenja koja pokazuju inhibitorno, oksidaciono ili redukciono dejstvo. U prisustvu ovih supstanci kinetička metoda nije selektivna u analitičkom smislu. Zato se može reći da indikatorska reakcija može biti katalitički veoma selektivna, ali analitička metoda koja primenjuje ovu reakciju ne mora biti analitički selektivna. Za povećanje selektivnosti indikatorskih reakcija postoje različite mogućnosti. Jedan od načina je simultano određivanje pojedinih katalizatora u smesi na osnovu njihove različite aktivnosti pri različitim pH vrednostima sredine. Drugi način je maskiranje ometajućih supstanci u katalitički-neaktivna jedinjenja.

Tačnost i preciznost

Tačnost nekog rezultata označava blizinu tog rezultata njegovoj pravoj vrednosti i vezana je za odstupanja primenjene metode određivanja. Opisuje se kao apsolutna ili relativna greška. Tačnost se može odrediti poznavajući pravu vrednost merene veličine ili srednju vrednost velikog broja merenja iste. Kod kvantitativnih određivanja dobija se neka vrednost x_i opterećena greškom $x_i - \mu$. Veličina greške određuje tačnost ili ispravnost dobijenog rezultata. Što je numerička vrednost rezultata x_i bliža pravoj vrednosti μ , rezultat je tačniji i obratno. Tačnost kod kinetičkih metoda zavisi od pouzdanosti analitičke tehnike upotrebljene za merenje promene koncentracije u funkciji vremena i konstantnosti eksperimentalnih uslova.

Recovery je mera mogućnosti analitičke metode da tačno izmeri čistu supstancu kada se njena poznata količina (spike) doda u uzorak koji se rutinski analizira, pri čemu se uzima u obzir uticaj svih supstanci realno prisutnih u matriksu tog uzorka. Zbog toga je recovery u direktnoj vezi sa tačnošću metode i može da se koristi za procenu njene primenljivosti, naročito u situacijama kada nema odgovarajuće referentne metode ili referentnog materijala. Vrednosti rezultata oporavka između 95 i 105 % predstavljaju dokaz odsustva interferencija u određivanju analita. Kada se proverava recovery, problem predstavljaju često osobine same supstance (fizičko stanje u kome se nalazi, rastvorljivost itd.), a nekad i nemogućnost da se odgovarajuća supstanca dobije.

Preciznost je mera usaglašenosti rezultata dobijenih iz više paralelnih određivanja iz istog uzorka pod istim uslovima. Termin preciznost danas je zamenjen terminom *nepreciznost* koja se izražava standardnom devijacijom ili koeficijentom varijacije izračunatim iz grupe ponovljenih merenja, a predstavlja meru za slučajnu grešku. Na veličinu slučajne greške, odnosno na nepreciznost metode određivanja u jednoj/više serija uzoraka koje se rade u jednom danu utiču različiti faktori: nestabilnost instrumenta, promena temperature, promena sastava reagenasa i standarda, promena zapremine pipetiranjem, nejednako mešanje u svim uzorcima, složenost procedure rada, promena u uslovima rada u laboratoriji tokom dana, zamor operatera itd. Slučajna greška se povećava kada se metoda primenjuje iz dana u dan, jer se pojavljuju novi faktori uticaja: promene u reagensima i standardima, naročito ako se svakog dana priprema svež reagens, promene u radu aparata, smena osoblja koje radi itd. Zbog toga je za svaku metodu potrebno odrediti *ponovljivost* tj. *nepreciznost u seriji* (u jednom danu) i *srednju preciznost* tj. *nepreciznost iz-dana-u-dan*. Preciznost merenja brzine reakcije zavisi od:

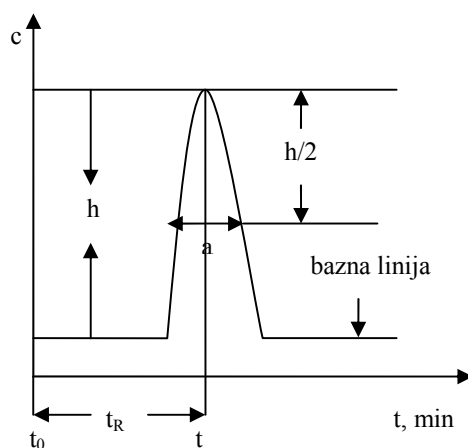
- šuma praćenog signala,
- reproduktivnosti eksperimentalnih uslova i
- veličine greške uzrokovane sistemima za prikupljanje podataka u vremenu merenja (ovaj izvor greške se može zanemariti zahvaljujući dobroj instrumentaciji).

Razvoj instrumentalne i kompjuterske tehnologije približava kinetičke metode ravnotežnim u pogledu brzine, preciznosti i jednostavnosti. Metode zasnovane na reakcijama prvog reda su preciznije, pa se preciznost metode može znatno povećati podešavanjem eksperimentalnih rezultata modelu prvog reda pomoću linearne regresije.

1.3. Hromatografija visoke efikasnosti (HPLC)

Hromatografija visoke efikasnosti je vrsta tečne hromatografije (Liquid Chromatography, LC) koja je znatno poboljšana u pogledu selektivnosti i rezolucije komponenata smeše. To je postignuto primenom kolone punjene stacionarnom fazom sastavljenom od sfernih mikro-čestica prečnika 2–5 μm , ili poroznih monolitnih materijala koji značajno dovode do pada pritiska u koloni (Rouessac i Rouessac, 2007, str. 63). U cilju dobijanja kontinualnog protoka mobilne faze i uspostavljanja dinamičke ravnoteže sa stacionarnom fazom, potrebno je na mobilnu fazu delovati visokim ulaznim pritiskom. Otuda se HPLC skraćenica prvobitno odnosila na tečnu hromatografiju pod visokim pritiskom (High Pressure Liquid Chromatography). Nazivana je i tečnom hromatografijom visoke rezolucije (high-resolution) kao i tečnom hromatografijom velike brzine (high-speed). Danas se skraćenica HPLC odnosi na kolonsku hromatografiju visoke efikasnosti (High Performance Liquid Chromatography).

HPLC koristi izabranu strukturnu osobinu supstanci i tokom analize ne menja njihovu hemijsku prirodu. U zavisnosti od hemijske strukture, sastojci smeše provode različito vreme u koloni jer imaju različite afinitete zadržavanja na nepokretnoj fazi. Nakon razdvajanja konstituenata smeše sledi njihovo određivanje preko električnog signala primenom odgovarajućeg detektora pri čemu se dobija *hromatogram*—kriva zavisnosti jačine signala od vremena (slika 23). Površinu zavisnosti direktno određuje koncentracija jedinjenja, a fizičko-hemijske osobine jedinjenja određuju njegov položaj na hromatogramu, vreme zadržavanja (retenciono vreme, t_R). Ovaj parametar se meri od trenutka kada se uzorak/standard ubace u kolonu do njihovog izlaska iz kolone.



Slika 23. Hromatogram

Hromatogram daje informacije o:

- broju komponenata koje sadrži analizirana smeša na osnovu broja signala,
- koncentracijama pojedinih sastojaka na osnovu relevantnih površina signala (kvantitativna analiza) i
- jedinjenju koje je prisutno (na osnovu retencionih vremena – kvalitativna analiza).

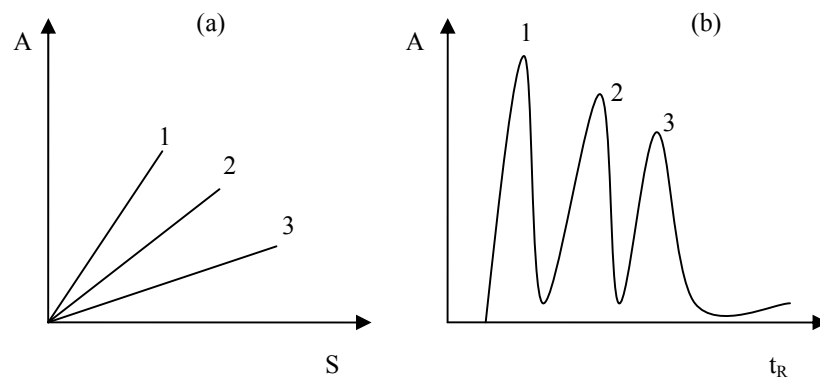
Karakteristike HPLC analize su: velika osetljivost detektora (10^{-9} do 10^{-14} g), jednostavnost rukovanja i jednostavna interpretacija hromatograma zbog čega je ona jedna od najmoćnijih metoda u analitičkoj hemiji. Ima veliku primenu u farmaceutskoj, prehrambenoj, kozmetičkoj industriji, u forenzici, ekologiji, medicini itd. Najveća primena je u određivanju lekova i droga. Negativne odlike ove tehnike su visoka cena uređaja, kolona, organskih rastvarača, supstanci i standarda.

Kvalitativna HPLC analiza

Dobijen hromatogram sa pikovima koji predstavljaju izdvojene komponente ukazuje samo na broj komponenti u nekom uzorku (smeši), ali ne i na vrstu supstance. Identifikacija supstanci se određuje poređenjem retencionih vremena hromatograma standarda i hromatograma izdvojene nepoznate komponente ispitivanog uzorka.

Kvantitativna HPLC analiza

Visina pika, ili tačnije površina pika izdvojene komponente direktno je proporcionalna koncentraciji. Kada se radi o simetričnom piku tada se najčešće koristi metoda poluvisine. Naime, kada se visina pika (h) pomnoži sa njegovom širinom (a) na poluvisini ($h/2$) dobija se vrednost koja približno iznosi 94 % površine pika. Ako se ista metoda koristi i za standard i za uzorak, greška od 6 % se poništava, a dobijeni rezultati su potpuno zadovoljavajući. Na ovaj način izračunate površine predstavljaju meru relativnih koncentracija komponenti u smeši. Za dobijanje njihovih apsolutnih koncentracija potrebno je napraviti kalibracioni dijagram, $A = f(S)$ (slika 24), za seriju standardnih rastvora supstanci koje se analiziraju, a koji će povezati površine pikova sa apsorbancom odgovarajućih komponenti (Gill R., 1986, str. 201).



Slika 24. Kalibracioni dijagram (a) i hromatogram (b) za tri komponente date smeše: A – apsorbancija, S – površina pika, t_R – retenciono vreme.

1.4. Regresiona i korelaciona analiza

Primenom metoda regresione i korelacione analize povezuju se dve ili više statističkih promenljivih.

1.4.1. Regresiona analiza

Regresiona analiza govori u kakvom odnosu stoji jedna promenljiva prema drugoj. Ona se izražava jednačinom u kojoj se poznata vrednost jedne ili više promenljivih koristi za izračunavanje nepoznatih vrednosti ostalih promenljivih. Najjednostavniji postupak regresione analize naziva se *metoda najmanjih kvadrata* (Skoog et al., 1998, str. 195). Regresiona analiza najčešće obuhvata dve promenljive, ako je u pitanju više promenljivih tada se naziva multipnom regresijom. Regresiona analiza dobija se primenom regresione jednačine:

$$y = mx + b \quad (53)$$

gde je:

b – odsečak na ordinati (odgovara vrednosti za y kada je x jednako nuli),

m – nagib regresione linije i

y – nepoznata promenljiva, koja se izračunava na osnovu vrednosti poznate promenljive x .

Odnos promenljive y prema promenljivoj x može da bude različit. Ako se vrednost y povećava za svaku uvećanu vrednost x , onda je y direktno zavisna veličina u odnosu na x . U ovom slučaju je nagib regresione linije pozitivan, tako da je $m > 0$. Suprotno ovome, nagib regresione linije može da bude negativan kada je $m < 0$. U tom slučaju se vrednost y smanjuje za svaku uvećanu vrednost x . Ukoliko promenljiva y ne zavisi od promenljive x , regresiona linija je paralelna sa x -osom.

Pravac koji se dobije metodom najmanjih kvadrata minimizuje zbir kvadrata svih pojedinačnih merenja od tog pravca. Kako bi se dobio pravac koji najbolje odgovara eksperimentalnim tačkama, ovom se metodom određuju standardna odstupanja za m i b .

Za izračunavanje regresione jednačine potreban je izvestan broj parova vrednosti za promenljive x i y . Odstupanje zbira kvadrata pojedinačnih vrednosti x i y od srednje vrednosti definiše se preko veličina S_{xx} , S_{yy} i S_{xy} :

$$S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2 = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N} \quad (54)$$

$$S_{yy} = \sum (y_i - \bar{y})^2 = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{N} \quad (55)$$

$$S_{xy} = \sum (x_i - \bar{x}, y_i - \bar{y})^2 = \sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{N} \quad (56)$$

gde su:

x_i i y_i – pojedinačni parovi vrednosti za x i y ,

N – broj parova koji se koriste za izradu regresione linije, a

\bar{x} i \bar{y} – srednje vrednosti promenljivih x i y , odnosno,

$$\bar{x} = \sum x_i / N, \text{ a } \bar{y} = \sum y_i / N$$

Na osnovu S_{xx} , S_{yy} i S_{xy} može se izvesti šest upotrebljivih veličina:

1) nagib pravca, m :

$$m = S_{xy} / S_{xx} \quad (57)$$

2) odsečak na ordinati, b :

$$b = \bar{y} - m\bar{x} \quad (58)$$

3) standardna greška odstupanja od regresione linije, s_r :

$$s_r = \sqrt{\frac{S_{yy} - m^2 S_{xx}}{N - 2}} \quad (59)$$

4) standardna greška nagiba, s_m :

$$s_m = \sqrt{s_r^2 / S_{xx}} \quad (60)$$

5) standardna greška odsečka na ordinati, s_b :

$$s_b = s_r \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{N \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}} = s_r \sqrt{\frac{1}{N - (\sum x_i)^2 / \sum x_i^2}} \quad (61)$$

6) standardna greška odstupanja rezultata dobijenih iz regresione linije, s_c :

$$s_c = \frac{s_r}{m} \sqrt{\frac{1}{M} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{y}_c - \bar{y})^2}{m^2 S_{xx}}} \quad (62)$$

Jednačina (62) omogućuje izračunavanje standardnog odstupanja od sredine \bar{y}_c skupa M istovetnih analiza kada se koristi regresiona analiza koja sadrži N tačaka. \bar{y} je aritmetička sredina vrednosti y za N tačaka. Standardna greška odstupanja od regresione linije, s_r (jednačina 59) je standardno odstupanje od y kada se odstupanja ne mere od aritmetičke sredine y (kao što je to uobičajno), nego od izvedenog pravca:

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [y_i - (b + mx_i)]^2}{N - 2}} \quad (63)$$

Broj stepena slobode je $N - 2$, jer se jedan stepen izgubi za izračunavanje m , a jedan za određivanje b .

Tačnija vrednost promenljive može se izračunati primenom *kompjuterskih programa za linearnu regresiju* kao što su *MS Excel i Micro Cal Origin*.

1.4.2. Korelaciona analiza

Kao što je već rečeno, regresionom analizom se dobija jednačina pomoću koje se jedna promenljiva izračunava iz druge promenljive, a korelaciona analiza pokazuje stepen zavisnosti između te dve promenljive. Korelaciona analiza može da se koristi da bi se pokazalo na koji način regresiona linija objašnjava varijaciju u vrednosti zavisno promenljive, a ako je potrebno da se odredi samo stepen zavisnosti između promenljivih, a nije potrebno da se prouči i priroda te zavisnosti, moguće je koristiti samo korelacionu analizu bez regresione. Stepen zavisnosti između promenljivih određuje veličina odstupanja podataka oko regresione linije, a izražava se *korelacionim koeficijentom* (r), koji se izračunava iz izraza:

$$r = \frac{N \sum xy - \sum x \sum y}{\sqrt{[N \sum x^2 - (\sum x)^2]} \cdot \sqrt{[N \sum y^2 - (\sum y)^2]}} \quad (64)$$

i to direktno iz posmatranih vrednosti promenljivih bez prethodnog određivanja regresione prave. Ako između dve promenljive postoji apsolutno slaganje, odnosno ako svi podaci leže na regresionoj liniji, korelacioni koeficijent je jednak 1; nasuprot ovome je slučaj kada između promenljivih nema zavisnosti, odnosno kada je korelacioni koeficijent jednak nuli. Pri tome,

potrebno je imati u vidu činjenicu da vrednost korelacionog koeficijenta zavisi od broja merenja (sa porastom broja eksperimentalnih tačaka raste njegova vrednost) i preciznosti merenja (kod nekih merenja dolazi do izražaja veliko odstupanje pojedinih tačaka od srednje vrednosti). Zbog toga je teško definisati njegovu vrednost koja bi se smatrala zadovoljavajućom. Poželjno je da ta vrednost bude veća od 0,90.

Korelacioni koeficijent može biti pozitivnog ili negativnog znaka. Ako je korelacioni koeficijent pozitivan, znači da između promenljivih x i y postoji direktna zavisnost, a ako je negativan, zavisnost je inverzna. Prema tome vrednosti za korelacioni koeficijent se kreću od -1 do $+1$. Znak korelacionog koeficijenta i nagib regresione linije moraju da se slažu.

U suštinskom pogledu za korelaciju sa kaže da je: vrlo visoka, visoka, znatna, neznatna i niska. Ne postoje jedinstvena gledišta o tome koje numeričke vrednosti odgovaraju ovakvoj gradaciji. Sledeća skala ima, uglavnom, karakter preporuke:

- vrlo visokom, ako je $0,9 < |r| \leq 1$
- visokom, ako je $0,7 < |r| \leq 0,9$
- znatnom, ako je $0,5 < |r| \leq 0,7$
- neznatnom, ako je $0,2 < |r| \leq 0,5$
- niskom, ako je $0,0 < |r| \leq 0,2$

2. EKSPERIMENTALNI DEO

2.1. Program i metodika rada

Predmet disertacije je razrada kinetičko–spektrofotometrijskih metoda za određivanje mikrokoličina pojedinih komponenata (uree, streptomicina, neomicina, Na-salicilata, ampicilina i histidina) u rastvoru i primena istih za određivanje navedenih supstanci u farmaceutskim preparatima.

Brzina reakcije praćena je spektrofotometrijski preko promene apsorbance rastvora u funkciji vremena odigravanja reakcije na izabranoj talasnoj dužini.

Za obradu kinetičkih parametara primenjena je diferencijalna varijanta tangensne metode na osnovu linearne zavisnosti apsorbance rastvora od vremena u određenim intervalima odigravanja reakcije.

Validacija metoda izvršena je određivanjem intervala linearnosti, limita detekcije, tačnosti, preciznosti i selektivnosti.

Aplikativnost metoda je proverena pri određivanju gore navedenih supstanci u farmaceutskim preparatima. Rezultati analiza su upoređeni sa rezultatima dobijenim primenom uporednih (referentnih) metoda.

2.2. Eksperimentalni postupak

2.2.1. Aparati

Prilikom razrade metoda korišćena je sledeća oprema:

1. UV/Vis spektrofotometar Perkin-Elmer Lambda 15 sa protočnim kivetama dužine optičkog puta 10 i 2 cm za snimanje apsorpcionih spektrara i praćenje promena apsorbance sa vremenom kod određivanja uree, streptomicina, neomicina i Na-salicilata;

2. UV/Vis spektrofotometar Agilent 8453 sa kivetom dužine optičkog puta 1 cm za snimanje apsorpcionih spektara i praćenje promena apsorbance sa vremenom kod određivanja ampicilina i histidina;
3. HPLC sistem Agilent Technologies 1200 za uporedno određivanje streptomicina, N-salicilata i ampicilina;
4. Biohemijski automatski analizator Global 300 BPC BioSed za određivanje uree u urinu UV enzimatskom metodom;
5. Univerzalni termostat-tip 10 za termostatiranje rastvora u kivetama kod uređaja (1);
6. Termostat Julabo MP 5A Open Bath Circulations za termostatiranje rastvora;
7. Analitička vaga Mettler Toledo AB-204-S za odmeravanje čvrstih supstanci;
8. pH metar Hanna Instruments za merenje pH vrednosti rastvora;
9. Autoklav, za sterilizaciju podloga u mikrobiološkoj metodi, Sutjeska, Beograd;
10. Termostat, Incuterm, Raypa;
11. MicroMed high purity water system, TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH za dobijanje demineralizovane vode;
12. Varijabilne automatske pipete Lab Mate⁺ za pipetiranje rastvora i
13. Hronometar za merenje vremena.

2.2.2. Reagensi

Sudovi koji su korišćeni prani su etanolnim rastvorom KOH, zatim rastvorom HCl (1:1), ispirani česmenskom, destilovanom i dejonizovanom vodom. Rastvori su pripremani sa dejonizovanom vodom specifične provodljivosti $0,05 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. U radu su korišćeni sledeći reagensi:

- rastvor uree koncentracije $8,33\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ pripreman je rastvaranjem odgovarajuće mase uree, *Merck, p.a.*;
- rastvor ureaze koncentracije $3500 \text{ U}\cdot\text{dm}^{-3}$ pripreman je neposredno pre početka rada razblaživanjem rastvora *bioMerieux*[®];

- rastvor R₃ je pripreman odmeravanjem supstanci tako da su njihove koncentracije u rastvoru bile:
 - Na-salicilat ($c = 6,2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), *J. T. Baker, p. a.*
 - Na-nitroprusid ($c = 3,35 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), *Merck, p. a.*
 - EDTA ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), *Merck, p. a.*

Ovaj rastvor napravljen je prema sastavu R₃ kolor reagensa Urea-Kit S 180 *bioMerieux*[®] SA, Francuska, ref. 61913, ali bez fosfatnog pufera, koji je pripremljen kao poseban rastvor;

- rastvor R₄ [Na-hidroksid, $c = 5 \cdot 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ i Na-hipohlorit, $c = 2,48 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$] korišćen je iz originalnog pakovanja reagensa Urea-Kit S 180 *bioMerieux*[®] SA, Francuska, ref. 61913;
- fosfatni puferi su pripremani mešanjem rastvora Na₂HPO₄, $c = 0,0667 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, i KH₂PO₄, $c = 0,0667 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, u određenom zapreminskim odnosima radi dobijanja potrebnih pH vrednosti pufera;
- radni rastvor SMS, $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pripreman je odmeravanjem tačne mase streptomycin-trisulfata, *Sigma Aldrich*, i rastvaranjem u dejonizovanoj vodi;
- originalni set reagenasa *Pointe Scientific, Inc. USA*, korišćen je za UV enzimatsko određivanje uree na automatskom analizatoru;
- radni rastvor neomicina, $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pripreman je odmeravanjem tačne mase neomicin-trisulfata, *Sigma Aldrich*, i rastvaranjem u dejonizovanoj vodi;
- radni rastvor Na-salicilata, $c = 6,2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pripreman je odmeravanjem tačne mase Na-salicilata, (*J. T. Baker, p. a.*) i rastvaranjem u dejonizovanoj vodi;
- radni rastvor H₂O₂ pravljen je neposredno pre početka rada razblaživanjem 30 % rastvora H₂O₂, *Merck p. a.*;
- osnovni rastvor Fe(II), $c = 1 \cdot 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pravljen je rastvaranjem određene mase FeSO₄·7H₂O (*J. T. Baker, p. a.*) u 0,1 mol·dm⁻³ H₂SO₄ (*J. T. Baker, p. a.*). Radni rastvor Fe(II), $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pravljen je pre početka rada razblaživanjem osnovnog;
- rastvori acetatnih pufera pripremani su mešanjem rastvora Na-acetata, $c = 1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, i sirćetne kiseline, $c = 1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, (*J. T. Baker, p. a.*) u određenim zapreminskim odnosima i dopunjavanjem dejonizovanim vodom do iste zapremine (100 cm³) radi dobijanja potrebnih pH vrednosti pufera;

- radni rastvor ampicilina, $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pripreman je odmeravanjem određene mase ampicilin-trihidrata (*Dolber, Švajcarska, Ph.*) i rastvaranjem u dejonizovanoj vodi;
- radni rastvor histidina, $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pripreman je odmeravanjem određene mase L-histidina (*Merck, za biohemiju*) i rastvaranjem u dejonizovanoj vodi;
- osnovni rastvor Ni(II), $c = 1 \cdot 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pripreman je odmeravanjem određene mase nikel-hlorida (*Merck p.a.*) i rastvaranjem u dejonizovanoj vodi. Radni rastvor pravljen je pre početka rada razblaživanjem osnovnog;
- osnovni rastvor Na-hidroksida, $c = 1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pripreman je odmeravanjem određene mase Na-hidroksida (*Merck p.a.*) i rastvaranjem u dejonizovanoj vodi. Radni rastvor, $c = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pravljen je pre početka rada razblaživanjem osnovnog;
- radni rastvor KCl, $c = 1,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pripreman je odmeravanjem određene mase kalijum-hlorida (*Merck p.a.*) i rastvaranjem u dejonizovanoj vodi;
- koncentrovana fosforna kiselina, *Merck, p.a.*;
- glacijalna sirćetna kiselina, *Merck, za tečnu hromatografiju*;
- acetonitril, *Merck, za tečnu hromatografiju*;
- natrijum-dihidrogenfosfat, *Merck, p.a.*;
- sterilni fiziološki rastvor (0,9 % NaCl) za infuziju, *Hemofarm, Vršac*.

Svi standardni rastvori, koji se nisu mogli pripremati kao primarni standardni rastvori, standardizovani su poznatim metodama u cilju određivanja tačne koncentracije.

2.3. Eksperimentalni postupak

2.3.1. Kinetičko–spektrofotometrijska metoda za određivanje brzine indikatorske reakcije

Selektovane zapremine svih reaktanata su odmeravane pipetiranjem u epruvetu ili, kada je trebalo izbeći njihovo sukcesivno mešanje, u odvojene delove četvorokrake posude. Trenutak mešanja rastvora označen je kao početak reakcije evidentiran hronometrom. Rastvor je zatim prenet u mernu kivetu spektrofotometra. Očitavanje apsorbance je vršeno na odabranim talasnim dužinama na svakih 30 s u trajanju od 5 minuta, a startovalo se nakon prvog ili drugog minuta, zavisno od sistema. Grafik $A = f(t)$ predstavljao je kinetičku krivu. Na taj način je, umesto

veliĉine dc/dt odreĉivana njoj proporcionalna veliĉina dA/dt koja je proporcionalna brzini reakcije prema jednaĉini:

$$dA/dt = \varepsilon \cdot l \cdot dc/dt = \operatorname{tg}\alpha \quad (65)$$

gde je:

dc – promena koncentracije indikatorske supstance,

ε – molarni koeficijent apsorpcije,

l – debljina apsorpcionog sloja i

$\operatorname{tg}\alpha$ – tangens ugla nagiba linearnog dela kinetiĉke krive prema apscisnoj osi u koordinatnom sistemu $A = f(t)$.

Radi odabiranja optimalnih talasnih duŹina snimljeni su apsorpcioni spektri reaktanata, proizvoda ili meĉuproizvoda reakcija, tj. indikatorske supstance.

Za obradu kinetiĉkih parametara primenjena je diferencijalna varijanta tangensne metode na osnovu linearne zavisnosti apsorbanace rastvora od vremena odigravanja reakcije.

2.3.2. Procedura za reakcioni sistem R_3 -urea-ureaza- R_4

Postupak za kalibracionu pravu

Odabrane zapremine reagenasa odmeravane su u epruvetu sledećim redom: $0,5 \text{ cm}^3$ rastvora R_3 , razliĉite zapremine rastvora uree ($c = 8,33 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), $0,5 \text{ cm}^3$ rastvora fosfatnog pufera $\text{pH} = 7,5$ i vode do ukupno sraĉunate krajnje zapremine probe (4 cm^3). Nakon 5-minutnog termostatiranja ($25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$) dodato je $0,2 \text{ cm}^3$ rastvora enzima ureaze ($c = 3500 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$), a potom i $0,2 \text{ cm}^3$ rastvora R_4 po isteku prve minute od dodavanja enzima. Rastvor je posle meŹanja prebaĉen u cilindriĉnu kvarcnu kivetu sa duplim zidovima, optiĉkog puta 2 cm . Za podeŹavanje „nule“ ureĉaja koriŹćena je dejonizovana voda. Brzina hidrolize uree praĉena je spektrofotometrijski merenjem porasta apsorbanace u toku 5 min na 700 nm poĉev od druge minute od dodavanja R_4 .

Postupak za odreĉivanje uree u farmaceutskom preparatu

Atopik, krema, 5% uree, Medical cosmetics, Crystal derma, d.o.o., Beograd.

Odmereno je $0,0802 \text{ g}$ kreme i rastvoreno dejonizovanom vodom u normalnom sudu od 100 cm^3 . Alikvoti ovog rastvora ekstrahovani su 5 puta po 10 min sa po 10 cm^3 n-heksana. Vodene frakcije su nakon zavrŹene ekstrakcije profiltrirane kroz plavu traku (Whatman No. 42) i

sakupljane u normalni sud od 100 cm³. Od ovog rastvora je odmeravana odgovarajuća zapremina za kinetičko-spektrofotometrijska merenja (tabela 11).

2.3.3. Procedura za reakcioni sistem R₃-urea-streptomicin-ureaza-R₄

Postupak za kalibracionu pravu

Odabrane zapremine reagenasa odmeravane su u epruvetu sledećim redom: 1 cm³ rastvora R₃, 0,1 cm³ rastvora uree ($c = 8,33 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), 0,5 cm³ rastvora fosfatnog pufera pH = 7,5, različite zapremine rastvora SMS ($c = 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) i vode do ukupno sračunate krajnje zapremine probe (4 cm³). Nakon 5-minutnog termostatiranja ($25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$) dodato je 0,2 cm³ rastvora enzima ureaze ($c = 3500 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$), a potom i 0,2 cm³ rastvora R₄ po isteku prve minute od dodavanja enzima. Rastvor je posle mešanja prebačen u cilindričnu kvarcnu kivetu sa duplim zidovima, optičkog puta 2 cm. Za podešavanje „nule“ uređaja korišćena je dejonizovana voda. Brzina degradacije SMS praćena je spektrofotometrijski merenjem promene apsorbance u toku 5 min na 700 nm počev od druge minute od dodavanja R₄.

Postupak za određivanje streptomicina u farmaceutskom preparatu

Streptomicin, prašak za injekcije, 1 g streptomicina u obliku sulfata (SMS), Galenika a.d., Beograd.

Sadržaj bočice praška za injekcije rastvoren je u dejonizovanoj vodi i kvantitativno prenet u normalni sud zapremine 1 dm³ i rastvoren. Za kinetičko–spektrofotometrijsko određivanje SMS alikvoti ovog rastvora su otpipetirani saglasno koncentracijama datim u tabeli 14.

Postupak za određivanje streptomicina u humanom urinu

Za analizu korišćen je uzorak jutarnjeg humanog urina. Sadržaj uree u uzorku određen je modifikovanom Berthelot-ovom metodom. Nakon toga je u 0,5 cm³ urina dodata odgovarajuća zapremina rastvora SMS ($c = 10 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$) i 15 cm³ dejonizovane vode. Posle mešanja, uzorak je centrifugiran 5 min na 3000 o/min da bi se istaložio sediment. Supernatant je aspiriran i prenet u normalni sud od 50 cm³ i razblažen vodom do crte. Sadržaj uree u supernatantu uzorka je proveren UV enzimatskom metodom. Za kinetičko–spektrofotometrijsko određivanje SMS alikvoti supernatanta su otpipetirani saglasno koncentracijama datim u tabeli 15 primenom metode standardnog dodatka.

Uporedna HPLC metoda za određivanje streptomicina

Odredene zapremine radnog rastvora SMS su odmeravane i dopunjavane mobilnom fazom [(0,025 mol·dm⁻³ NaH₂PO₄ + 0,01 mol·dm⁻³ Na-heksansulfonat, pH = 2,6) : acetonitril = 90:100] radi formiranja kalibracione krive. Odmeravane su i odgovarajuće zapremine pripremljenih uzoraka praška za injekcije i urina da bi se dobile koncentracije SMS iz tabela 14 i 15. Zapremina injektovanog uzorka bila je 50 µl, brzina protoka mobilne faze 1cm³/min, temperatura 40 °C. Detekcija eluata izvršena je na 195 nm. Korišćena je analitička kolona Spherisorb S50DS (5 µm) dimenzija 250 × 4,6 mm.

2.3.4. Procedura za reakcioni sistem R₃-urea-neomicin-ureaza-R₄

Postupak za kalibracionu pravu

Odabrane zapremine reagenasa odmeravane su u epruvetu sledećim redom: 1 cm³ rastvora R₃, 0,2 cm³ rastvora uree ($c = 8,33 \cdot 10^{-4}$ mol·dm⁻³), 0,5 cm³ rastvora fosfatnog pufera pH = 7,5, različite zapremine rastvora neomicina ($c = 1,0 \cdot 10^{-3}$ mol·dm⁻³) i vode do ukupno sračunate krajnje zapremine probe (4 cm³). Nakon 5-minutnog termostatiranja (25,0 ± 0,1 °C) dodato je 0,2 cm³ rastvora enzima ureaze ($c = 3500$ U·dm⁻³), a potom i 0,2 cm³ rastvora R₄ po isteku prve minute od dodavanja enzima. Rastvor je posle mešanja prebačen u cilindričnu kvarcnu kivetu sa duplim zidovima, optičkog puta 2 cm. Za podešavanje „nule“ uređaja korišćena je dejonizovana voda. Brzina degradacije neomicina praćena je spektrofotometrijski merenjem promena apsorbanace u toku 5 min na 700 nm počev od druge minute od dodavanja R₄.

Postupak za određivanje neomicina u farmaceutskim preparatima

Deksametazon Neomicin, kapi za oči, 5 mg/cm³ neomicinsulfata, Galenska laboratorija, Apotekarska ustanova Niš;

Dexamethason Neomycin, kapi za oči, 3,5 mg/cm³ neomicina, Galenika a.d., Beograd;

Neodeksacin, kapi za oči, 3,5 mg/cm³ neomicina, Hemofarm, a.d., Vršac.

Za kinetičko–spektrofotometrijsko određivanje neomicina alikvoti ovih preparata direktno su odmeravani prema koncentracijama radnih kriva, a na osnovu deklarisanh vrednosti, tabela 19.

Uporedna disk-difuzionna mikrobiološka metoda za određivanje neomicina

Antimikrobna aktivnost ispitivanih uzoraka neomicin kapi, testirana je na gram pozitivnu bakteriju *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (American Type Culture Collection).

Od prekončne kulture ispitivanog mikroorganizma uzgajanog na hranljivom agaru, napravljena je suspenzija turbiditeta 0,5 McFarlanda u sterilnom fiziološkom rastvoru, koja sadrži $1,5 \cdot 10^8$ CFU/cm³ (NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003). Nakon toga je, prema priloženom uputstvu, napravljena odgovarajuća podloga od Müller-Hinton agara. Podloge su sterilisane u autoklavu (u trajanju od 20 minuta, na temperaturi od 121 °C), zatim inokulisane sa po 0,1 cm³ pripremljene test suspenzije mikroorganizma i razlivene u sterilne petri-kutije prečnika 90 mm u porcijama od po 15 cm³. Nakon hlađenja podloga, na inokulisanu površinu pločastog agara postavljeni su sterilni celulozni diskovi prečnika 9 mm i na njih nanoseno po 20 µl antimikrobnog agensa standarda i navedenih farmaceutskih preparata neomicina. Standardni rastvor neomicin-sulfata nanošen je u koncentracijama: 5, 25, 50 i 100 µg·cm⁻³. Kao pozitivna kontrola korišćen je disk sa odgovarajućim antibiotikom (hloramfenikol 30 µg i tetraciklin 30 µg). Ceo postupak i svaka kontrola izvedena je u tri ponavljanja. Rezultati su prikazani u tabeli 19.

2.3.5. Procedura za reakcioni sistem *Na-salicilat*-vodonik peroksid-Fe(II)

Postupak za kalibracionu pravu

U odvojene delove četvorokrake posude odmeravane su odabrane zapremine sledećih rastvora: 0,7 cm³ fero-sulfata ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol·dm⁻³), 1,0 cm³ vodonik-peroksida ($c = 0,1$ mol·dm⁻³), različite zapremine Na-salicilata ($c = 6,23 \cdot 10^{-3}$ mol·dm⁻³), 0,3 cm³ acetatnog pufera pH = 3,9 i vode do ukupne zapremine probe od 15 cm³. Sud je termostatiran ($26,0 \pm 0,1$ °C) 5 min. Nakon mešanja sadržaj je odmah prebačen u cilindričnu kvarcnu kivetu sa dvostrukim zidom, optičkog puta dužine 10 cm. Za podešavanje „nule“ uređaja korišćena je dejonizovana voda. Brzina degradacije Na-salicilata praćena je spektrofotometrijski merenjem opadanja apsorbance reakcione smeše na 265 nm nakon 60 s od mešanja reakcionih komponenti svakih 30 s tokom 5 min.

Postupak za određivanje Na-salicilata u humanom serumu

Liotrol N, humani kontrolni serum, bioMerieux® SA, Francuska.

Humani liofilizovani serum rekonstituisan je sa 5 cm³ dejonizovane vode. U 0,5 cm³ seruma je dodat osnovni rastvor Na-salicilata, $c = 10$ mg·cm⁻³, i 10 cm³ acetonitrila. Nakon mešanja sadržaj je centrifugiran 5 min na 2400 o/min u cilju taloženja proteina. Supernatant je otpipetiran u normalni sud od 25 cm³. Talog je tretiran sa novih 10 cm³ acetonitrila i još jednom centrifugiran pri istim uslovima. Supernatant je sakupljen u isti normalni sud i dopunjen do crte acetonitriлом. Uzorak seruma pripremljen na ovaj način sadrži 1000 µg·cm⁻³ Na-salicilata. Za kinetičko–spektrofotometrijsko određivanje alikvot ovog rastvora je uparen do suva na vakuum uparivaču i rastvoren dejonizovanom vodom do polazne zapremine. Od ovog rastvora su odmeravane odgovarajuće zapremine da bi se dobile koncentracije navedene u tabeli 25.

Postupak za određivanje Na-salicilata u vinu

Graševina, belo vino, A. D. Kruševac.

Uzorak vina od 1 cm³ je spajkovan standardnim rastvorom Na-salicilata, $c = 10 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$, i razblažen dejonizovanom vodom u normalnom sudu od 100 cm³. Hromatografija na koloni rađena je na sefadesku LH-20, koji je pripremljen u sistemu rastvarača metanol-voda (1:1). Sakupljene frakcije su analizirane na osnovu snimljenih UV/Vis spektara upoređivanjem sa spektrom standarda. One koje su sadržavale Na-salicilat izabrane su za dalju analizu kinetičko-spektrofotometrijskom i referentnom HPLC metodom, pri čemu je bilo neophodno eliminisati sistem rastvarača metanol-voda uparavanjem do suva na vakuum uparivaču. Potom je suvi ostatak rastvoren odgovarajućom zapreminom vode. Od ovog rastvora su odmeravani alikvoti u skladu sa koncentracijama navedenim u tabeli 24 za kinetičko–spektrofotometrijska određivanja.

Uporedna HPLC metoda za određivanje Na-salicilata

Za određivanje Na-salicilata ovom metodom alikvoti pripremljenih uzoraka seruma i vina razblaženi su mobilnom fazom. Koncentracije su odgovarale vrednostima iz tabela 25 i 24.

Mobilna faza se sastojala iz: fosforne kiseline, acetonitrila i vode (2:400:600, v:v:v). Eluat je praćen na talasnoj dužini od 237 nm. Korišćena je analitička kolona Zorbax Eclipse Plus C18 (5 μm), dimenzija 250 × 4,6 mm. Zapremina injektovanih uzoraka bila je 10 μl, a brzina protoka mobilne faze bila je 1cm³/min na temperaturi od 25 °C.

2.3.6. Procedura za reakcioni sistem *ampicilin*-Ni(II)

Postupak za kalibracionu pravu

U odvojene delove četvorokrake posude odmeravane su odabrane zapremine rastvora: 0,3 cm³ niki-hlorida ($c = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), različite zapremine ampicilina ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), 0,4 cm³ natrijum-hidroksida ($c = 1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), 0,1 cm³ kalijum-hlorida ($c = 1,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) i vode do ukupne zapremine probe od 10 cm³. Sud je termostatiran ($25,0 \pm 0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$) 5 min. Nakon mešanja reaktanata sadržaj je odmah prebačen u kvarcnu kivetu optičkog puta dužine 1 cm. Za podešavanje „nule“ uređaja korišćena je dejonizovana voda. Brzina degradacije ampicilina praćena je spektrofotometrijski merenjem povećanja apsorbance reakcione smeše na 265 nm nakon 60 s od mešanja reakcionih komponenti svakih 30 s tokom 5 min.

Postupak za određivanje ampicilina u farmaceutskim preparatima

Pentrexyl[®], kapsule, 500 mg ampicilina u obliku ampicilin-trihidrata, Galenika a.d., Beograd;

Ampicilin, kapsule, 500 mg ampicilina u obliku ampicilin-trihidrata, Panfarma d.o.o., Beograd.

Masa praškastog sadržaja jedne kapsule određena je iz razlike masa pune i prazne kapsule. Sadržaj jedne „table“ (8 kapsula) izručen je u porculanski avan i homogenizovan. Masa koja odgovara masi sadržaja jedne kapsule odmerena je i rastvorena u 500 cm³ vode. Alikvot rastvora je filtriran kroz plavu traku, Whatman No. 42. Određene zapremine filtrata korišćene su direktno za kinetičko-spektrofotometrijsko određivanje ampicilina (tabela 30).

Pentrexyl[®], prašak za oralnu suspenziju, 250 mg ampicilina/5 cm³ suspenzije, Galenika a.d., Beograd.

Prašak je rastvoren dejonizovanom vodom prema uputstvu proizvođača. Rastvor koncentracije ampicilina 50 µg/cm³ pripremljen je dodatnim razblaživanjem suspenzije i filtriranjem kroz plavu traku, Whatman No. 42. Određene zapremine filtrata korišćene su direktno za kinetičko-spektrofotometrijsko određivanje ampicilina (tabela 30).

Postupak za određivanje ampicilina u humanom urinu

Za analizu korišćen je uzorak jutarnjeg humanog urina. U 10 cm³ uzorka dodato je 0,0153 g ampicilin-trihidrata. U cilju određivanja ampicilina kinetičko-spektrofotometrijskom metodom odmeravane su odabrane zapremine spajkovanog uzorka koje odgovaraju koncentracijama datim u tabeli 31.

Uporedna HPLC metoda određivanja ampicilina

Mobilna faza se sastojala iz dve faze:

- *mobilna faza A*: 0,25 cm³ glacijalne sirćetne kiseline, 25 cm³ natrijum-dihidrogenfosfata, $c = 0,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, 25 cm³ acetonitrila i vode do ukupne zapremine od 500 cm³ i
- *mobilna faza B*: 0,25 cm³ glacijalne sirćetne kiseline, 25 cm³ natrijum-dihidrogenfosfata, $c = 0,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, 200 cm³ acetonitrila i vode do ukupne zapremine od 500 cm³.

Za uravnoteženje kolone i eluiranje ampicilina korišćen je odnos mobilnih faza A:B = 85:15 u izokratskom protoku. Zapremina injektovanih uzoraka bila je 10 µl, a brzina protoka 1cm³/min na temperaturi od 25 °C. Eluat je praćen na talasnoj dužini od 254 nm. Korišćena je analitička kolona Zorbax Eclipse Plus C18 (5 µm), dimenzija 250 × 4,6 mm.

Za određivanje ampicilina alikvoti pripremljenih uzoraka kapsula, sirupa i urina razblaženi su mobilnom fazom. Koncentracije su odgovarale vrednostima iz tabela 30 i 31.

2.3.7. Procedura za reakcion sistem ampicilin-*histidin*-Ni(II)

Postupak za kalibracionu pravu

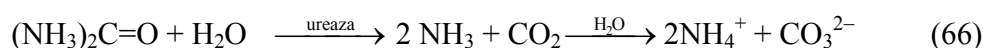
U odvojene delove četvorokrake posude odmeravane su odabrane zapremine rastvora: 0,1 cm³ nikel-hlorida ($c = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), 0,8 cm³ ampicilina ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), različite zapremine rastvora histidina ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) dodavane su pre mešanja reaktanata, 0,35 cm³ natrijum-hidroksida ($c = 1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), 0,5 cm³ kalijum-hlorida ($c = 1,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) i vode do ukupne zapremine probe od 10 cm³. Sud je termostatiran ($25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$) 5 min. Nakon mešanja reaktanata sadržaj je odmah prebačen u kvarcnu kivetu optičkog puta dužine 1 cm. Za podešavanje „nule“ uređaja korišćena je dejonizovana voda. Brzina degradacije ampicilina u prisustvu histidina praćena je spektrofotometrijski merenjem povećanja apsorbance reakcione smeše na 265 nm nakon 60 s od mešanja reakcionih komponenti svakih 30 s tokom 5 min.

3. REZULTATI I DISKUSIJA

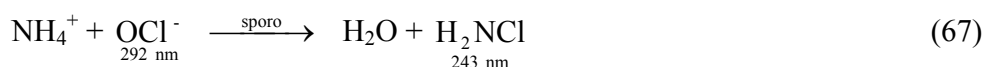
3.1. Kinetičko–spektrofotometrijsko određivanje uree

Prema biohemijsko-kliničkim protokolima, jedna od kolorimetrijskih metoda za rutinsko određivanje uree je modifikovana Berthelot-ova metoda koja se zasniva na dvostrukoj katalizi (I i II):

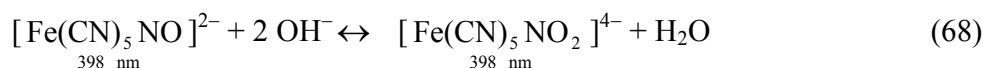
I kataliza se sastoji u hidrolizi uree pomoću ureaze pri čemu nastaje amonijum jon:



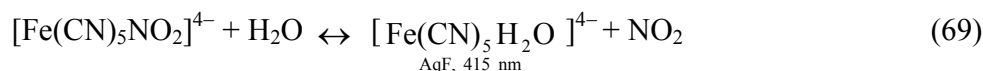
Nastali amonijumov jon reaguje sa hipohloritom i daje hloramin:



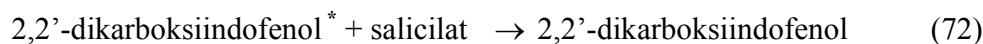
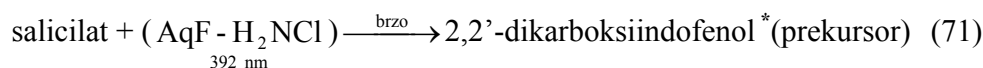
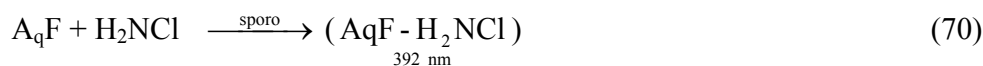
Reakcija teče u alkalnoj sredini u prisustvu nitroprusida, koji prelazi u nitropentacijanoferat (NF):



Nakon toga se uspostavlja ravnoteža između NF i akvapentacijanoferata (AqF):

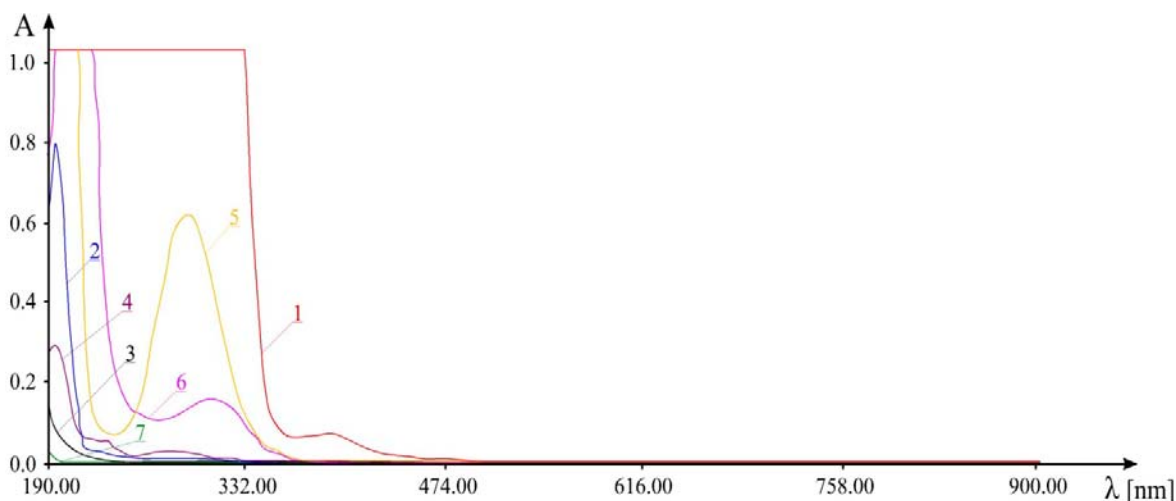


II AqF katalizuje vezivanje hloramina i salicilata pri čemu nastaje zeleno obojeni kompleks 2,2'-dikarboksiindofenola:



Intenzitet apsorbanse 2,2'-dikarboksiindofenola se, prema različitim preporukama meri na talasnim dužinama: 580 (*bioMerieux[®]sa*), 600 (*Radox Lab. Ltd.*) ili 630 nm (*Majkić-Singh i dr, 1995, str. 499*). Nedostaci ove metode su interferencija nekih antibiotika i nepogodnost za primenu na automatskim analizatorima (*Sunderman i Derman, 1970*).

U cilju adaptacije ove kolorimetrijske u kinetičko-spektrofotometrijsku metodu za određivanje uree najpre su snimljeni apsorpcioni spektri reaktanata, kao i spektri streptomocina (u obliku streptomycin sulfata, SMS) i neomicina (u obliku neomicin sulfata, NMS), čiji će se uticaj naknadno analizirati (slika 25). Maksimum u vidljivoj oblasti na 392 nm pripada reaktantu R₃ (kriva 1), a potiče od hidratisanog oblika Na-nitroprusida. Ostali reaktanti pokazuju jaku apsorpciju u UV oblasti. Apсорpcioni maksimum na 294 nm (kriva 5) odgovara apсорpciji hipohloritnog jona R₄ rastvora.

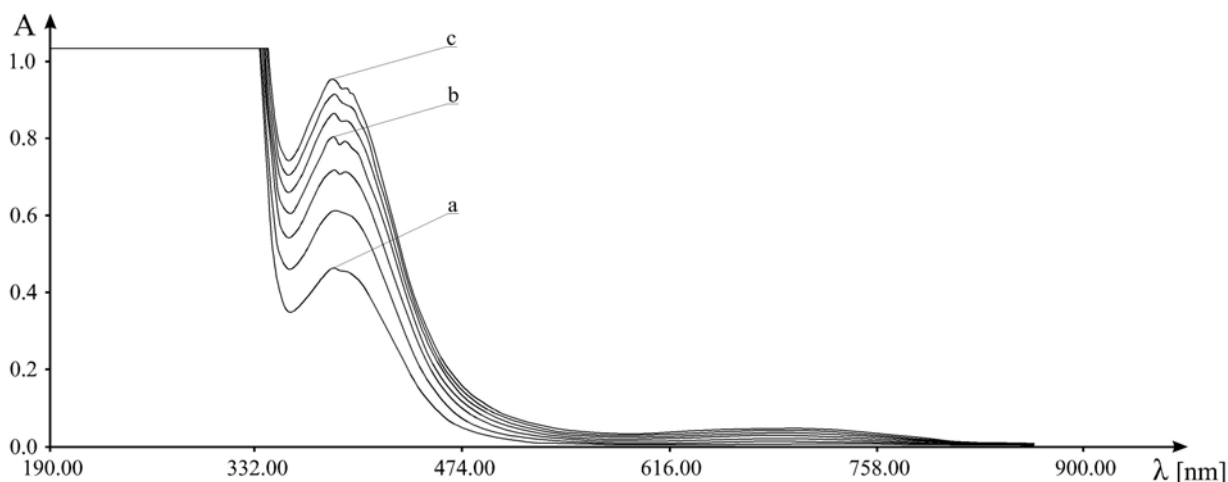


Slika 25. Apсорpcioni spektri reaktanata. Krive: 1 – 0,5 cm³ R₃[c(Na-salicilat) = 7,75·10⁻³ mol·dm⁻³, c(Na-nitroprusid) = 4,19·10⁻⁴ mol·dm⁻³, c(EDTA) = 1,25·10⁻⁴ mol·dm⁻³]; 2 - fosfatni pufer pH= 7,5; 3 – urea, c = 1,25 μg·cm⁻³; 4 – ureaza, c = 175 U·dm⁻³; 5 – 0,2 cm³ R₄[c(NaOCl) = 1,24·10⁻³ mol·dm⁻³, c(NaOH) = 2,5·10⁻² mol·dm⁻³]; 6 – SMS, c = 182,12 μg·cm⁻³; 7 – neomicin, c = 30,75 μg·cm⁻³; t = 25,0 ± 0,1 °C.

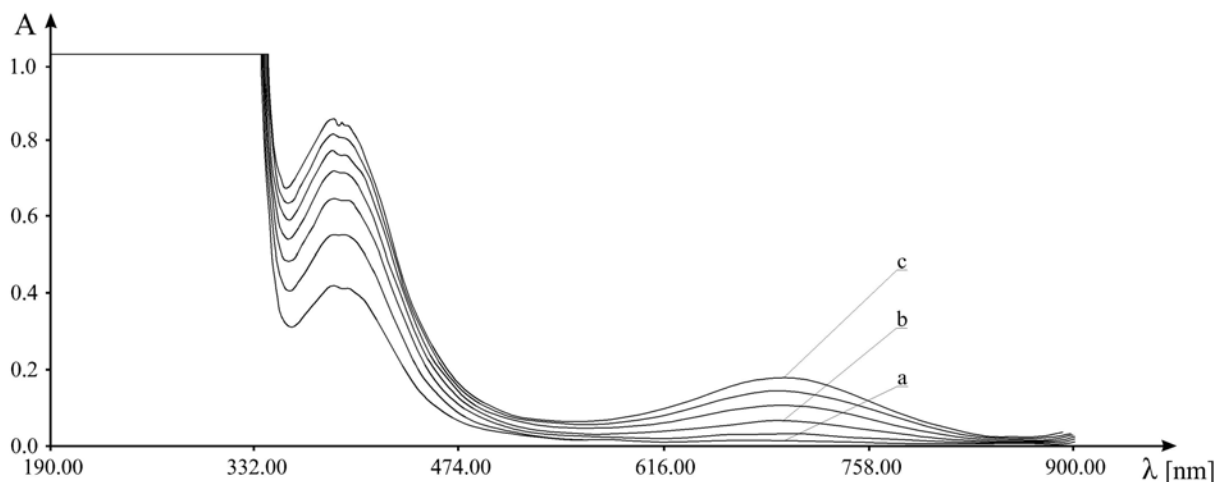
Potom su snimljeni apсорpcioni spektri ispitivanih reakcionih sistema bez uree (osnovna reakcija, slika 26) i sa ureom (ispitivana reakcija, slika 27). Snimanje apсорpcionog spektra oba sistema vršeno je u trajanju od 7,2 min, 60 s nakon dodavanja poslednjeg reagensa (R₄).

Na apсорpcionom spektru osnovne reakcije javlja se blago povećanje apсорpcije sa vremenom u opsegu talasnih dužina od 530 do 780 nm sa maksimumom na 700 nm. U intervalu talasnih dužina od 386 do 405 nm javlja se intenzivno rastući preklapajući apсорpcioni maksimum, koji potiče od maksimuma apсорpcije nitritopentacijanoferata (NF) i akvapentacijanoferata (AqF) koji su u ravnoteži (jednačine 68 i 69), što se može videti i u snimljenom apсорpcionom spektru proizvoda reakcije između Na-nitroprusida i R₄ (slika 28).

Sam Na-nitroprusid u fosfatnom puferu uopšte ne pokazuje maksimum u pomenutom intervalu, kao ni sistem Na-salicilat-R₄-fosfatni pufer.

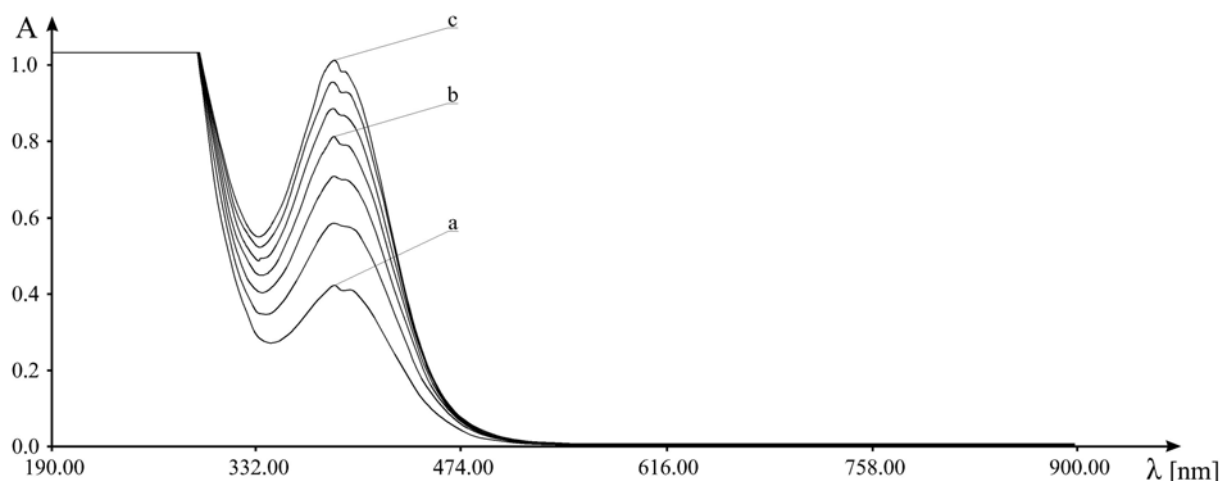


Slika 26. Promena apsorpcionog spektra osnovne reakcije sa vremenom, po dodatku R₄, nakon: a) 1 min; b) 4,6 min i c) 8,2 min. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $0,5 \text{ cm}^3 R_3[c(\text{Na-salicilat}) = 7,75 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{Na-nitroprusid}) = 4,19 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{EDTA}) = 1,25 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]; $c(\text{ureaza}) = 175 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$; $0,2 \text{ cm}^3 R_4[c(\text{NaOCl}) = 1,24 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{NaOH}) = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]; fosfatni pufer ($\text{pH} = 7,5$); $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.



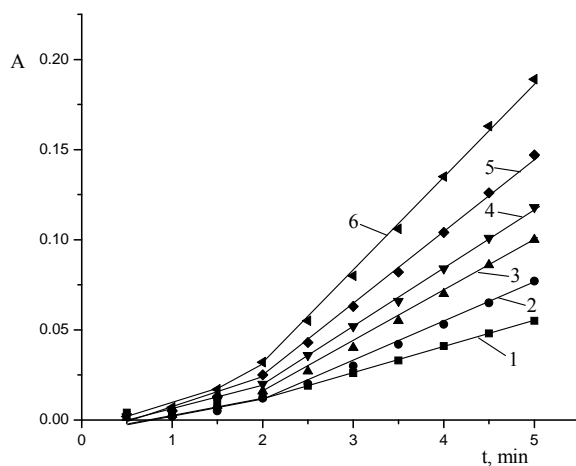
Slika 27. Promena apsorpcionog spektra ispitivane reakcije sa vremenom, po dodatku R₄, nakon: a) 1 min; b) 4,6 min i c) 8,2 min. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $0,5 \text{ cm}^3 R_3[c(\text{Na-salicilat}) = 7,75 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{Na-nitroprusid}) = 4,19 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{EDTA}) = 1,25 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]; $c(\text{urea}) = 1,25 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$; $c(\text{ureaza}) = 175 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$; $0,2 \text{ cm}^3 R_4[c(\text{NaOCl}) = 1,24 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{NaOH}) = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]; fosfatni pufer ($\text{pH} = 7,5$); $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

U ispitivanom reakcionom sistemu javljaju se, pored jakih apsorpcionih traka u UV oblasti, i dva apsorpciona pika u vidljivoj oblasti (slika 27). Povećanje apsorpcionog maksimuma na 700 nm, koji pripada 2,2-dikarboksiindofenolu, je znatno brže u prisustvu uree. U opsegu od 386 do 405 nm javlja se preklapanje apsorpcionih maksimuma koji potiču od: NF, AqF i kompleksa nagrađenog između AqF i hloramina (jednačine 68–70).



Slika 28. Promena apsorpcionog spektra nagrađenog proizvoda između Na-nitroprusida i reagensa R_4 sa vremenom, nakon: a) 1 min; b) 4,6 min i c) 8,2 min. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $c(\text{Na-nitroprusid}) = 4,19 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $0,2 \text{ cm}^3 R_4 [c(\text{NaOCl}) = 1,24 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c(\text{NaOH}) = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$; fosfatni pufer ($\text{pH} = 7,5$); $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Na osnovu svega prethodno izloženog, za razradu kinetičko–spektrofotometrijske metode za određivanje uree odabran je apsorpcijski maksimum na 700 nm za praćenje brzine odigravanja obe reakcije. Na slikama 26 i 27 može se videti da u prisustvu uree apsorpcijski maksimum u intervalu od 386 do 405 nm raste u mnogo manjoj meri nego što dolazi do istovremenog porasta apsorbanca na 700 nm. Promena apsorbanca sa vremenom praćena je tokom 5 min, 60 s nakon dodatka reagensa R_4 (slika 29). Dobijene zavisnosti $A = f(t)$ su linearne u celom ispitivanom



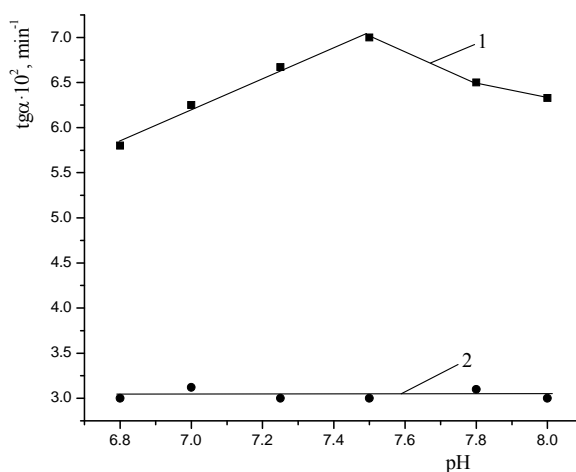
Slika 29. Promene apsorbanca rastvora sa vremenom za različite koncentracije uree: 1) bez uree, 2) $0,5 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$, 3) $1,00 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$, 4) $1,25 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$, 5) $1,75 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ i 6) $2,25 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$. Početne koncentracije u rastvoru: $0,5 \text{ cm}^3 R_3 [c(\text{Na-salicilat}) = 7,75 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c(\text{Na-nitroprusid}) = 4,19 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c(\text{EDTA}) = 1,25 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$; $c(\text{ureaza}) = 175 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$; $0,2 \text{ cm}^3 R_4 [c(\text{NaOCl}) = 1,24 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c(\text{NaOH}) = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$; $\text{pH} = 7,5$; $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

intervalu, ali su razlike u brzinama reakcija za različite koncentracije uree veoma male u početku odigravanja reakcije, do kraja druge minute. Najpogodniji vremenski interval za kinetičko ispitivanje i određivanje brzine reakcije je od 2 do 5 min, jer su promene apsorbance sa vremenom veće, što obezbeđuje veću tačnost i preciznost kinetičke metode.

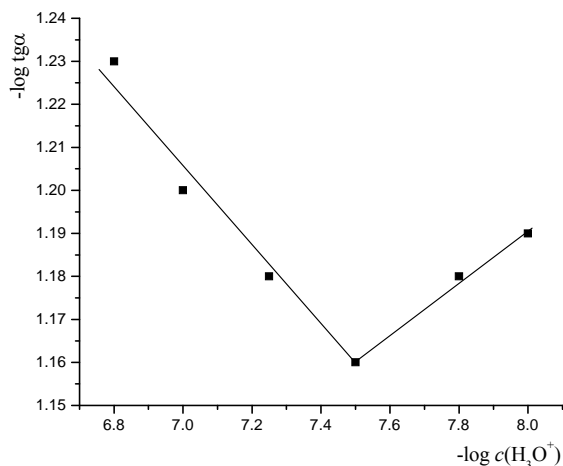
U cilju određivanja što nižih koncentracija uree, ispitani su optimalni uslovi odigravanja reakcija, u prisustvu i bez prisustva uree, u pogledu koncentracija svih učesnika u reakcionom sistemu.

3.1.1. Određivanje optimalnih uslova odigravanja reakcije

Uticao pH vrednosti fosfatnog pufera na brzine obe reakcije ispitivan je u intervalu od 6,8 do 8,0 (slika 30), odnosno u intervalu koncentracije H_3O^+ jona od $1,0 \cdot 10^{-8}$ do $1,58 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Kako je najveća razlika u brzinama ispitivane i osnovne reakcije pri $\text{pH} = 7,5$, ova vrednost je odabrana za dalja merenja. Brzina osnovne reakcije je približno konstantna u ispitivanom intervalu i nultog je reda u odnosu na koncentraciju H_3O^+ jona. Zavisnost brzine ispitivane reakcije od pH nije linearna. Za određivanje reda ove reakcije u odnosu na koncentraciju H_3O^+ jona prikazana je zavisnost negativnog logaritma brzine reakcije (iskazane kao tangens ugla nagiba kinetičke krive prema apscisnoj osi) i negativnog logaritma koncentracije H_3O^+ jona (slika 31). Red reakcije je određen i iznosi $-0,1$ i $+0,06$ za interval pH od 6,8 do 7,5 i od 7,5 do 8,0, respektivno.

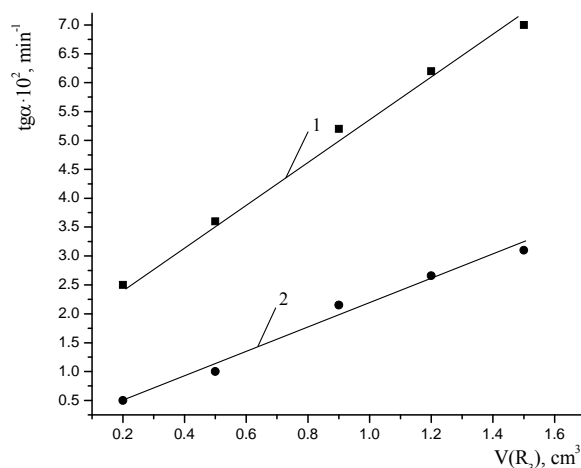


Slika 30. Zavisnost brzine ispitivane (1) i osnovne reakcije (2) od pH vrednosti. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $1,5 \text{ cm}^3 \text{ R}_3[\text{c}(\text{Na-salicilat}) = 2,33 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $\text{c}(\text{Na-nitroprusid}) = 1,26 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $\text{c}(\text{EDTA}) = 3,75 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]; $\text{c}(\text{urea}) = 1,25 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$; $\text{c}(\text{ureaza}) = 175 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$; $0,2 \text{ cm}^3 \text{ R}_4[\text{c}(\text{NaOCl}) = 1,24 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $\text{c}(\text{NaOH}) = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]; $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$.



Slika 31. Zavisnost $-\log tga$ ispitivane reakcije od $-\log c(\text{H}_3\text{O}^+)$. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $1,5 \text{ cm}^3 \text{ R}_3 [c(\text{Na-salicilat}) = 2,33 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c(\text{Na-nitroprusid}) = 1,26 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c(\text{EDTA}) = 3,75 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$; $c(\text{urea}) = 1,25 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$; $c(\text{ureaza}) = 175 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$; $0,2 \text{ cm}^3 \text{ R}_4 [c(\text{NaOCl}) = 1,24 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c(\text{NaOH}) = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$; $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

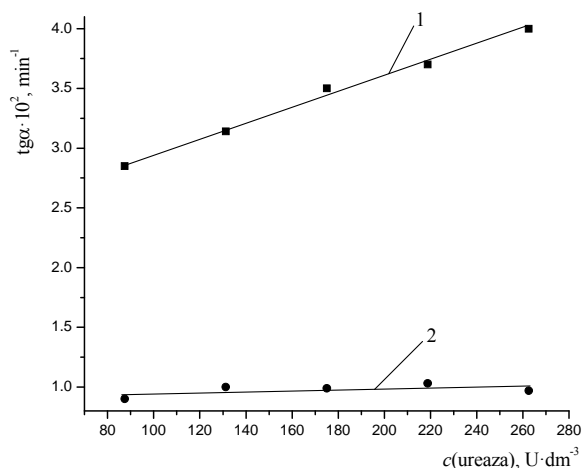
Brzine ispitivane i osnovne reakcije su linearno zavisne od koncentracije (iskazane preko zapremine) reagensa R_3 u ispitivanom intervalu (slika 32) i obe su prvog reda u odnosu na koncentraciju ovog reagensa. Na osnovu dobijenih zavisnosti, zapremina od $0,5 \text{ cm}^3$ reagensa R_3 izabrana je kao optimalna, jer pri većim vrednostima dolazi do skraćenja intervala linearnosti kinetičkih krivih zbog čega se tangens ugla nagiba tih pravih određuje sa manjom tačnošću.



Slika 32. Zavisnost brzine ispitivane (1) i osnovne reakcije (2) od zapremine reagensa R_3 . Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $c(\text{urea}) = 1,25 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$; $c(\text{ureaza}) = 175 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$; $0,2 \text{ cm}^3 \text{ R}_4 [c(\text{NaOCl}) = 1,24 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c(\text{NaOH}) = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$; $\text{pH} = 7,5$; $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

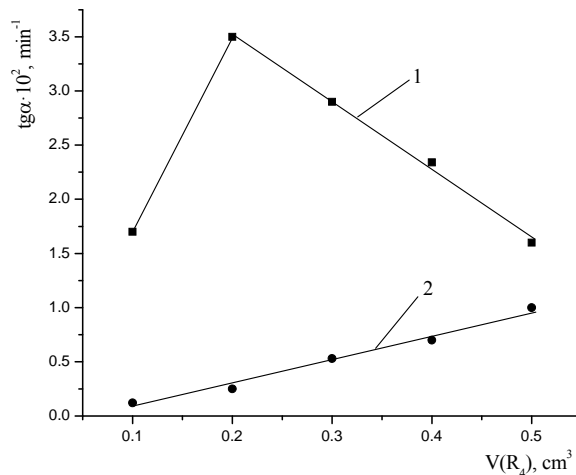
Rezultati ispitivanja brzine reakcija u odnosu na koncentraciju enzima ureaze prikazani su na slici 33. Brzina ispitivane reakcije je linearna funkcija koncentracije enzima u opsegu od 87,5

do $262,5 \text{ U}\cdot\text{dm}^{-3}$ i prvog je reda u odnosu na koncentraciju enzima. Brzina osnovne reakcije je praktično nezavisna od koncentracije ureaze i nultog je reda u odnosu na koncentraciju ureaze. Za dalji rad je odabrana koncentracija enzima od $175 \text{ U}\cdot\text{dm}^{-3}$, jer pri većim koncentracijama dolazi do skraćanja linearnog dela kinetičkih krivih zbog čega se tangens ugla nagiba tih pravih nepouzdanije određuje.



Slika 33. Zavisnost brzine ispitivane (1) i osnovne reakcije (2) od koncentracije ureaze. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $0,5 \text{ cm}^3 R_3 [c(\text{Na-salicilat}) = 7,75 \cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}, c(\text{Na-nitroprusid}) = 4,19 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}, c(\text{EDTA}) = 1,25 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}]$; $c(\text{urea}) = 1,25 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$; $0,2 \text{ cm}^3 R_4 [c(\text{NaOCl}) = 1,24 \cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}, c(\text{NaOH}) = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}]$; $\text{pH} = 7,5$; $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Efekat koncentracije (iskazane preko zapremine) reagensa R_4 na brzinu reakcija grafički je prikazan na slici 34. Ispitivana reakcija ima maksimalnu brzinu pri zapremini reagensa R_4 od $0,2 \text{ cm}^3$ i prvog je reda u odnosu na zapreminu ovog reagensa u intervalu od $0,1$ do $0,2 \text{ cm}^3$. Nakon toga brzina reakcije naglo opada. Brzina osnovne reakcije linearno raste u zavisnosti od zapremine ovog reagensa i prvog je reda u odnosu na koncentraciju ovog reagensa u celom ispitivanom intervalu. Najveća razlika u brzinama ovih reakcija je pri zapremini od $0,2 \text{ cm}^3 R_4$ i zato je ova vrednost izabrana kao optimalna.



Slika 34. Zavisnost brzine ispitivane (1) i osnovne reakcije (2) od zapremine reagensa R_4 . Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $0,5 \text{ cm}^3 R_3 [c(\text{Na-salicilat}) = 7,75 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c(\text{Na-nitroprusid}) = 4,19 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c(\text{EDTA}) = 1,25 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$; $c(\text{ureaza}) = 175 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{urea}) = 1,25 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$; $\text{pH} = 7,5$; $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Na osnovu prethodno prikazanih zavisnosti brzina ispitivane i osnovne reakcije od koncentracije svakog reaktanta pojedinačno, kao i određivanja reda reakcije u odnosu na koncentraciju svakog reaktanta, mogu se postaviti kinetičke jednačine za ispitivane sisteme:

osnovna reakcija

$$\frac{dc}{dt} = k_1 \cdot c_{R_3} \cdot c_{R_4} \quad (73)$$

za interval koncentracija:

$$\text{H}_3\text{O}^+ = 1 \cdot 10^{-8} - 1,58 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \quad (\text{pH} = 6,8-8)$$

$$R_3 = 0,2 - 0,9 \text{ cm}^3$$

$$\text{ureaze} = 87,5 - 262,5 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$$

$$R_4 = 0,1 - 0,5 \text{ cm}^3$$

ispitivana reakcija

$$\frac{dc}{dt} = k_2 \cdot c_{\text{H}_3\text{O}^+}^{0,06} \cdot c_{R_3} \cdot c_{\text{ureaza}} \cdot c_{R_4} \cdot c_{\text{urea}} \quad (74)$$

za interval koncentracija:

$$\text{H}_3\text{O}^+ = 1 - 3,16 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \quad (\text{pH} = 7,5 - 8)$$

$$R_3 = 0,2 - 0,9 \text{ cm}^3$$

$$\text{ureaze} = 87,5 - 262,5 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$$

$$R_4 = 0,1 - 0,2 \text{ cm}^3$$

gde je:

$\frac{dc}{dt}$ – promena koncentracije indikatorske supstance,

k_1 – uslovna konstanta brzine osnovne reakcije,

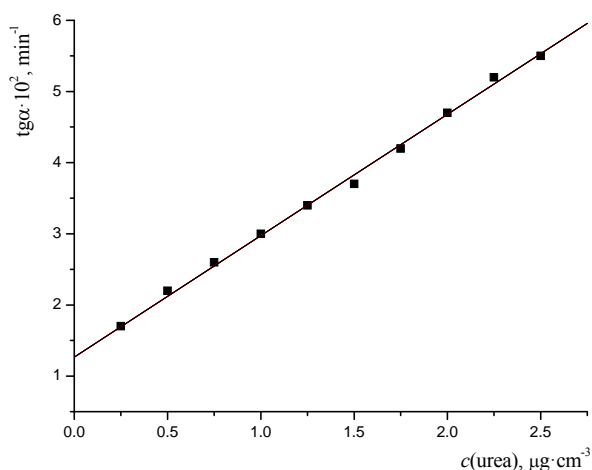
k_2 – uslovna konstanta brzine ispitivane reakcije.

3.1.2. Validacija kinetičko–spektrofotometrijske metode za određivanje uree

Validacija metode izvršena je određivanjem intervala linearnosti, limita detekcije, tačnosti, preciznosti i selektivnosti.

Linearnost

Uticao uree na brzinu ispitivane reakcije praćen je pri prethodno odabranim optimalnim uslovima odigravanja reakcije: $0,5 \text{ cm}^3 R_3 [c(\text{Na-salicilat}) = 7,75 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c(\text{Na-nitroprusid}) = 4,19 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c(\text{EDTA}) = 1,25 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$; $c(\text{ureaza}) = 175 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$; $0,2 \text{ cm}^3 R_4 [c(\text{NaOCl}) = 1,24 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c(\text{NaOH}) = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$; $\text{pH} = 7,5$; $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$. Dobijena kalibraciona prava (slika 35) je linearna u intervalu koncentracije uree od $0,25$ do $2,5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ i može se primeniti za određivanje uree u rastvoru u tom opsegu koncentracija.



Slika 35. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije uree. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $0,5 \text{ cm}^3 R_3 [c(\text{Na-salicilat}) = 7,75 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c(\text{Na-nitroprusid}) = 4,19 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c(\text{EDTA}) = 1,25 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$; $c(\text{ureaza}) = 175 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$; $0,2 \text{ cm}^3 R_4 [c(\text{NaOCl}) = 1,24 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c(\text{NaOH}) = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$; $\text{pH} = 7,5$ i $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Ova zavisnost se može predstaviti jednačinom:

$$\begin{aligned} \operatorname{tg}\alpha \cdot 10^2 &= (1,2682 \pm 0,0392) + (1,7055 \pm 0,0265) \cdot c(\text{urea}); \\ r &= 0,9989; S_0 = 0,0695; n = 10 \end{aligned} \quad (75)$$

gde je:

$\operatorname{tg}\alpha$ – nagib linearnog dela kinetičke krive u koordinatnom sistemu $A = f(t)$

$c(\text{urea})$ – koncentracija uree izražena u $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$,

S_0 – standardna devijacija fitovanja.

Limit detekcije

Limit detekcije (LOD) određen je korišćenjem jednačine (*Perez-Bendito i Silva, 1988, str. 252; Ermer, 2001*):

$$\text{LOD} = 3,3 \cdot S_0/b, \quad (76)$$

kao i primenom jednačine (*Rahman et al. 2005; Morelli, 1983*):

$$\text{LOD} = t/b [S_0^2 \cdot (n - 2)/(n - 1)]^{1/2} \quad (77)$$

gde je:

S_0 – standardna devijacija fitovanja kalibracione prave,

b – nagib kalibracione prave,

t – Studentov koeficijent za broj stepena slobode $v = n - 2$, pri 95 % stepenu poverenja i

n – broj tačaka kalibracione prave.

Dobijene vrednosti su 0,13 i 0,09 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$, respektivno.

Tačnost i reproduktivnost

Tačnost i reproduktivnost metode određene su za tri koncentracije sa kalibracione prave na osnovu rezultata iz pet merenja za svaku od izabranih koncentracija. Rezultati dobijeni statističkom obradom podataka prikazani su u tabeli 9.

Tabela 9. Tačnost i reproduktivnost određivanja uree.

Koncentracija uree ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)		RSD (%)	$\frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \cdot 100$ (%)
odmerena μ	nađena $\bar{x} \pm \text{SD}$		
0,25	0,24 \pm 0,02	8,33	-4,00
1,25	1,28 \pm 0,06	4,69	+2,40
2,50	2,48 \pm 0,05	2,02	-0,80

\bar{x} – srednja aritmetička vrednost za $n = 5$,

$$\text{SD} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$
, standardna devijacija pojedinačnog merenja,

$$\text{RSD} = \frac{\text{SD}}{\bar{x}} \cdot 100\%$$
, relativna standardna devijacija i

$$\frac{\bar{x} - \mu}{\mu}$$
 – tačnost metode.

Iz prikazanih rezultata se vidi da se relativna greška određivanja uree ovom metodom kreće od 8,33 do 2,02 % za interval koncentracije uree od 0,25 do 25 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$.

Selektivnost

Selektivnost ove metode određena je ispitivanjem uticaja većeg broja katjona i anjona, nekih antibiotika i organskih kiselina. Granica tolerancije posmatrana je pod optimalnim uslovima i konstantnom koncentracijom uree od $1,25 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ($0,75 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$), a koncentracija ispitivanih supstanci je varirana u odnosu na zadanu koncentraciju uree sve dok nije nađena ona koncentracija koja ometa njeno određivanje (tabela 10). Granica tolerancije je ona koncentracija strane supstance koja daje odstupanje u koncentraciji manje od dve standardne devijacije koncentracije za sistem bez strane supstance (2s kriterijum) (Kirkbright, 1966) pri određivanju navedene koncentracije uree. Granica tolerancije data je kao odnos molarnih koncentracija strane komponente i uree u ispitivanom rastvoru.

Tabela 10. Selektivnost određivanja uree.

Granica tolerancije c_x / c_{urea}	Jon/molekul (x)
10^2	Ni^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , CH_3COO^- , CO_3^{2-} , Cl^-
10	Se^{4+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Br^- , SO_4^{2-} , glukoza, askorbinska i limunska kiselina
Interferiraju kod odnosa 1:1	F^- , streptomycin, neomicin, doksiciklin

Rezultati ispitivanja selektivnosti metode pokazuju da joni Ni^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , CH_3COO^- , CO_3^{2-} , Cl^- ne ometaju određivanje uree čak i kada su prisutni u koncentracijama do 100 puta većim od koncentracije uree. Prisustvo jona Se^{4+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Br^- , SO_4^{2-} u koncentracijama većim 10 puta od koncentracije uree ne ometaju njeno određivanje. Isti efekat imaju glukoza, askorbinska i limunska kiselina. Značajan uticaj na brzinu reakcije pokazuju jon F^- kao i antibiotici streptomycin, neomicin i doksiciklin kada su prisutni u istoj koncentraciji kao i urea.

3.1.3. Primena kinetičko–spektrofotometrijske metode za određivanje uree

Aplikativnost predložene metode je ispitana određivanjem sadržaja uree u kremi (tabela 11). Uzorak je pripreman po proceduri opisanoj u Eksperimentalnom delu.

Tabela 11. Tačnost i reproduktivnost određivanja uree u kremi**.*

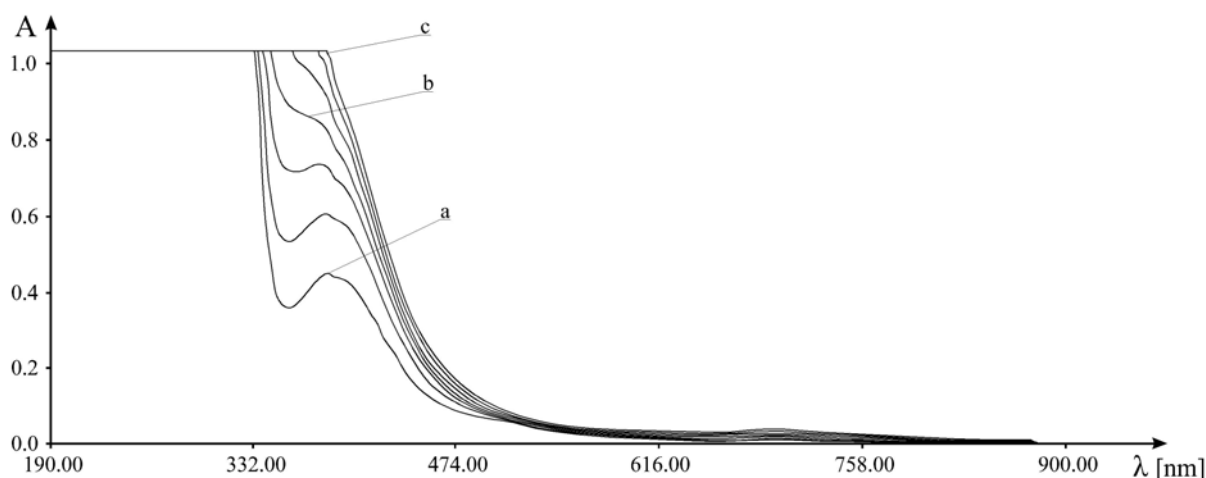
Koncentracija uree ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)		RSD (%)	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ (%)	Recovery (%)
odmerena μ	nađena $\bar{x} \pm \text{SD}$			
1,19	0,91 \pm 0,06	6,59	-23,53	76,47

(*) *Legenda veličina i odgovarajući izrazi dati su uz tabelu 9 u poglavlju 3.1.2.*

(**) *Atopic, krema, 5 % uree, Medical Cosmetics, Crystal derma d.o.o, Beograd.*

3.2. Kinetičko–spektrofotometrijsko određivanje streptomicina

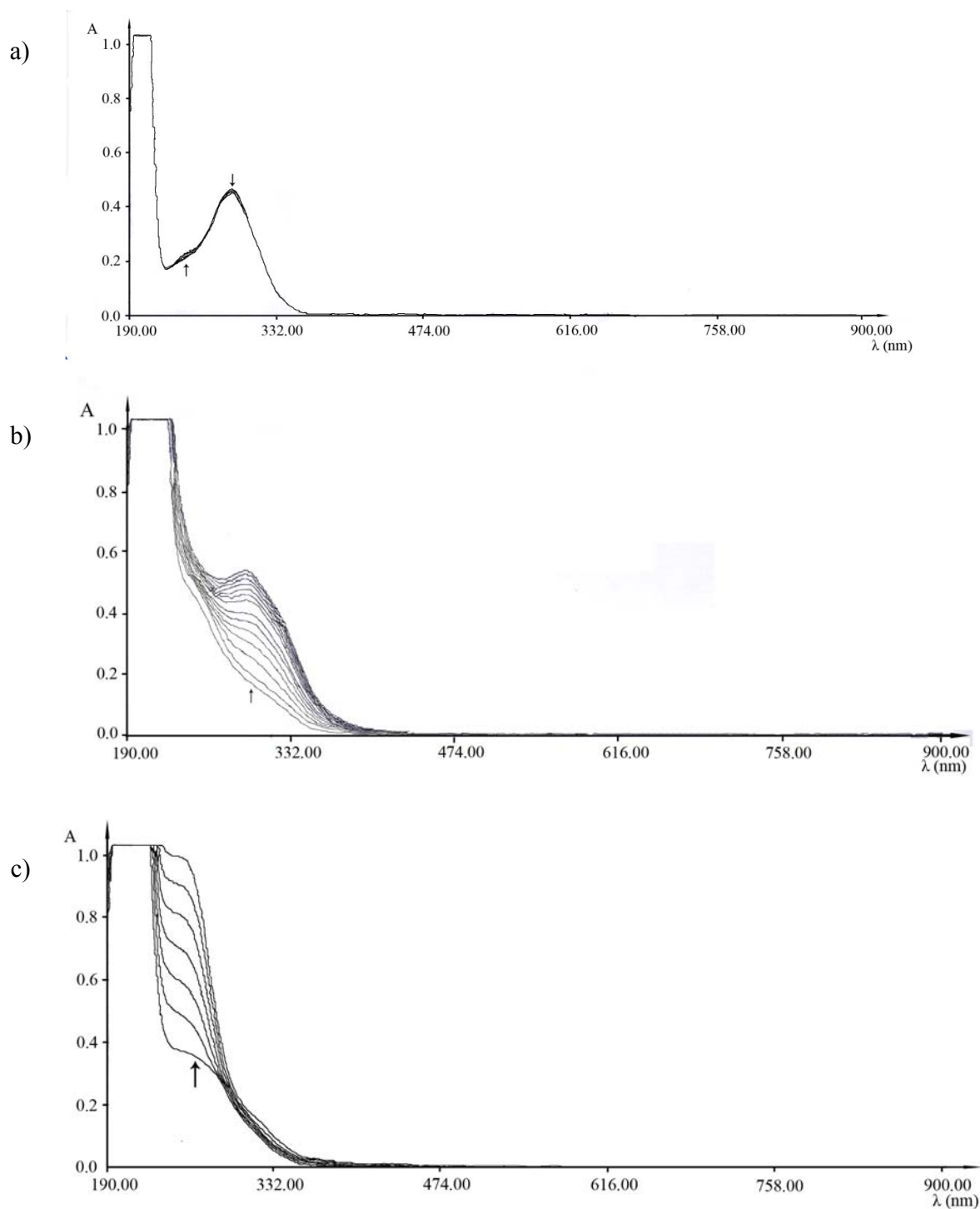
Na osnovu rezultata ispitivanja selektivnosti metode za određivanje uree zapažen je inhibitorski efekat streptomicina u obliku streptomicin-sulfata (SMS) na brzinu odigravanja reakcije. U cilju izučavanja efekta interferencije SMS na dvostruko katalizovani operativni mehanizam modifikovane Berthelot-ove reakcije (tabela 10 i jednačine 66–72) snimljen je apsorpcioni spektar sistema u prisustvu SMS (slika 36) u toku 7,2 min i upoređen je sa spektrom na slici 27.



Slika 36. Promena apsorpcionog spektra proizvoda modifikovane Berthelot-ove reakcije sa vremenom u prisustvu SMS po dodatku R_4 , nakon : a) 1 min, b) 4,6 min i c) 8,2 min. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $0,5 \text{ cm}^3 R_3[c(\text{Na-salicilat}) = 7,75 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{Na-nitroprusid}) = 4,19 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{EDTA}) = 1,25 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]; $c(\text{urea}) = 2,08 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{ureaza}) = 175 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$; $0,2 \text{ cm}^3 R_4[c(\text{NaOCl}) = 1,24 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{NaOH}) = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]; $c(\text{SMS}) = 182,00 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$; fosfatni pufer ($\text{pH} = 7,5$); $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Na snimljenom spektru na slici 36 vidi se da se u prisustvu SMS na talasnoj dužini od 700 nm maksimum apsorpcije mnogo sporije povećava u odnosu na isti maksimum na slici 27. Dakle, SMS pokazuje jak inhibitorski efekat na brzinu formiranja kompleksa koji apsorbuje na 700 nm, ali s druge strane, pokazuje katalitički uticaj na razgradnju kompleksa koji apsorbuju u intervalu talasnih dužina od 386 do 405 nm.

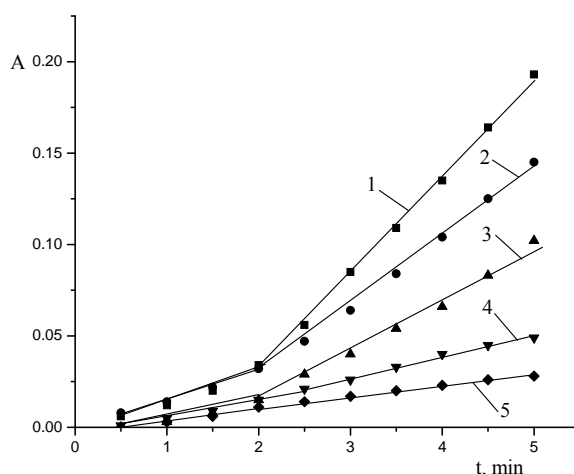
Radi razumevanja dvostruke uloge streptomicina, najpre su snimljeni apsorpcioni spektri: 1) Na-nitroprusida u fosfatnom puferu i 2) Na-salicilata i R_4 u istom puferu. Oba spektra nisu pokazala Vis-apsorpcione maksimume. Potom je posmatrana interakcija između NH_4^+ (umesto uree i ureaze) i reagensa R_4 . Promene u UV oblasti ovog sistema (slika 37a) odnose se na simultano opadanje apsorpcionog maksimuma na 290 nm i pojavu apsorpcije na 243 nm, koja



Slika 37. Promena apsorpcionih spektara reakcionih proizvoda sa vremenom: a) NH_3 i R_4 ; b) NH_3 , SMS i R_4 ; c) SMS i R_4 . Početne koncentracije reaktanata: $c(\text{NH}_4\text{OH}) = 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $0,2 \text{ cm}^3 \text{ R}_4 [c(\text{NaOCl}) = 1,24 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c(\text{NaOH}) = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$ i $c(\text{SMS}) = 182,00 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$; fosfatni pufer (pH = 7,5); $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$.

potiče od proizvoda reakcije, hloramina. Dodavanje SMS u ovu smešu dovodi do trenutnog gubljenja pika na 290 nm, koji se tokom praćenja brzine ove reakcije ponovo pojavljuje (slika 37b). Ovo se može objasniti pojavom konkurentne reakcije između SMS i hipohloritnih jona i formiranja organskog hloramina (slika 37c). Zbog toga se umanjuje produkcija neorganskog hloramina (H_2NCl , jednačina 67), primarnog intermedijernog proizvoda, neophodnog za dobijanje kompleksa $\text{AqF-H}_2\text{NCl}$ (jednačina 70), što ima za posledicu smanjene prinosa krajnjeg proizvoda reakcije i opadanje apsorbance na 700 nm.

Inhibitorni efekat SMS na produkciju proizvoda modifikovane Berthelot-ove reakcije, koji apsorbuje na 700 nm, iskorišćen je za razradu kinetičko-spektrofotometrijske metode za određivanje SMS praćenjem brzine odigravanja reakcije na talasnoj dužini od 700 nm. Promena apsorbance sa vremenom praćena je tokom 5 min, 60 s nakon dodatka reagensa R_4 (slika 38). Dobijene zavisnosti $A = f(t)$ su linearne u celom ispitivanom intervalu, ali su razlike u brzinama reakcija za različite koncentracije SMS veoma male u početku odigravanja reakcije, do kraja druge minute. Najpogodniji vremenski interval za kinetičko ispitivanje i određivanje brzine reakcije je od 2 do 5 min, jer su promene apsorbance sa vremenom veće, što obezbeđuje veću tačnost i preciznost kinetičke metode.

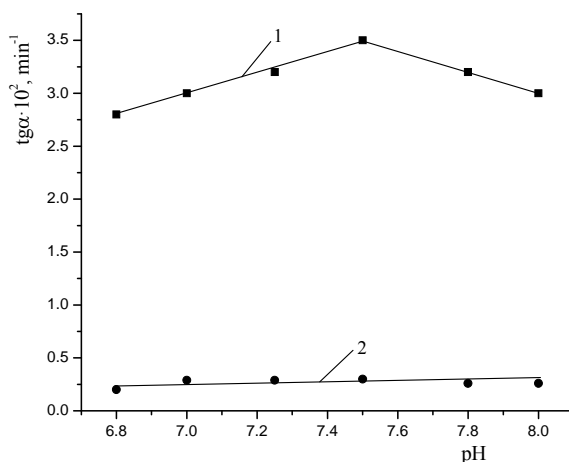


Slika 38. Promene apsorbance rastvora sa vremenom za različite koncentracije SMS: 1) $0 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, 2) $36,43 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, 3) $91,00 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, 4) $145,72 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ i 5) $182,00 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Početne koncentracije u rastvoru: $1,0 \text{ cm}^3 R_3[c(\text{Na-salicilat}) = 1,55\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $c(\text{Na-nitroprusid}) = 8,38\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $c(\text{EDTA}) = 2,50\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$]; $c(\text{urea}) = 2,08\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $c(\text{ureaza}) = 175 \text{ U}\cdot\text{dm}^{-3}$; $0,2 \text{ cm}^3 R_4[c(\text{NaOCl}) = 1,24\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $c(\text{NaOH}) = 2,5\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$]; $\text{pH} = 7,5$; $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Da bi odredili što niže koncentracije SMS ispitan je uticaj koncentracije svih reagujućih komponenata na brzinu osnovne (bez SMS) i ispitivane (u prisustvu SMS) reakcije.

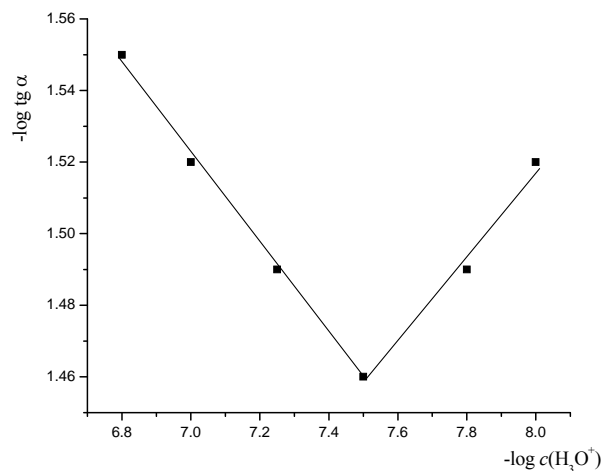
3.2.1. Određivanje optimalnih uslova odigravanja reakcije

Efekat pH vrednosti fosfatnog pufera na brzine obe reakcije ispitan je u intervalu od 6,8 do 8,0 (slika 39), odnosno u intervalu koncentracije H_3O^+ jona od $1,0 \cdot 10^{-8}$ do $1,58 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Kako je najveća razlika u brzinama osnovne i ispitivane reakcije pri $\text{pH} = 7,5$, ova vrednost je odabrana za dalja merenja. Brzina ispitivane reakcije je približno konstantna u ispitivanom intervalu i nultog je reda u odnosu na koncentraciju H_3O^+ jona. Zavisnost brzine osnovne reakcije od pH nije linearna.



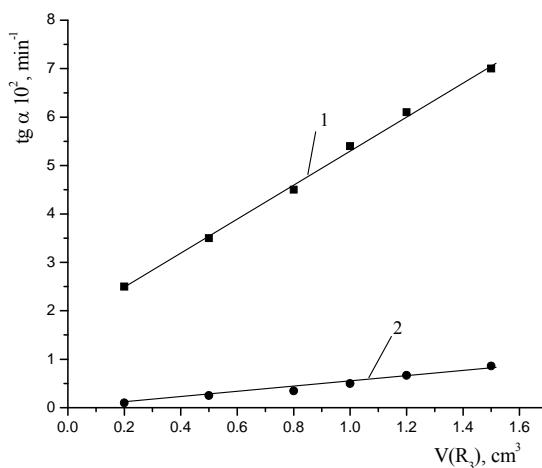
Slika 39. Zavisnost brzine osnovne (1) i ispitivane (2) reakcije od pH vrednosti fosfatnog pufera. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $0,5 \text{ cm}^3 \text{ R}_3[\text{c}(\text{Na-salicilat}) = 7,75 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $\text{c}(\text{Na-nitroprusid}) = 4,19 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $\text{c}(\text{EDTA}) = 1,25 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]; $\text{c}(\text{urea}) = 2,08 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $\text{c}(\text{ureaza}) = 175 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$; $0,2 \text{ cm}^3 \text{ R}_4[\text{c}(\text{NaOCl}) = 1,24 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $\text{c}(\text{NaOH}) = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]; $\text{c}(\text{SMS}) = 182,00 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$; $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$.

Za određivanje reda ove reakcije prikazana je zavisnost negativnog logaritma brzine reakcije od negativnog logaritma koncentracije H_3O^+ jona (slika 40). Vrednosti redova reakcije su $-0,13$ i $+0,12$ za interval pH od 6,8 do 7,5 i od 7,5 do 8,0, respektivno.



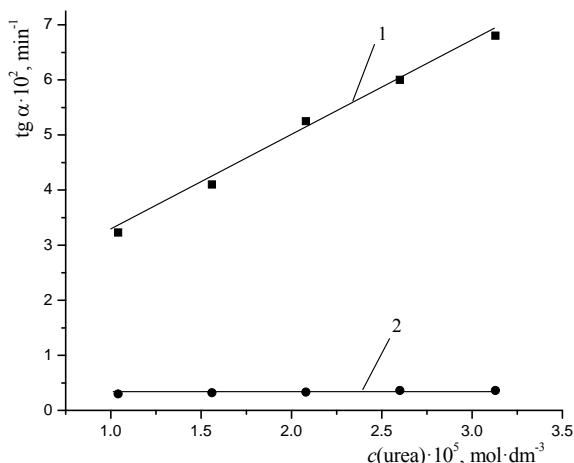
Slika 40. Zavisnost $-\log \text{tg } \alpha$ osnovne reakcije od $-\log c(\text{H}_3\text{O}^+)$. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $0,5 \text{ cm}^3 \text{ R}_3$ [$c(\text{Na-salicilat}) = 7,75 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{Na-nitroprusid}) = 4,19 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{EDTA}) = 1,25 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]; $c(\text{urea}) = 2,08 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{ureaza}) = 175 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$; $0,2 \text{ cm}^3 \text{ R}_4$ [$c(\text{NaOCl}) = 1,24 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{NaOH}) = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]; $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Brzine reakcija, osnovne i ispitivane, su linearno zavisne od koncentracije (iskazane preko zapremine) reagensa R_3 (slika 41) i obe su prvog reda u odnosu na koncentraciju ovog reagensa u intervalu od $0,2$ do $1,5 \text{ cm}^3$. Na osnovu dobijenih zavisnosti, zapremina od 1 cm^3 je odabrana kao optimalna, jer pri većim vrednostima dolazi do skraćivanja intervala linearnosti kinetičkih krivih zbog čega se tangens ugla nagiba tih pravih određuje sa manjom tačnošću.



Slika 41. Zavisnost brzine osnovne (1) i ispitivane (2) reakcije od zapremine reagensa R_3 . Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $c(\text{urea}) = 2,08 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{ureaza}) = 175 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$; $0,2 \text{ cm}^3 \text{ R}_4$ [$c(\text{NaOCl}) = 1,24 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{NaOH}) = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]; $c(\text{SMS}) = 182,00 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$; $\text{pH} = 7,5$; $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

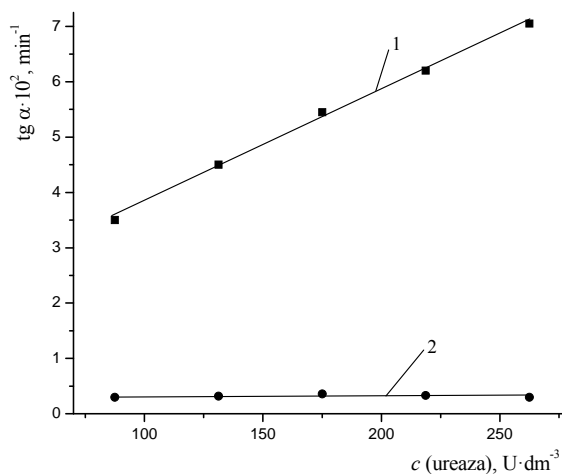
Uticaj koncentracije uree na brzine reakcija ispitivan je u intervalu $(1,04 - 3,13) \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, a eksperimentalni rezultati su prikazani na slici 42.



Slika 42. Zavisnost brzine osnovne (1) i ispitivane (2) reakcije od koncentracije uree. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $1,0 \text{ cm}^3 R_3[c(\text{Na-salicilat}) = 1,55 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{Na-nitroprusid}) = 8,38 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{EDTA}) = 2,50 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]; $c(\text{ureaza}) = 175 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$; $0,2 \text{ cm}^3 R_4[c(\text{NaOCl}) = 1,24 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{NaOH}) = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]; $c(\text{SMS}) = 182,00 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$; $\text{pH} = 7,5$; $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$.

Brzina ispitivane reakcije se zanemarljivo menja sa porastom koncentracije uree i stoga je ova reakcija nultog reda u odnosu na koncentraciju uree. Zavisnost brzine osnovne reakcije od koncentracije uree je linearna u celom ispitivanom intervalu i ova reakcija je +1 reda u odnosu na koncentraciju uree. Kao optimalna koncentracija uree odabrana je $2,08 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, jer pri većim vrednostima dolazi do skraćenja linearnog dela kinetičkih krivih zbog čega se tangens ugla nagiba tih pravih određuje sa manjom pouzdanošću.

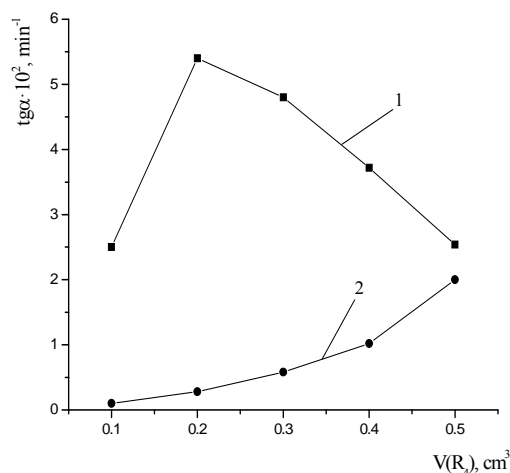
Rezultati ispitivanja brzine osnovne i ispitivane reakcije u zavisnosti od koncentracije enzima prikazani su na slici 43.



Slika 43. Zavisnost brzine osnovne (1) i ispitivane (2) reakcije od koncentracije ureaze. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $1,0 \text{ cm}^3 \text{ R}_3 [c(\text{Na-salicilat}) = 1,55 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c(\text{Na-nitroprusid}) = 8,38 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c(\text{EDTA}) = 2,50 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$; $c(\text{urea}) = 2,08 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $0,2 \text{ cm}^3 \text{ R}_4 [c(\text{NaOCl}) = 1,24 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c(\text{NaOH}) = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$; $c(\text{SMS}) = 182,00 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$; $\text{pH} = 7,5$; $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Brzina ispitivane reakcije se neznatno menja sa povećanjem koncentracije ureaze, tako da je ova reakcija nultog reda. Brzina osnovne reakcije je linearna funkcija koncentracije ureaze u opsegu koncentracija od $87,5$ do $262,5 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$ i prvog je reda. Koncentracija od $175 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$ je korišćena za dalji rad, jer pri većim vrednostima dolazi do skraćenja linearnog dela kinetičkih krivih zbog čega se tangens ugla nagiba tih pravih određuje sa manjom pouzdanošću.

Ispitan je i uticaj koncentracije, iskazane preko zapremine, reagensa R_4 na brzinu osnovne i ispitivane reakcije (slika 44).



Slika 44. Zavisnost brzine osnovne (1) i ispitivane (2) reakcije od zapremine reagensa R_4 . Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $1,0 \text{ cm}^3 R_3 [c(\text{Na-salicilat}) = 1,55 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c(\text{Na-nitroprusid}) = 8,38 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c(\text{EDTA}) = 2,50 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$; $c(\text{urea}) = 2,08 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{ureaza}) = 175 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{SMS}) = 182,00 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$; $\text{pH} = 7,5$; $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Brzina osnovne reakcije pokazuje maksimum za $0,2 \text{ cm}^3 R_4$ reagensa i prvog je reda u odnosu na koncentraciju ovog reagensa u opsegu od $0,1$ do $0,2 \text{ cm}^3$. Nakon toga brzina reakcije se naglo smanjuje. Ispitivana reakcija pokazuje kontinualni porast brzine sa povećanjem koncentracije tj. zapremine R_4 reagensa i prvog je reda u odnosu na koncentraciju ovog reagensa u opsegu od $0,1$ do $0,4 \text{ cm}^3$. Zapremina od $0,2 \text{ cm}^3$ ovog reagensa je odabrana kao optimalna, jer je na toj vrednosti zapremine razlika u brzinama reakcija najveća.

Na osnovu prethodno datih zavisnosti brzina osnovne i ispitivane reakcije od koncentracije svakog reaktanta pojedinačno, kao i određivanja reda reakcije u odnosu na koncentraciju svakog reaktanta pojedinačno, mogu se postaviti kinetičke jednačine za ispitivane procese:

osnovna reakcija

$$\frac{dc}{dt} = k_1 \cdot c_{\text{H}_3\text{O}^+}^{0,12} \cdot c_{\text{urea}} \cdot c_{\text{ureaza}} \cdot c_{R_3} \cdot c_{R_4} \quad (78)$$

za interval koncentracija:

$$\text{H}_3\text{O}^+ = (1 - 3,16) \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}; \text{pH} = 7,5 - 8,0$$

$$R_3 = 0,2 - 1,5 \text{ cm}^3$$

$$\text{uree} = (1,04 - 3,13) \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$$

$$\text{ureaze} = 87,5 - 262,5 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$$

$$R_4 = 0,1 - 0,2 \text{ cm}^3$$

ispitivana reakcija

$$\frac{dc}{dt} = k_2 \cdot c_{R_3} \cdot c_{R_4} \cdot c_{SMS}^{-1} \quad (79)$$

za interval koncentracija:

$$H_3O^+ = 1 \cdot 10^{-8} - 1,58 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}; \text{ pH} = 6,8 - 8,0$$

$$R_3 = 0,2 - 1,5 \text{ cm}^3$$

$$\text{uree} = (1,04 - 3,13) \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$$

$$\text{ureaze} = 87,5 - 262,5 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$$

$$R_4 = 0,1 - 0,4 \text{ cm}^3$$

gde je:

$\frac{dc}{dt}$ – promena koncentracije indikatorske supstance,

k_1 – uslovna konstanta brzine osnovne reakcije,

k_2 – uslovna konstanta brzine ispitivane reakcije.

3.2.2. Validacija kinetičko–spektrofotometrijske metode za određivanje streptomicina

Validacija metode izvršena je određivanjem intervala linearnosti, limita detekcije, tačnosti, preciznosti i selektivnosti.

Linearnost

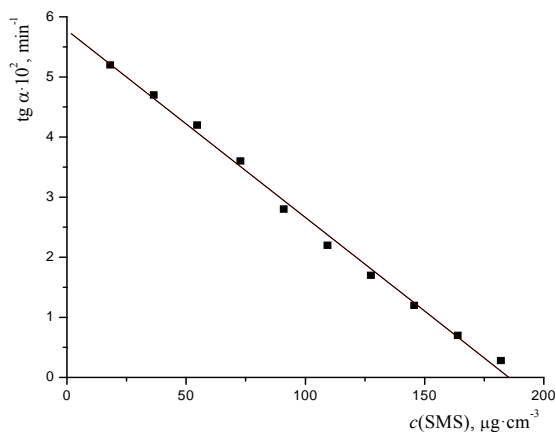
Uticao SMS na brzinu reakcije praćen je pri prethodno odabranim optimalnim uslovima odigravanja reakcije: $1,0 \text{ cm}^3 R_3 [c(\text{Na-salicilat}) = 1,55 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c(\text{Na-nitroprusid}) = 8,38 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c(\text{EDTA}) = 2,50 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$; $c(\text{urea}) = 2,08 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{ureaza}) = 175 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$; $0,2 \text{ cm}^3 R_4 [c(\text{NaOCl}) = 1,24 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c(\text{NaOH}) = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$; $\text{pH} = 7,5$; $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$. Dobijena kalibraciona prava (slika 45) je linearna u intervalu koncentracije SMS od 18,20 do 182,00 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ i može se koristiti za određivanje SMS u rastvoru primenom sledeće jednačine:

$$\text{tg} \alpha \cdot 10^2 = (5,7780 \pm 0,0836) - (0,0311 \pm 7,4023 \cdot 10^{-4}) \cdot c(\text{SMS}); \quad (80)$$
$$r = -0,9978; S_0 = 0,1224; n = 10$$

gde je:

$\text{tg} \alpha$ – nagib linearnog dela kinetičke krive u koordinatnom sistemu $A = f(t)$,

$c(\text{SMS})$ – koncentracija streptomycin-sulfata izražena u $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$,
 S_0 – standardna devijacija fitovanja.



Slika 45. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije SMS. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $1,0 \text{ cm}^3 R_3[c(\text{Na-salicilat}) = 1,55 \cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $c(\text{Na-nitroprusid}) = 8,38 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $c(\text{EDTA}) = 2,50 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$]; $c(\text{urea}) = 2,08 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $c(\text{ureaza}) = 175 \text{ U}\cdot\text{dm}^{-3}$; $0,2 \text{ cm}^3 R_4[c(\text{NaOCl}) = 1,24 \cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $c(\text{NaOH}) = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$]; $\text{pH} = 7,5$; $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Limit detekcije

Limit detekcije (LOD) određen je korišćenjem jednačina (76) i (77). Dobijene vrednosti su 12,99 i $8,54 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, respektivno.

Tačnost i reproduktivnost

Tačnost i reproduktivnost metode određene su za tri koncentracije sa kalibracione prave na osnovu rezultata iz pet merenja za svaku od izabranih koncentracija. Rezultati dobijeni statističkom obradom podataka prikazani su u tabeli 12.

Tabela 12. Tačnost i reproduktivnost određivanja* SMS.

Koncentracija SMS ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)		RSD (%)	$\frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \cdot 100$ (%)
odmerena μ	nađena $\bar{x} \pm \text{SD}$		
18,20	$19,81 \pm 1,75$	8,83	+8,85
91,00	$99,42 \pm 5,27$	5,30	+9,25
182,00	$175,4 \pm 0,97$	0,55	-3,63

(*) Legenda veličina i odgovarajući izrazi dati su uz tabelu 9 u poglavlju 3.1.2.

Iz prikazanih rezultata se vidi da se relativna greška određivanja SMS ovom metodom kreće od 8,83 do 0,55 % za interval koncentracije SMS od 18,2 do 182 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$.

Selektivnost

Selektivnost ove metode je određena ispitivanjem uticaja većeg broja katjona i anjona, proteina i sastojaka praškastih lekova. Granica tolerancije posmatrana je pod optimalnim uslovima i konstantnom koncentracijom SMS od $6,25\cdot 10^{-5}$ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ($91 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$), a koncentracija ispitivanih supstanci je varirana u odnosu na zadatu koncentraciju SMS sve dok nije nađena ona koncentracija koja ometa njegovo određivanje (tabela 13). Granica tolerancije je ona koncentracija strane supstance koja daje odstupanje u koncentraciji manje od dve standardne devijacije koncentracije za sistem bez strane supstance (2s kriterijum) (*Kirkbright, 1966*) pri određivanju navedene koncentracije SMS. Granica tolerancije data je kao odnos molarnih koncentracija strane komponente i SMS u ispitivanom rastvoru.

Tabela 13. Selektivnost određivanja SMS.

Granica tolerancije c_x / c_{SMS}	Jon/molekul (x)
10 ²	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Cl ⁻ , laktoza, fruktoza, glukoza, skrob
10	NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻
1	Co ²⁺ , Cd ²⁺ , Zn ²⁺ , Pb ²⁺ , CO ₃ ²⁻ , HCO ₃ ⁻
Interferiraju kod odnosa 1:1	F ⁻ , Br ⁻ , C ₂ O ₄ ²⁻ , SCN ⁻ , proteini

Rezultati ispitivanja selektivnosti metode pokazuju da laktoza, fruktoza, glukoza i skrob, koji su najčešći ekscipijenti praškastih lekova, kao i zemnoalkalni metali Ca²⁺ i Mg²⁺ ne ometaju određivanje SMS čak i kada su prisutni u koncentracijama do 100 puta većim od koncentracije SMS. Sličan efekat pokazuje i Cl⁻ jon. Prisustvo nitratnih i sulfatnih jona u koncentracijama 10 puta većim od koncentracije SMS ne ometaju njegovo određivanje. Određivanje SMS se takođe može neometano vršiti u prisustvu jona Co²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺, CO₃²⁻, HCO₃⁻. Značajan uticaj na brzinu reakcije pokazuju anjoni F⁻, Br⁻, C₂O₄²⁻, SCN⁻, kao i proteini kada su prisutni u koncentraciji jednakoj koncentraciji SMS u rastvoru.

3.2.3. Primena kinetičko–spektrofotometrijske metode za određivanje streptomicina

Aplikativnost predložene metode ispitana je određivanjem sadržaja streptomicina u komercijalnom farmaceutskom preparatu streptomicin-sulfata (prašak za injekcije) (tabela 14) i humanom urinu (tabela 15). Uzorci su pripremani po procedurama opisanim u Eksperimentalnom

delu. Dobijeni rezultati su validirani upoređivanjem sa HPLC (Kurosawa et al. 1985) rezultatima primenom testa nulte hipoteze za obe vrste uzoraka. Hromatogrami određivanja SMS u prašku za injekcije i humanom urinu dati su na slici 46. Dobijeni hromatogrami standarda i uzoraka pokazali su poklapanje retencionih vremena za analiziranu aktivnu komponentu, SMS. U cilju kvantitativne analize, određena je integrisana površina za dati pik i sa kalibracionog dijagrama za dobijene vrednosti površina pikova izračunate su koncentracije streptomicina, odnosno SMS u ispitivanim uzorcima. Vrednosti F-testa i Studentovog t-testa pokazale su da nema značajnije razlike u rezultatima dobijenim kinetičko-spektrofotometrijskom i HPLC metodom za obe vrste uzoraka ($F_{\text{eksp.}} < F_{\text{tab.}}$ i $t_{\text{eksp.}} < t_{\text{tab.}}$). Rezultat dobijen za sadržaj streptomicina u prašku za injekcije je takođe u saglasnosti sa vrednošću datom od strane proizvođača.

Tabela 14. Tačnost i reproduktivnost određivanja streptomicina u prašku za injekcije.*

Vrednosti mase streptomicina (mg)			RSD (%)	$\frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \cdot 100$ (%)	Recovery (kinetička metoda) (%)	F-test	t-test
deklarisana μ	određena kinetičkom metodom ($\bar{x} \pm \text{SD}$)	određena HPLC metodom ($\bar{x} \pm \text{SD}$)					
1000,00	1091,00 ± 46,23	1052,00 ± 18,91	4,24	+9,1	109,10	5,97	1,75

\bar{x} – srednja vrednost i SD – standardna devijacija za n = 5 merenja i za stepen poverenja od 95 %;

Recovery (%) = nađeno/odmereno · 100;

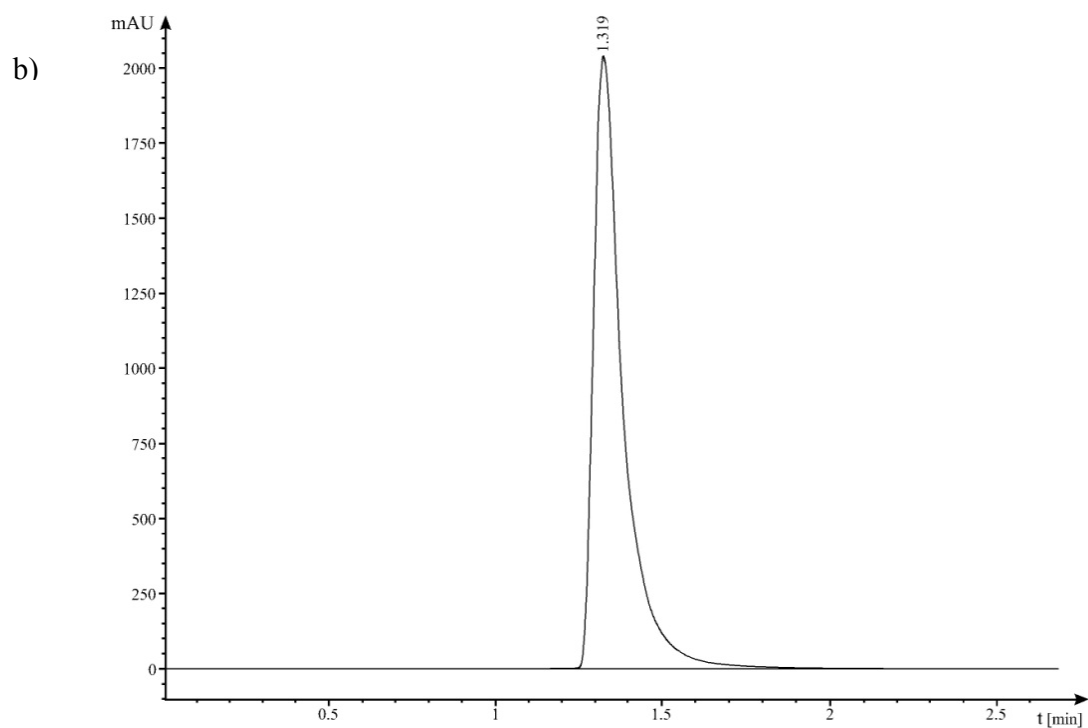
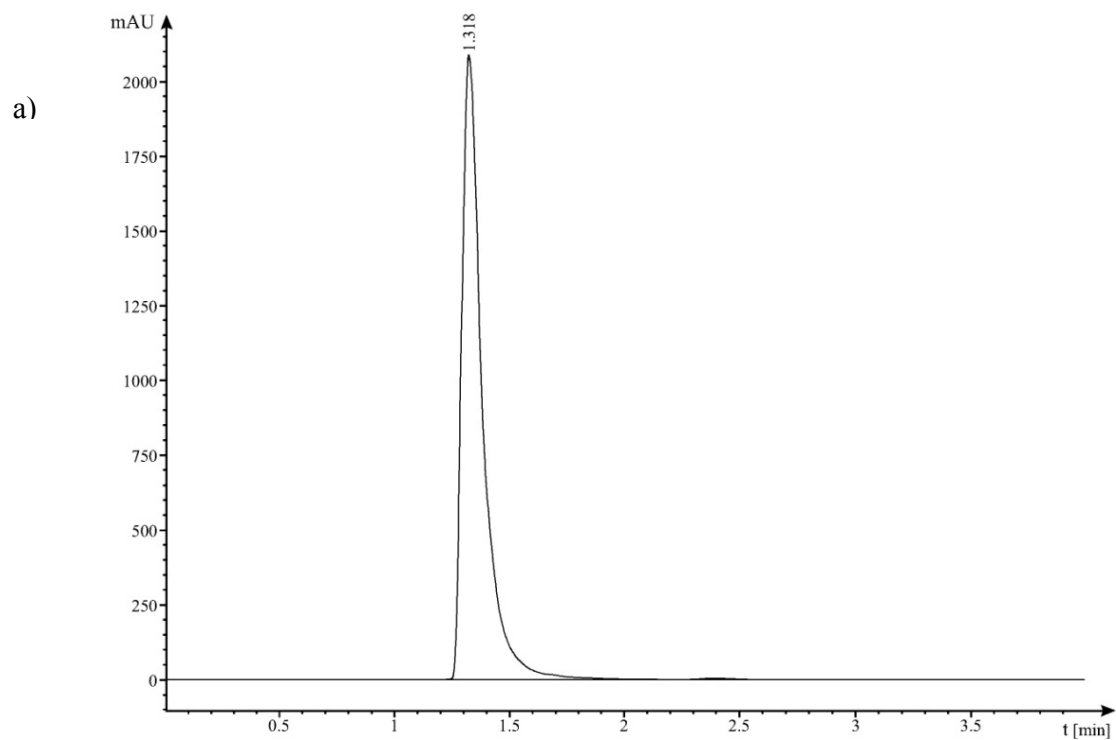
Teorijske vrednosti za F-test ($v_1 = 4$, $v_2 = 4$) i t-test ($v = 8$) za stepen poverenja od 95 % su 6,39 i 2,306, respektivno.

(*) *Streptomicin*, prašak za injekcije, 1 g streptomicina u obliku streptomicin-sulfata, Galenika®, a.d. Beograd.

Tabela 15. Tačnost i reproduktivnost određivanja SMS u humanom urinu metodom standardnih dodataka.*

Vrednosti koncentracije SMS ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)			RSD (%)	$\frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \cdot 100$ (%)	Recovery (kinetička metoda) (%)	F-test	t-test
dodata μ	određena kinetičkom metodom ($\bar{x} \pm \text{SD}$)	određena HPLC metodom ($\bar{x} \pm \text{SD}$)					
72,85	65,00 ± 5,00	70,60 ± 2,56	7,69	-10,78	89,22	3,81	2,23
91,00	83,59 ± 5,99	85,68 ± 2,58	7,17	-8,14	91,86	5,39	0,72
127,48	119,07 ± 4,22	123,47 ± 2,33	3,54	-6,60	93,40	3,28	2,04

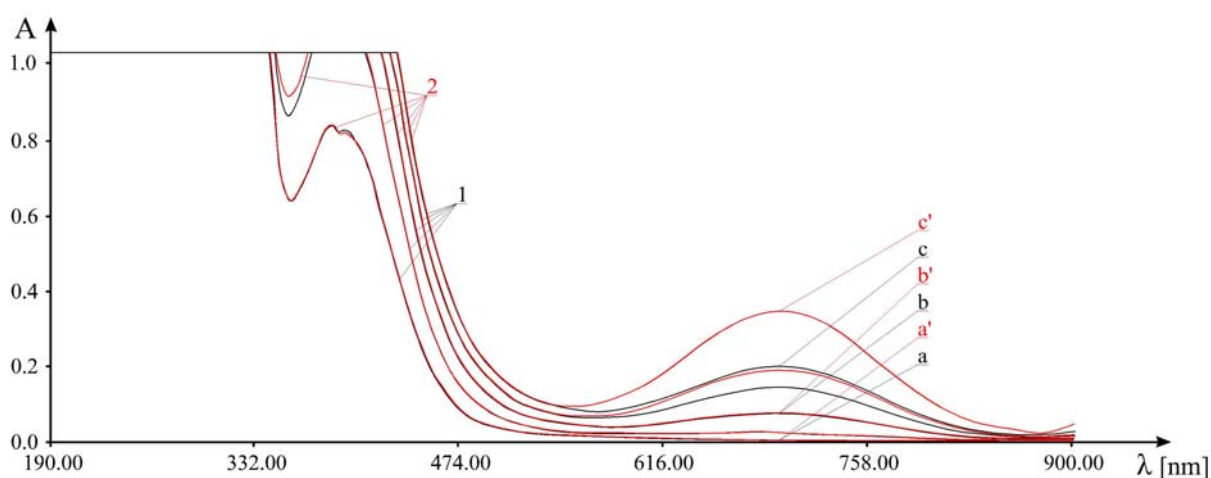
(*) *Legenda veličina i odgovarajući izrazi dati su uz tabelu 14.*



Slika 46. HPLC hromatogrami: a) prašak za injekcije SMS ($91 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) i b) spajkovan humani urin ($91 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$). Kolona: Spherisorb S5ODS ($5 \mu\text{m}$), dimenzija $250 \times 4,6 \text{ mm}$; $\lambda = 195 \text{ nm}$. Mobilna faza: ($0,025 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ NaH}_2\text{PO}_4 + 0,01 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ Na}$ -heksansulfonat, $\text{pH} = 2,6$) : acetonitril = 90:100.

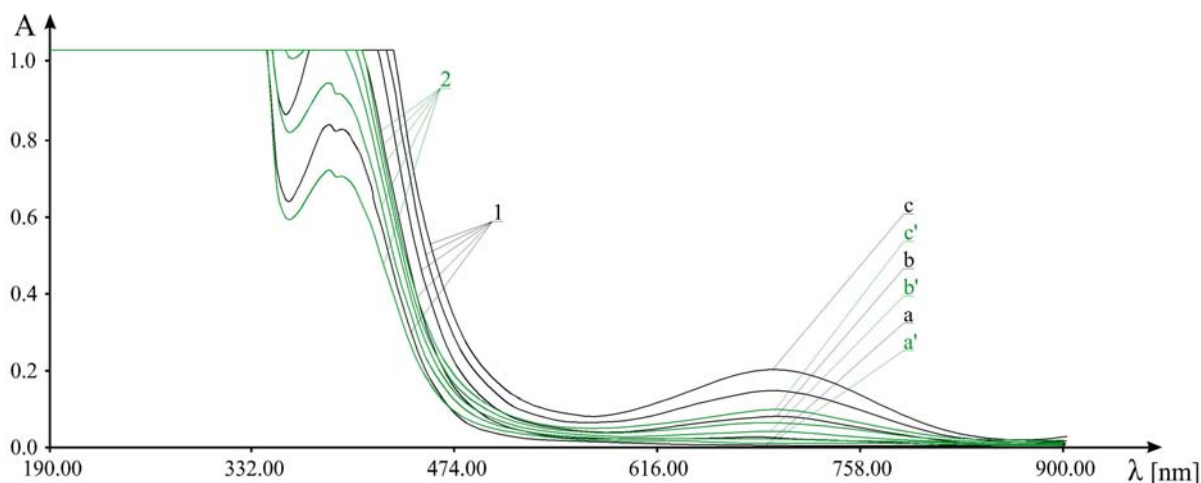
3.3. Kinetičko–spektrofotometrijsko određivanje neomicina

U cilju izučavanja efekta interferencije neomicina u obliku neomicin sulfata (NMS) na složeni mehanizam modifikovane Berthelot-ove reakcije (tabela 10 i jednačine 66-72) snimljeni su apsorpcioni spektri sistema sa i bez NMS, 60 s nakon dodavanja R_4 u trajanju od 7,2 min. Uočena su dva efekta NMS na osnovni sistem. Na slici 47 prikazane su promene apsorpcionih spektara sistema bez (krive 1) i u prisustvu malih koncentracija neomicina (krive 2) sa vremenom.



Slika 47. Promene apsorpcionih spektara reakcionih proizvoda sa vremenom po dodatku R_4 , nakon: a, a') 1 min; b, b') 4,6 min i c, c') 8,2 min. Krive: 1 – osnovna reakcija i 2 – ispitivana reakcija. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $1,0 \text{ cm}^3 R_3$ [$c(\text{Na-salicilat}) = 1,55 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{Na-nitroprusid}) = 8,38 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{EDTA}) = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]; $c(\text{urea}) = 4,16 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{ureaza}) = 175 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$; $0,2 \text{ cm}^3 R_4$ [$c(\text{NaOCl}) = 1,24 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{NaOH}) = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]; $c(\text{neomicin}) = 30,75 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$; fosfatni puffer ($\text{pH} = 7.5$); $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$.

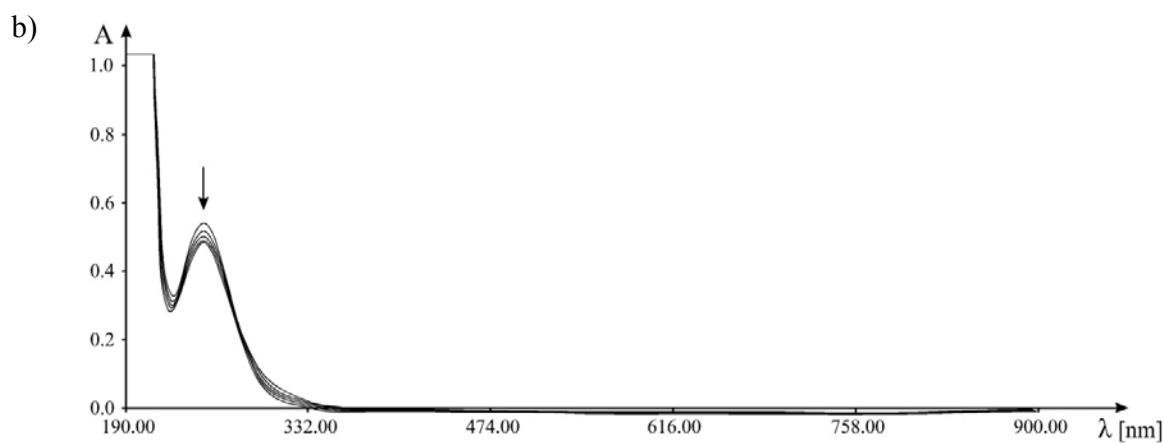
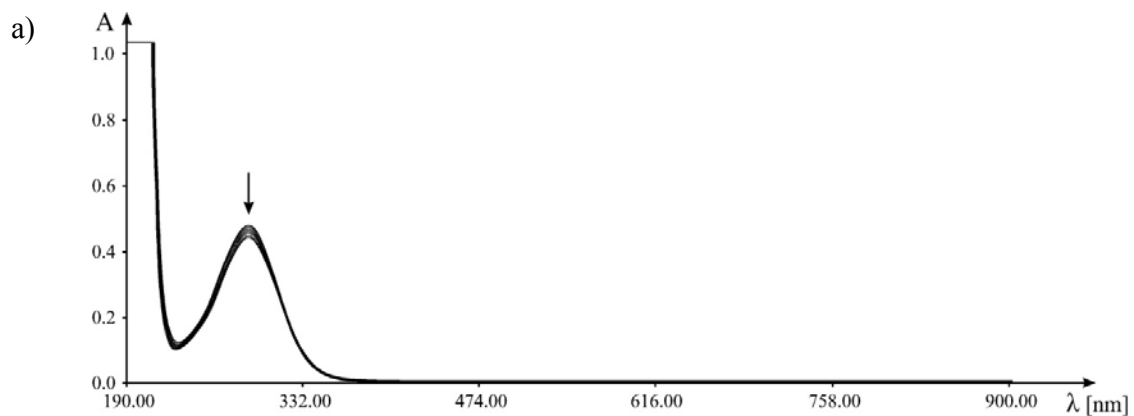
Sa prikazanih spektara se uočava da je stvaranje proizvoda reakcije koji apsorbuje na 700 nm mnogo brže u prisustvu neomicina ($30,75 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$), što ukazuje na aktivatorni efekat neomicina pri ovoj koncentraciji, jer je u posmatranom vremenskom intervalu brzina ove reakcije veća u odnosu na brzinu osnovne reakcije. Kada je koncentracija neomicina povećana na $123 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ zapažen je inhibitorni efekat ovog antibiotika pri navedenoj koncentraciji, što se može videti na osnovu promena apsorpcionih spektara sa vremenom, prikazanih na slici 48. Stoga, sistem sa neomicinom u posmatranom vremenskom intervalu karakteriše smanjenje brzine reakcije u odnosu na osnovni sistem. Neomicin, pri ovoj koncentraciji, pokazuje inhibitorni uticaj na formiranje kompleksa koji apsorbuju u intervalu talasnih dužina od 386 do 405 nm. Manje vrednosti maksimuma svih apsorbanca su posledica ometanja reakcije između Na-nitroprusida i reagensa R_4 (slika 28).



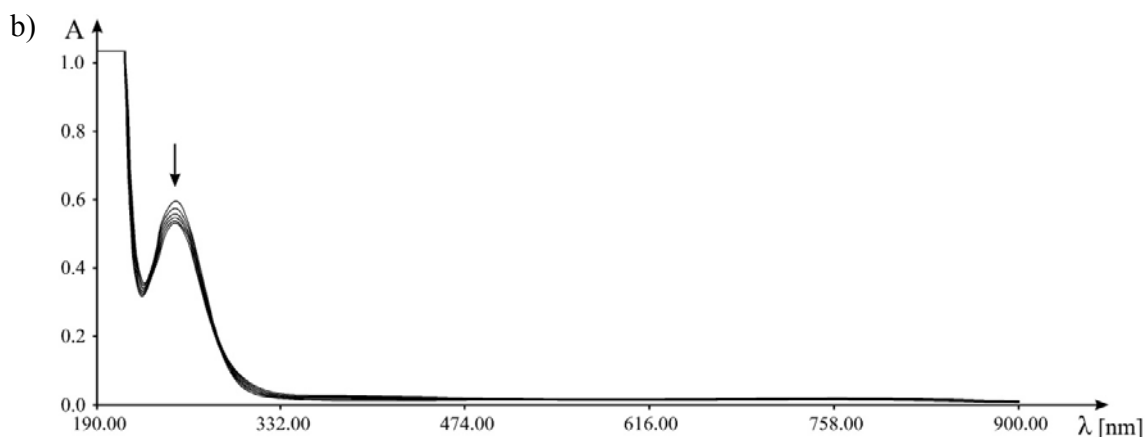
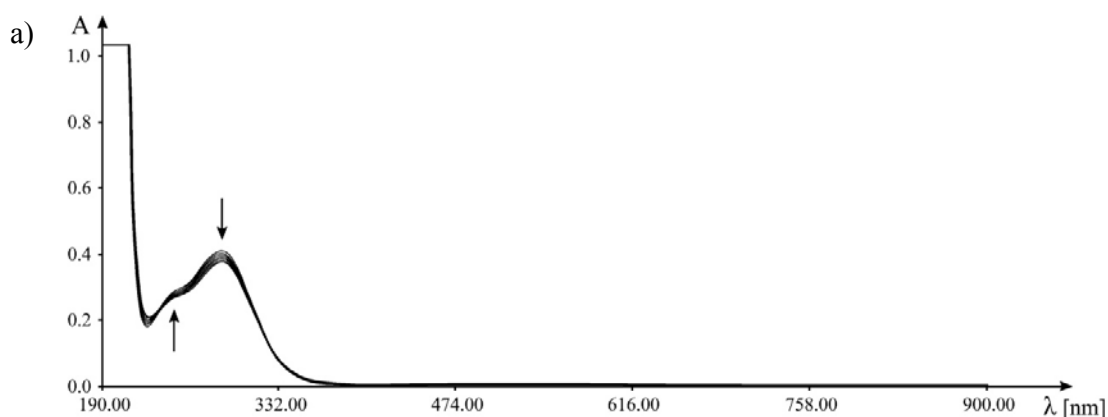
Slika 48. Promene apsorpcionih spektara reakcionih proizvoda sa vremenom po dodatku R_4 , nakon: a, a') 1 min; b, b') 4,6 min i c, c') 8,2 min. Krive: 1 – osnovna reakcija i 2 – ispitivana reakcija. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $1,0 \text{ cm}^3 R_3$ [$c(\text{Na-salicilat}) = 1,55 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{Na-nitroprusid}) = 8,38 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{EDTA}) = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]; $c(\text{urea}) = 4,16 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{ureaza}) = 175 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$; $0,2 \text{ cm}^3 R_4$ [$c(\text{NaOCl}) = 1,24 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{NaOH}) = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]; $c(\text{neomicin}) = 123 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$; fosfatni pufer ($\text{pH} = 7,5$); $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

U cilju analize navedenih efekata neomicina, snimljeni su pojedinačni spektri ovog antibiotika sa reagensima R_3 i R_4 u fosfatnom puferu. Neomicin i reagens R_3 ne reaguju u fosfatnom puferu. Neomicin, u zavisnosti od koncentracije, reaguje sa reagensom R_4 i daje različite spektre. Pri nižim koncentracijama neomicina, uočava se opadanje apsorbanse hipohlorita koji apsorbuje na 292 nm (slika 49a), dok pri većim koncentracijama neomicina, stvara se proizvod koji apsorbuje na 252 nm, a sa vremenom se razgrađuje (slika 49b). Ovaj pik verovatno predstavlja organski hloramin nastao između neomicina i hipohlorita iz reagensa R_4 .

Rezultati analize spektara reakcionog sistema neomicin- R_4 - NH_4^+ (amonijak umesto uree i ureaze) potvrđuju da neomicin, prisutan u većim koncentracijama, inhibira formiranje hloramina (jednačina 67), slika 50b. Pri nižim koncentracijama neomicina zapaža se opadanje apsorbanse na 292 nm, ali i pojava maksimuma na 252 nm, slika 50a.



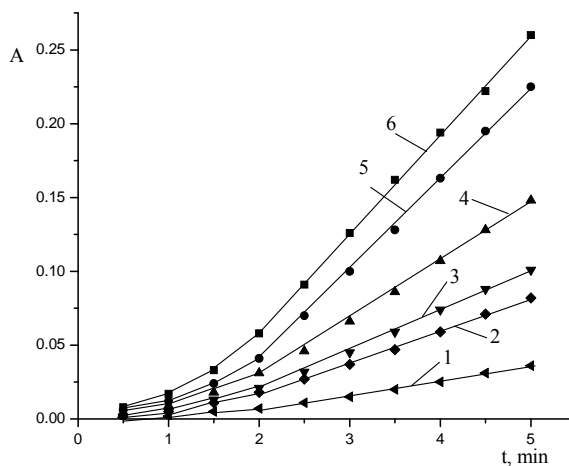
Slika 49. Promene apsorpcionih spektara reakcionih proizvoda sa vremenom. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $0,2 \text{ cm}^3 R_4[c(\text{NaOCl}) = 1,24 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{NaOH}) = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]; a) $c(\text{neomicin}) = 23,06 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$; b) $c(\text{neomicin}) = 123 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$; fosfatni pufer ($\text{pH} = 7,5$); $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.



Slika 50. Promene apsorpcionih spektara reakcionih proizvoda sa vremenom. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $c(\text{NH}_4\text{OH}) = 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $0,2 \text{ cm}^3 \text{ R}_4[c(\text{NaOCl}) = 1,24 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{NaOH}) = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]; a) $c(\text{neomicin}) = 23,06 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$; b) $c(\text{neomicin}) = 123 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$; fosfatni pufer ($\text{pH} = 7,5$); $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Inhibitorni efekat neomicina na produkciju proizvoda modifikovane Berthelot-ove reakcije, koji apsorbuje na 700 nm, iskorišćen je za razradu kinetičko-spektrofotometrijske metode za njegovo određivanje praćenjem brzine odigravanja reakcije na talasnoj dužini od 700 nm. Promena apsorbanse sa vremenom praćena je tokom 5 min, 60 s nakon dodatka reagensa R_4 (slika 51). Dobijene zavisnosti $A = f(t)$ su linearne u celom ispitivanom intervalu, ali su razlike u brzinama reakcija za različite koncentracije neomicina veoma male u početku odigravanja reakcije, do kraja druge minute. Najpogodniji vremenski interval za kinetičko ispitivanje i

određivanje brzine reakcije je od 2 do 5 min, jer su promene apsorbance sa vremenom veće, što obezbeđuje veću tačnost i preciznost primenjene diferencijalne varijante tangensne metode.

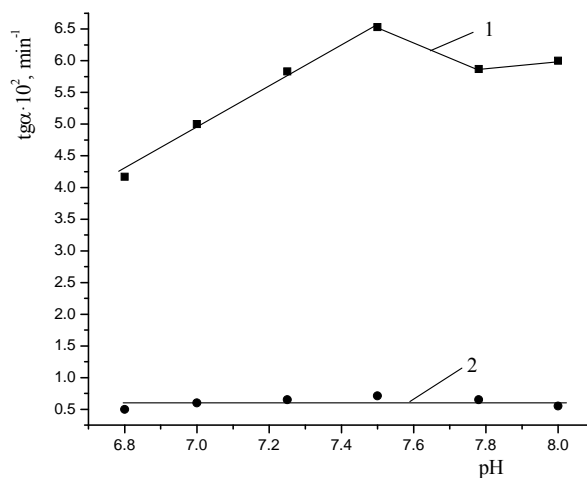


Slika 51. Promene apsorbance rastvora sa vremenom za različite koncentracije neomicina: 1) $153,70 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, 2) $123 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, 3) $107,62 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, 4) $92,25 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, 5) $76,88 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ i 6) $0 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $1,0 \text{ cm}^3 R_3[c(\text{Na-salicilat}) = 1,55\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $c(\text{Na-nitroprusid}) = 8,38\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $c(\text{EDTA}) = 2,50\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$]; $c(\text{urea}) = 4,16\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $c(\text{ureaza}) = 175 \text{ U}\cdot\text{dm}^{-3}$; $0,2 \text{ cm}^3 R_4[c(\text{NaOCl}) = 1,24\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $c(\text{NaOH}) = 2,5\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$]; $\text{pH} = 7,5$; $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Obzirom na to da je uočeni inhibitorni efekat izraženiji od aktivatornog, određivanje optimalnih uslova reakcije je vršeno sa većom koncentracijom neomicina, $153,70 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. U cilju razrade metode za određivanje što nižih koncentracija neomicina na osnovu njegovog inhibitornog dejstva na brzinu osnovne reakcije, ispitan je uticaj koncentracije reagujućih komponenata na brzine osnovne i ispitivane reakcije koje su praćene na 700 nm.

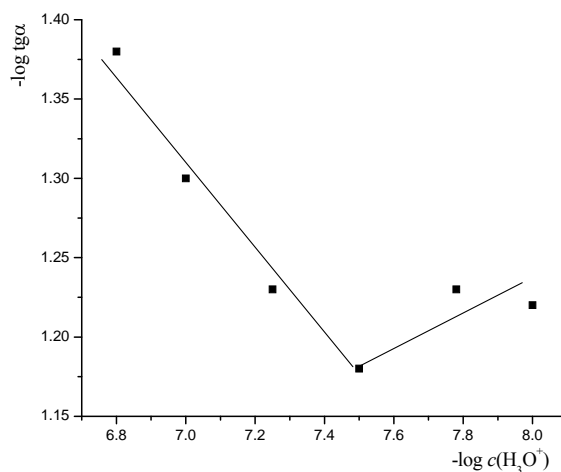
3.3.1. Određivanje optimalnih uslova odigravanja reakcije

Efekat pH vrednosti fosfatnog pufera na brzine obe reakcije ispitan je u intervalu od 6,8 do 8,0 (slika 52), odnosno u intervalu koncentracije H_3O^+ jona od $1,0\cdot 10^{-8}$ do $1,58\cdot 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Kako je najveća razlika u brzinama osnovne i ispitivane reakcije pri $\text{pH} = 7,5$, ova vrednost je odabrana za dalja merenja. Brzina ispitivane reakcije je približno konstantna u ispitivanom intervalu i nultog je reda. Zavisnost brzine osnovne reakcije od pH nije linearna.



Slika 52. Zavisnost brzine osnovne (1) i ispitivane (2) reakcije od pH vrednosti. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $1,0 \text{ cm}^3 R_3[c(\text{Na-salicilat}) = 1,55 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{Na-nitroprusid}) = 8,38 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{EDTA}) = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]; $c(\text{urea}) = 4,16 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{ureaza}) = 175 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$; $0,2 \text{ cm}^3 R_4[c(\text{NaOCl}) = 1,24 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{NaOH}) = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]; $c(\text{neomicin}) = 153,70 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$; $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

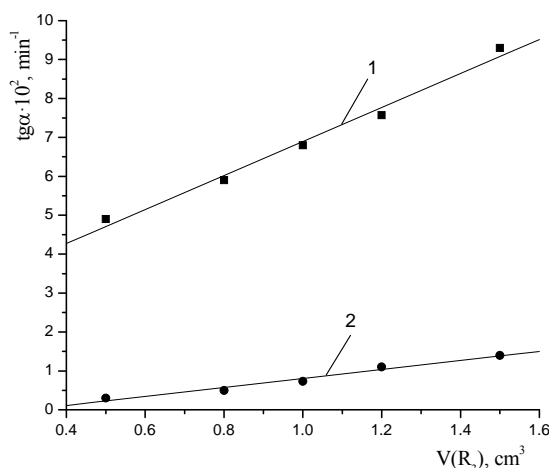
Za određivanje vrednosti reda ove reakcije prikazana je zavisnost negativnog logaritma brzine reakcije od negativnog logaritma koncentracije H_3O^+ jona (slika 53). Vrednosti redova reakcije su $-0,3$ i $+0,1$ za interval pH od 6,8 do 7,5 i od 7,5 do 8,0, respektivno.



Slika 53. Zavisnost $-\log tga$ osnovne reakcije od $-\log c(\text{H}_3\text{O}^+)$. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $1,0 \text{ cm}^3 R_3[c(\text{Na-salicilat}) = 1,55 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{Na-nitroprusid}) = 8,38 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{EDTA}) = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]; $c(\text{urea}) = 4,16 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{ureaza}) = 175 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$; $0,2 \text{ cm}^3 R_4[c(\text{NaOCl}) = 1,24 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{NaOH}) = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$].

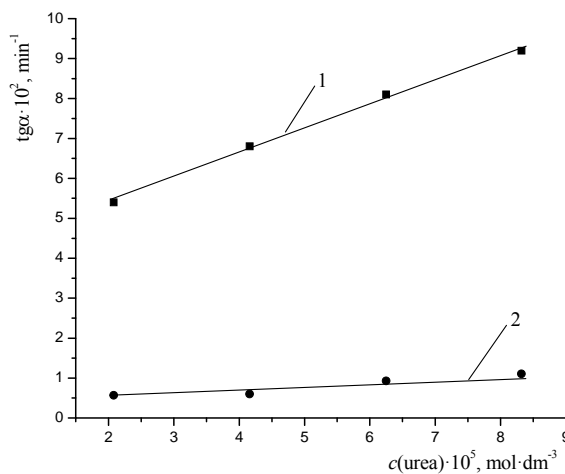
Brzine reakcija, osnovne i ispitivane, su u posmatranom intervalu linearno zavisne od koncentracije (iskazane preko zapremine) reagensa R_3 (slika 54) i obe su prvog reda u odnosu na

koncentraciju ovog reagensa. Na osnovu dobijenih zavisnosti, zapremina od 1 cm^3 je odabrana kao optimalna, jer pri većim vrednostima dolazi do skraćenja linearnog dela kinetičkih krivih zbog čega se tangens ugla nagiba tih pravih određuje sa manjom pouzdanošću.



Slika 54. Zavisnost brzine osnovne (1) i ispitivane (2) reakcije od zapremine reagensa R_3 . Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $c(\text{urea}) = 4,16 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{ureaza}) = 175 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$; $0,2 \text{ cm}^3 R_4 [c(\text{NaOCl}) = 1,24 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{NaOH}) = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$; $c(\text{neomicin}) = 153,70 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$; $\text{pH} = 7,5$; $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

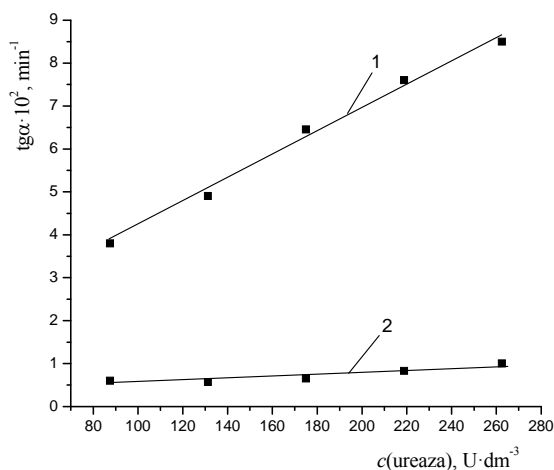
Uticaj koncentracije uree na brzine reakcija ispitivan je u intervalu $(2,08\text{--}8,32) \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, a eksperimentalni rezultati su prikazani na slici 55.



Slika 55. Zavisnost brzine osnovne (1) i ispitivane (2) reakcije od koncentracije uree. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $1,0 \text{ cm}^3 R_3 [c(\text{Na-salicilat}) = 1,55 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{Na-nitroprusid}) = 8,38 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{EDTA}) = 2,50 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$; $c(\text{ureaza}) = 175 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$; $0,2 \text{ cm}^3 R_4 [c(\text{NaOCl}) = 1,24 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{NaOH}) = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$; $c(\text{neomicin}) = 153,70 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$; $\text{pH} = 7,5$; $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Zavisnosti brzina ispitivane i osnovne reakcije od koncentracije uree su linearne u celom ispitivanom intervalu, stoga su one prvog reda u odnosu na koncentraciju uree. Kao optimalna koncentracija uree odabrana je $4,16 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

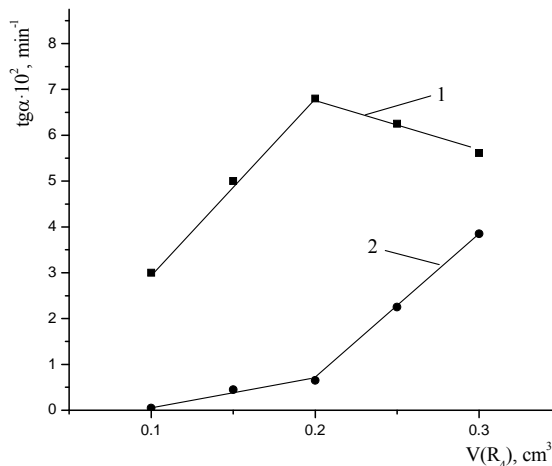
Rezultati ispitivanja brzine osnovne i ispitivane reakcije u odnosu na koncentraciju enzima prikazani su na slici 56.



Slika 56. Zavisnost brzine osnovne (1) i ispitivane (2) reakcije od koncentracije ureaze. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $1,0 \text{ cm}^3 R_3 [c(\text{Na-salicilat}) = 1,55 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c(\text{Na-nitroprusid}) = 8,38 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c(\text{EDTA}) = 2,50 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$; $c(\text{urea}) = 4,16 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $0,2 \text{ cm}^3 R_4 [c(\text{NaOCl}) = 1,24 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c(\text{NaOH}) = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$; $c(\text{neomicin}) = 153,70 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$; $\text{pH} = 7,5$; $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Brzina ispitivane reakcije se neznatno menja sa povećanjem koncentracije ureaze, tako da je ova reakcija nultog reda u odnosu na koncentraciju enzima. Brzina osnovne reakcije je linearna funkcija koncentracije ureaze u opsegu koncentracija od $87,5$ do $262,5 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$ i prvog je reda u odnosu na koncentraciju enzima. Koncentracija od $175 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$ je korišćena za dalji rad, jer se pri većim vrednostima skraćuje interval linearnosti kinetičkih krivih zbog čega se tangens ugla nagiba tih pravih određuje sa manjom tačnošću.

Ispitan je i uticaj koncentracije (iskazane preko zapremine) reagensa R_4 na brzinu obe reakcije (slika 57).



Slika 57. Zavisnost brzine osnovne (1) i ispitivane (2) reakcije od zapremine R_4 . Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $1,0 \text{ cm}^3 R_3 [c(\text{Na-salicilat}) = 1,55 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c(\text{Na-nitroprusid}) = 8,38 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c(\text{EDTA}) = 2,50 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$; $c(\text{urea}) = 4,16 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{ureaza}) = 175 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{neomicin}) = 153,70 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$; $\text{pH} = 7,5$; $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$.

Brzina osnovne reakcije pokazuje maksimum za $0,2 \text{ cm}^3 R_4$ reagensa. Nakon toga brzina reakcije se naglo smanjuje. Ispitivana reakcija pokazuje porast brzine sa povećanjem koncentracije tj. zapremine R_4 reagensa. Zapremina od $0,2 \text{ cm}^3$ ovog reagensa je odabrana kao optimalna, jer je na toj vrednosti zapremine reagensa R_4 najveća razlika u brzinama reakcija. Obe reakcije su +1 reda u odnosu na koncentraciju ovog reagensa u intervalu od $0,1$ do $0,2 \text{ cm}^3$.

Na osnovu prethodno datih zavisnosti brzina osnovne i ispitivane reakcije od svakog reaktanta pojedinačno, kao i određivanja reda reakcije u odnosu na svaki reaktant pojedinačno, mogu se postaviti kinetičke jednačine za ispitivane procese:

osnovna reakcija

$$\frac{dc}{dt} = k_1 \cdot c_{\text{H}_3\text{O}^+}^{0,1} \cdot c_{\text{urea}} \cdot c_{\text{ureaza}} \cdot c_{R_3} \cdot c_{R_4} \quad (81)$$

za interval koncentracija:

$$\text{H}_3\text{O}^+ = (1,0 - 3,16) \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}; \text{pH} = 7,5 - 8,0$$

$$R_3 = 0,2 - 1,5 \text{ cm}^3$$

$$\text{uree} = (2,08 - 8,32) \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$$

$$\text{ureaze} = 87,5 - 262,5 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$$

$$R_4 = 0,1 - 0,2 \text{ cm}^3$$

ispitivana reakcija

$$\frac{dc}{dt} = k_2 \cdot c_{\text{urea}} \cdot c_{R_3} \cdot c_{R_4} \cdot c_{\text{neomicin}}^{-1} \quad (82)$$

za interval koncentracija:

$$H_3O^+ = 1 \cdot 10^{-8} - 1,58 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}; \text{ pH} = 6,8 - 8,0$$

$$R_3 = 0,2 - 1,5 \text{ cm}^3$$

$$\text{uree} = (2,08 - 8,32) \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$$

$$\text{ureaze} = 87,5 - 262,5 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$$

$$R_4 = 0,1 - 0,2 \text{ cm}^3$$

gde je:

$\frac{dc}{dt}$ – promena koncentracije indikatorske supstance,

k_1 – uslovna konstanta brzine osnovne reakcije,

k_2 – uslovna konstanta brzine ispitivane reakcije.

3.3.2. Validacija kinetičko–spektrofotometrijske metode za određivanje neomicina

Validacija metode izvršena je određivanjem intervala linearnosti, limita detekcije, tačnosti, preciznosti i selektivnosti.

Linearnost

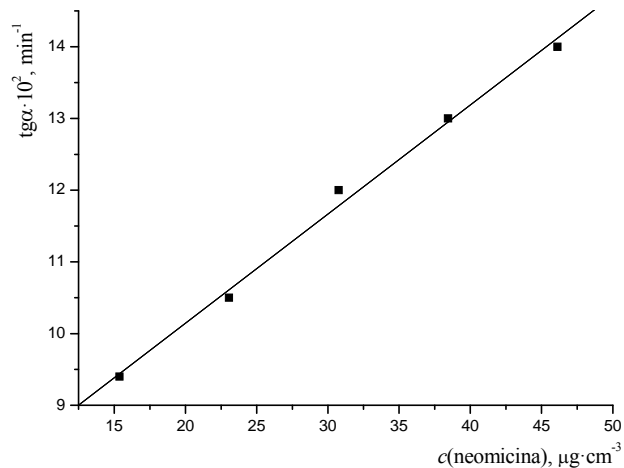
Uticaj neomicina na brzinu reakcije praćen je pri prethodno odabranim optimalnim uslovima odigravanja reakcije: $1,0 \text{ cm}^3 R_3 [c(\text{Na-salicilat}) = 1,55 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c(\text{Na-nitroprusid}) = 8,38 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c(\text{EDTA}) = 2,50 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$; $c(\text{urea}) = 4,16 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{ureaza}) = 175 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$; $0,2 \text{ cm}^3 R_4 [c(\text{NaOCl}) = 1,24 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c(\text{NaOH}) = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$; $\text{pH} = 7,5$; $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Neomicin pokazuje aktivatorni efekat u opsegu koncentracija od $15,37$ do $46,12 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ i brzina reakcije linearno raste. Kalibraciona prava (slika 58) može se prikazati sledećom jednačinom:

$$\begin{aligned} \text{tg} \alpha \cdot 10^2 &= (7,1000 \pm 0,2174) + (0,1522 \pm 0,0067) \cdot c(\text{neomicin}); \\ r &= 0,9971; S_0 = 0,1620; n = 5 \end{aligned} \quad (83)$$

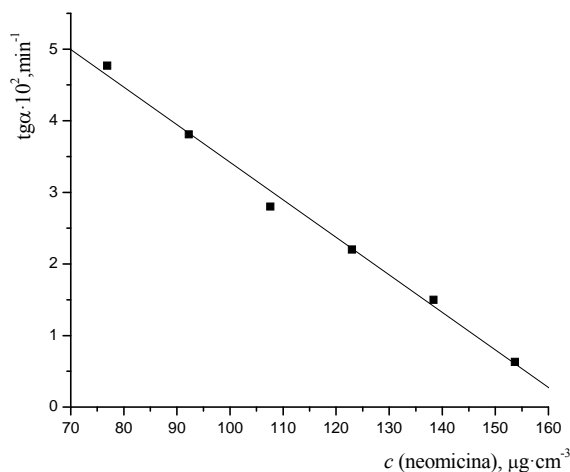
gde je:

$\text{tg}\alpha$ – nagib linearnog dela kinetičke krive u koordinatnom sistemu $A = f(t)$ i
 $c(\text{neomicin})$ – koncentracija neomicina izražena u $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$,
 S_0 – standardna devijacija fitovanja.



Slika 58. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije neomicina. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $1,0 \text{ cm}^3$ $R_3[c(\text{Na-salicilat}) = 1,55 \cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $c(\text{Na-nitroprusid}) = 8,38 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $c(\text{EDTA}) = 2,50 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$]; $c(\text{urea}) = 4,16 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $c(\text{ureaza}) = 175 \text{ U}\cdot\text{dm}^{-3}$; $0,2 \text{ cm}^3$ $R_4[c(\text{NaOCl}) = 1,24 \cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $c(\text{NaOH}) = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$]; $\text{pH} = 7,5$; $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Neomicin pokazuje inhibitorni efekat u intervalu koncentracije $76,88\text{--}153,70 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ i brzina reakcije linearno opada (slika 59).



Slika 59. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije neomicina. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $1,0 \text{ cm}^3$ $R_3[c(\text{Na-salicilat}) = 1,55 \cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $c(\text{Na-nitroprusid}) = 8,38 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $c(\text{EDTA}) = 2,50 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$]; $c(\text{urea}) = 4,16 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $c(\text{ureaza}) = 175 \text{ U}\cdot\text{dm}^{-3}$; $0,2 \text{ cm}^3$ $R_4[c(\text{NaOCl}) = 1,24 \cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $c(\text{NaOH}) = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$]; $\text{pH} = 7,5$; $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Jednačina prave za određivanje neomicina u navedenom intervalu je:

$$\begin{aligned} \text{tg}\alpha \cdot 10^2 &= (8,6676 \pm 0,2557) - (0,0524 \pm 0,0022) \cdot c(\text{neomicin}); \\ r &= -0,9966; S_0 = 0,1390; n = 6 \end{aligned} \quad (84)$$

Limit detekcije

Limit detekcije (LOD) određen je korišćenjem jednačina (76) i (77). Dobijene vrednosti su 3,51 i 2,93 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, respektivno.

Tačnost i reproduktivnost

Tačnost i reproduktivnost metode određene su za tri koncentracije sa kalibracionih pravih na osnovu rezultata iz pet merenja za svaku od izabranih koncentracija. Rezultati dobijeni statističkom obradom podataka prikazani su u tabeli 16.

Tabela 16. Tačnost i reproduktivnost određivanja neomicina.*

Koncentracija neomicina ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)		RSD (%)	$\frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \cdot 100$ (%)
odmereno μ	nađeno $\bar{x} \pm \text{SD}$		
15,37	14,99 \pm 0,52	3,47	-2,47
30,75	31,74 \pm 1,32	4,16	+3,22
46,12	44,02 \pm 1,23	2,79	-4,55
76,88	73,61 \pm 1,46	1,99	-4,25
123,00	124,86 \pm 1,23	0,98	+1,51
153,70	152,55 \pm 1,03	0,68	-0,75

(* Legendna veličina i odgovarajući izrazi dati su uz tabelu 9 u poglavlju 3.1.2.

Iz prikazanih rezultata vidi se da se vrednost relativne greške određivanja neomicina ovom metodom kreće od 3,47 do 2,79 % (za interval koncentracije neomicina od 15,37 do 46,12 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) i od 1,99 do 0,68 % (za interval koncentracije neomicina od 76,88 do 153,7 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$).

Selektivnost

U cilju utvrđivanja selektivnosti ove metode ispitan je uticaj nekih jona i organskih molekula na brzinu ispitivane reakcije sa inhibitornim efektom koju daje koncentracija neomicina od $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (123 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) i na brzinu ispitivane reakcije sa aktivatornim efektom koju

daje koncentracija neomicina od $3,75 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ($23,06 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$). Koncentracija ispitivanih supstanci varirana je u odnosu na zadate koncentracije neomicina sve dok nije nađena ona koncentracija koja ometa njegovo određivanje (tabele 17 i 18). Granica tolerancije data je kao odnos molarnih koncentracija strane komponente i neomicina u ispitivanom rastvoru. Pri tome je uzeto da je granica tolerancije ona koncentracija strane supstance koja daje odstupanje do dve standardne devijacije koncentracije prilikom određivanja neomicina (2s kriterijum) (Kirkbright, 1966).

Tabela 17. Granica tolerancije stranh jona i molekula pri određivanju neomicina (inhibitorni efekat).

Granica tolerancije $c_x / c_{\text{neomicin}}$	Jon/molekul (x)
1	$\text{Cd}^{2+}, \text{Cu}^{2+}, \text{Pb}^{2+}, \text{Cl}^-, \text{CO}_3^{2-}$
Interferiraju kod odnosa 1:1	$\text{Zn}^{2+}, \text{Co}^{2+}, \text{Al}^{3+}, \text{Ca}^{2+}, \text{Ba}^{2+}, \text{Mg}^{2+}, \text{Mn}^{2+}, \text{NO}_3^-, \text{SO}_3^{2-}, \text{Br}^-, \text{CH}_3\text{COO}^-$

Tabela 18. Granica tolerancije stranh jona i molekula pri određivanju neomicina (aktivatorni efekat).

Granica tolerancije $c_x / c_{\text{neomicin}}$	Jon/molekul (x)
10	$\text{Mn}^{2+}, \text{Mg}^{2+}, \text{Cd}^{2+}, \text{CH}_3\text{COO}^-, \text{SO}_4^{2-}, \text{SO}_3^{2-}$
1	$\text{Cu}^{2+}, \text{Al}^{3+}, \text{Cl}^-, \text{CO}_3^{2-}$, glukoza, limunska, askorbinska, salicilna, nikotinska kiselina, Br^-
Interferiraju kod odnosa 1:1	$\text{Fe}^{3+}, \text{Pb}^{2+}$

Rezultati ispitivanja selektivnosti metode pokazuju da joni Fe^{3+} i Pb^{2+} kod odnosa 1:1 interferiraju u reakciji određivanja neomicina koncentracije $23,06 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$. U istom odnosu joni $\text{Zn}^{2+}, \text{Co}^{2+}, \text{Al}^{3+}, \text{Ca}^{2+}, \text{Ba}^{2+}, \text{Mg}^{2+}, \text{Mn}^{2+}, \text{NO}_3^-, \text{SO}_3^{2-}, \text{Br}^-, \text{CH}_3\text{COO}^-$ ometaju određivanje neomicina koncentracije $123 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$.

3.3.3. Primena kinetičko-spektrofotometrijske metode za određivanje neomicina

Aplikativnost predložene metode ispitana je određivanjem sadržaja neomicina u kapima za oči tri različita proizvođača i rezultati su upoređeni sa rezultatima dobijenim mikrobiološkom disk-difuzionom metodom (*Jugoslovenska Farmakopeja 2000, 20001, str 781*), tabela 19. Kalibraciona prava (slika 60a) za disk-difuzionu metodu predstavlja zavisnost zone inhibicije rasta mikroorganizama u funkciji logaritma nanete doze antibiotika (neomicina). Na slici 60b prikazan je izgled zone inhibicije u triplikatu nakon delovanja jednog od uzoraka testiranih farmaceutskih preparata.

Tabela 19. Tačnost i reproduktivnost određivanja neomicina u kapima za oči.

Koncentracija neomicina (mg·cm ⁻³)			RSD (%)	$\frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \cdot 100$ (%)	Recovery (kinetička metoda) (%)	F-test	t-test
deklarisana μ	određena kinetičkom metodom ($\bar{x} \pm SD$)	određena mikrobiološkom metodom ($\bar{x} \pm SD$)					
5,00 ^{a/}	4,94 ± 0,11	4,67 ± 0,45	2,23	-1,2	98,80	16,73	1,00
3,50 ^{b/}	3,78 ± 0,10	3,93 ± 0,35	2,65	+8,0	108,00	12,25	0,70
3,50 ^{c/}	3,81 ± 0,15	4,05 ± 0,40	3,94	+8,8	108,88	7,11	0,98

\bar{x} – srednja vrednost i SD – standardna devijacija za n = 3 merenja i za stepen poverenja od 95 %;

Recovery (%) = nađeno/odmereno · 100;

Teorijske vrednosti za F-test ($v_1 = 2, v_2 = 2$) i t-test ($v = 4$) za stepen poverenja od 95 % su 19,00 i 2,776, respektivno,

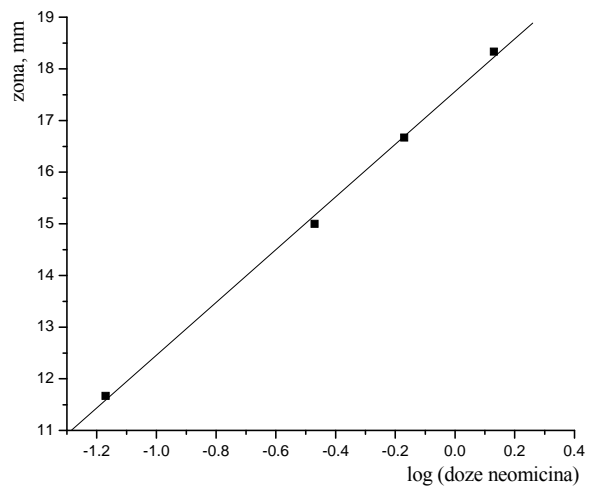
^{a/}Deksametazon Neomicin kapi za oči, 5 mg/cm³ neomicinsulfata, Galenska laboratorija, Apotekarska ustanova Niš,

^{b/}Dexamethason Neomycin kapi za oči, 3,5 mg/cm³ neomicina, Galenika a.d., Beograd,

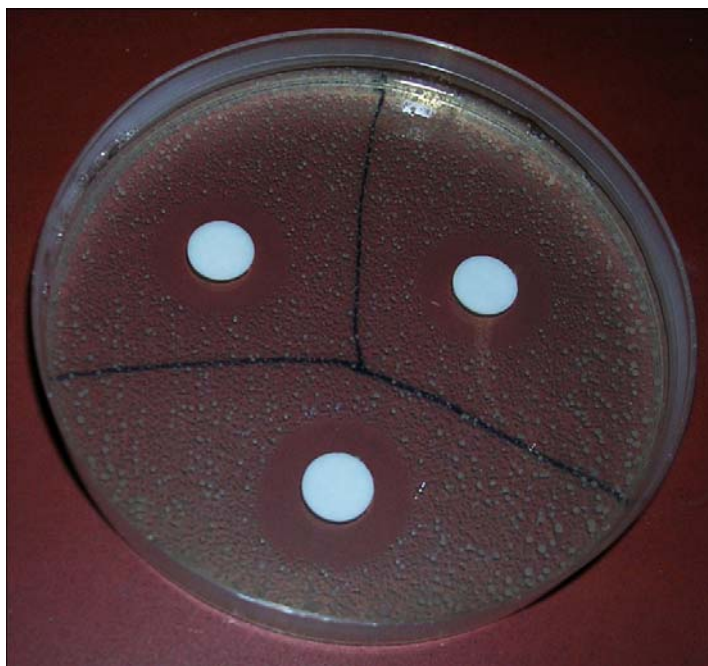
^{c/}Neodeksacin kapi za oči, 3,5 mg/cm³ neomicina, Hemofarm, a.d., Vršac.

Vrednosti F-testa i Studentovog t-testa pokazale su da nema značajnije razlike u rezultatima dobijenim kinetičko-spektrofotometrijskom i mikrobiološkom metodom za ispitivane uzorke ($F_{\text{eksp.}} < F_{\text{tab.}}$ i $t_{\text{eksp.}} < t_{\text{tab.}}$). Rezultati dobijeni za sadržaj neomicina u kapima za oči su takođe u saglasnosti sa vrednostima deklarisanim od strane proizvođača.

a)



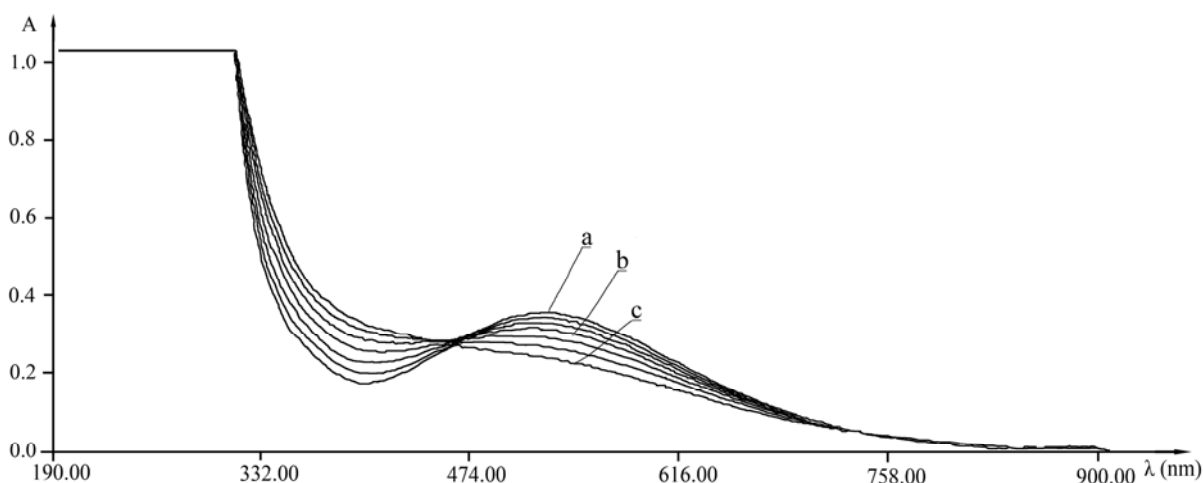
b)



Slika 60. a) Kalibraciona prava za disk-difuzionu mikrobiološku metodu i b) Izgled zone inhibicije u triplikatu nakon delovanja 1 µg neomicina iz farmaceutskog preparata Deksametazon Neomicin kapi za oči, Galenska laboratorija, Apotekarska ustanova Niš na gram pozitivnu bakteriju *Bacillus subtilis*.

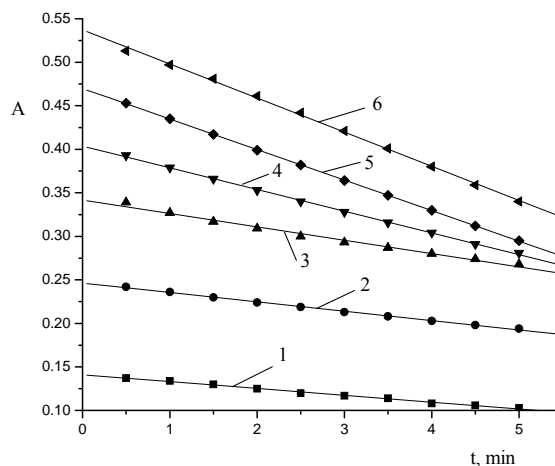
3.4. Kinetičko–spektrofotometrijsko određivanje Na-salicilata

Metoda za određivanje natrijum-salicilata (NaS) zasnovana je na Fenton-ovoj reakciji, čiji je mehanizam opisan u poglavlju 1.1.4.1.1. U ovom oksidacionom procesu, dejstvom vodonik-peroksida u prisustvu fero jona nastaju feri joni i slobodni radikali. Ovi jaki, nespecifični oksidansi brzo razgrađuju purpurno obojeni kompleks nastao između feri jona i prisutnog salicilatnog anjona (slika 61).



Slika 61. Promena apsorpcionog spektra pri degradaciji kompleksa Fe(III)-salicilat sa vremenom, nakon: a) 1 min; b) 4,6 min i c) 8,2 min. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $c(\text{Fe}^{2+}) = 2,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 2,67 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{NaS}) = 8,27 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$; $c(\text{pufera}) = 7,1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. $\text{pH} = 3,4$; $t = 26,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Brzina reakcije degradacije kompleksa u acetatnom puferu praćena je spektrofotometrijski na osnovu opadanja apsorbanca na 525 nm tokom 5 min, po isteku prve minute od inciranjja reakcije. Dobijene zavisnosti $A = f(t)$ su za različite koncentracije NaS linearne u celom ispitivanom vremenskom intervalu (slika 62) što je omogućilo primenu diferencijalne varijante tangensne metode.

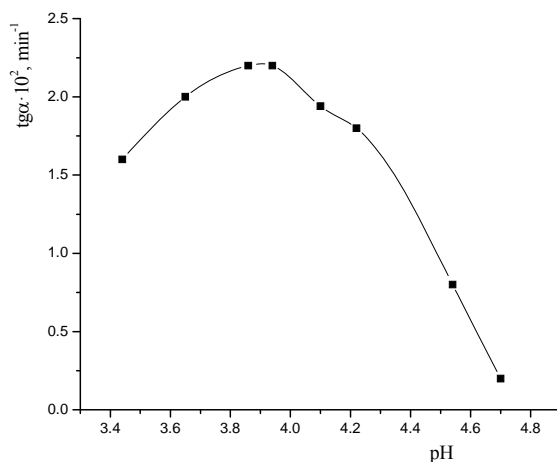


Slika 62. Promene apsorbance rastvora sa vremenom za različite koncentracije NaS: 1) $1,65 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ 2) $3,31 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ 3) $4,97 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ 4) $6,61 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, 5) $8,27 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ i 6) $9,30 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $c(\text{Fe}^{2+}) = 4,67 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 6,67 \cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $c(\text{pufer}) = 8,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $\text{pH} = 3,9$; $t = 26,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

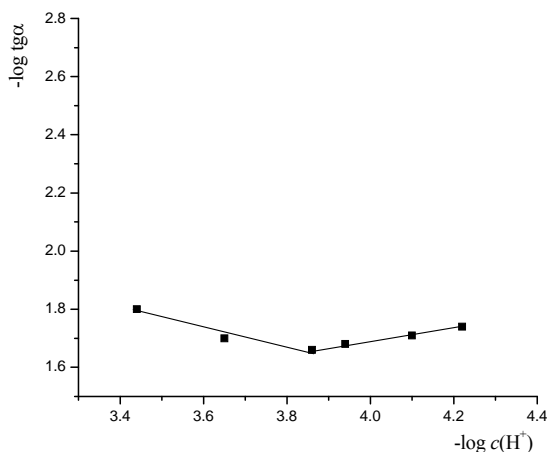
U cilju optimizacije uslova odigravanja reakcije i razrade kinetičko–spektrofotometrijske metode za određivanje što nižih koncentracija NaS, ispitan je uticaj pH, temperature i promene koncentracije reagujućih komponenti (Fe_2SO_4 i H_2O_2) na brzinu reakcije.

3.4.1. Određivanje optimalnih uslova odigravanja reakcije

Uticaj pH sredine na brzinu ispitivane reakcije praćen je u intervalu od 3,4 do 4,7 korišćenjem acetatnih pufera (slika 63). Vrednost pH rastvora od 3,9 izabrana je kao optimalna za dalji rad, jer je na ovoj vrednosti brzina reakcije najveća. Kako ova zavisnost nije linearna, za određivanje reda ove reakcije u odnosu na pH, prikazana je zavisnost negativnog logaritma brzine reakcije od negativnog logaritma koncentracije H_3O^+ jona (slika 64).



Slika 63. Zavisnost brzine reakcije od pH vrednosti. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $c(\text{Fe}^{2+}) = 4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 2,67 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{NaS}) = 4,97 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$; $c(\text{pufer}) = 5,73 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $t = 26,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

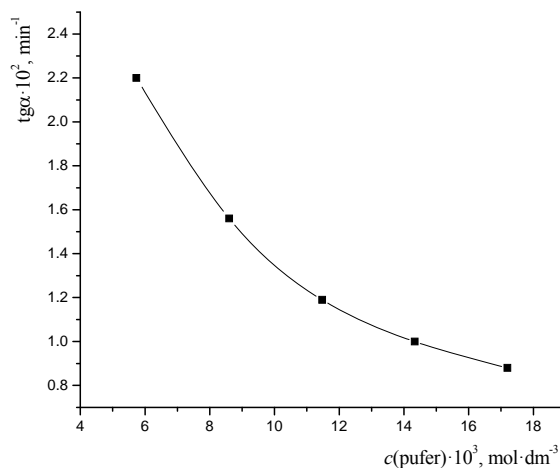


Slika 64. Zavisnost $-\log \text{tga}$ reakcije od $-\log c(\text{H}_3\text{O}^+)$ jona. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $c(\text{Fe}^{2+}) = 4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 2,67 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{NaS}) = 4,97 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$; $c(\text{pufer}) = 5,73 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $t = 26 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

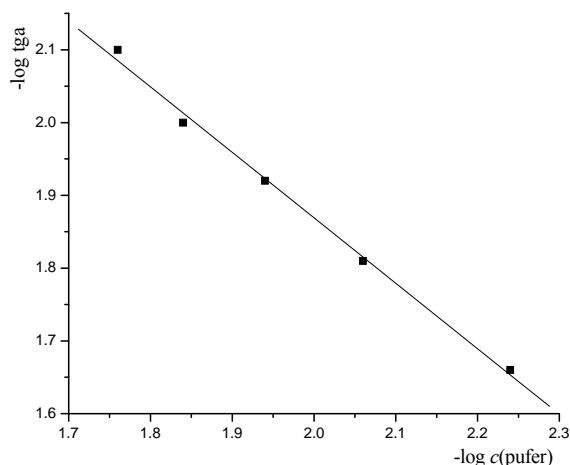
Reakcija je +0,22 reda u odnosu na koncentraciju vodonikovih jona u intervalu od $6,31 \cdot 10^{-5}$ do $1,25 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (pH = 3,9 – 4,2).

Zavisnost brzine reakcije praćena je sa promenom koncentracije pufera (slika 65) odakle se vidi da brzina reakcije opada sa povećanjem koncentracije pufera od $5,75 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ do $1,72 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Za dalji rad je, kao optimalna, odabrana koncentracija od $8,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Reakcija je -0,9 reda u odnosu na koncentraciju pufera u intervalu koncentracije od $5,75 \cdot 10^{-3}$ do

$1,72 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, zato što negativni logaritam brzine od negativnog logaritma koncentracije pufera pokazuje linearnu zavisnost (slika 66).

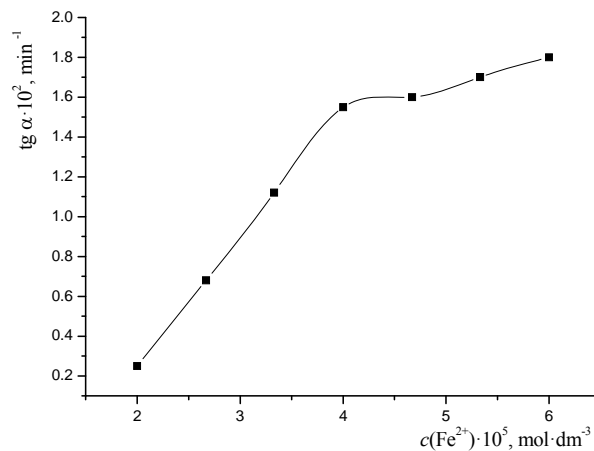


Slika 65. Uticaj koncentracije acetatnog pufera ($\text{pH} = 3,9$) na brzinu reakcije. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $c(\text{Fe}^{2+}) = 4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 2,67 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{NaS}) = 4,97 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$; $t = 26,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.



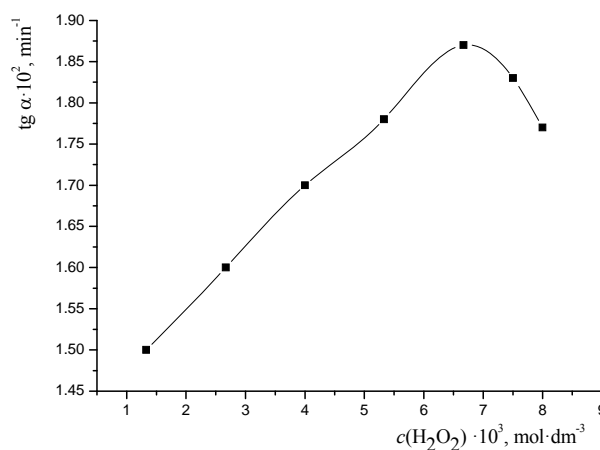
Slika 66. Zavisnost $-\log tga$ od $-\log c(\text{pufera})$. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $c(\text{Fe}^{2+}) = 4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 2,67 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{NaS}) = 4,97 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$; $\text{pH} = 3,9$; $t = 26,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Uticaj koncentracije Fe(II) jona na brzinu reakcije je posmatran u intervalu $(2,0-6,0) \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (slika 67). Brzina reakcije raste sa povećanjem koncentracije ovog reaktanta do $4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, odakle nastavlja da raste, ali znatno manjom brzinom. Koncentracija Fe(II) od $4,67 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ je odabrana za dalji rad. Reakcija je +1 reda u odnosu na Fe(II) u intervalu koncentracije od $(4-6) \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.



Slika 67. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije Fe(II). Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 2,67 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{NaS}) = 4,97 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$; $c(\text{pufer}) = 8,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $\text{pH} = 3,9$; $t = 26,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Zavisnost brzine reakcije od koncentracije vodonik-peroksida u intervalu $(1,33\text{--}8,0) \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ prikazana je na slici 68. Brzina reakcije linearno raste do $6,67 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{O}_2$, dok pri većim koncentracijama brzina reakcije naglo opada. Zato je ova koncentracija uzeta za optimalnu. Reakcija je +1 reda u odnosu na H_2O_2 u intervalu koncentracije $(1,33\text{--}6,67) \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.



Slika 68. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije vodonik-peroksida. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $c(\text{Fe}^{2+}) = 4,67 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{NaS}) = 4,97 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$; $c(\text{pufer}) = 8,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $\text{pH} = 3,9$; $t = 26,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$

Na osnovu prethodno dobijenih zavisnosti brzine reakcije od koncentracije svakog reaktanta pojedinačno, kao i određivanog reda reakcije u odnosu na koncentraciju svakog reaktanta pojedinačno, može se postaviti kinetička jednačina za ispitivani proces:

$$-\frac{dc}{dt} = k \cdot c_{\text{H}_3\text{O}^+}^{0,22} \cdot c_{\text{Fe}^{2+}} \cdot c_{\text{pufer}}^{-0,9} \cdot c_{\text{H}_2\text{O}_2} \cdot c_{\text{NaS}} \quad (85)$$

za interval koncentracija:

$$\text{H}_3\text{O}^+ = (0,63 - 1,25) \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}; \text{pH} = 3,9 - 4,2$$

$$\text{Fe}^{2+} = (4,0 - 6,0) \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$$

$$\text{H}_2\text{O}_2 = (1,33 - 6,67) \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$$

$$\text{pufera} = (5,73 - 17,2) \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}.$$

gde je:

$$-\frac{dc}{dt} \text{ – promena koncentracije indikatorske supstance,}$$

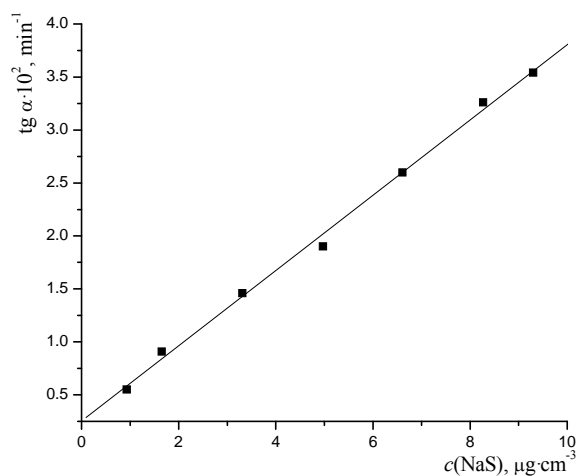
k – uslovna konstanta brzine reakcije.

3.4.2. Validacija kinetičko-spektrofotometrijske metode za određivanje Na-salicilata

Validacija metode izvršena je određivanjem intervala linearnosti, limita detekcije, tačnosti, preciznosti i selektivnosti.

Linearnost

Uticao NaS na brzinu reakcije praćen je pri prethodno odabranim optimalnim uslovima odigravanja reakcije: $c(\text{Fe}^{2+}) = 4,67 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 6,67 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{pufer}) = 8,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $\text{pH} = 3,9$; $t = 26,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Dobijena je linearna zavisnost u intervalu koncentracija NaS od 0,93 do 9,30 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ (slika 69) i može se koristiti za njegovo određivanje u rastvoru.



Slika 69. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije NaS. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $c(\text{Fe}^{2+}) = 4,67 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 6,67 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{pufer}) = 8,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $\text{pH} = 3,9$; $t = 26,0 \pm 0,1^\circ$.

Kalibraciona prava za određivanje NaS na $t = 26,0 \pm 0,1^\circ \text{C}$ može se prikazati sledećom jednačinom:

$$\text{tg}\alpha \cdot 10^2 = (0,2530 \pm 0,0534) + (0,3553 \pm 0,0092) \cdot c(\text{NaS}); \quad (86)$$

$$r = 0,9983; S_0 = 0,0793; n = 7$$

gde je:

$\text{tg}\alpha$ – nagib linearnog dela kinetičke krive u koordinatnom sistemu $A = f(t)$ i

$c(\text{NaS})$ – koncentracija natrijum-salicilata izražena u $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$,

S_0 – standardna devijacija fitovanja.

Limit detekcije

Limit detekcije (LOD) određen je korišćenjem jednačina (76) i (77). Dobijene vrednosti su $0,74$ i $0,48 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$, respektivno.

Tačnost i reproduktivnost

Tačnost i reproduktivnost metode određene su za tri koncentracije sa kalibracione prave na osnovu rezultata iz pet merenja za svaku od izabranih koncentracija. Rezultati dobijeni statističkom obradom podataka prikazani su u tabeli 20.

Tabela 20. Tačnost i reproduktivnost određivanja* NaS.

Koncentracija NaS ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)		RSD (%)	$\frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \cdot 100$ (%)
odmereno μ	određeno $\bar{x} \pm \text{SD}$		
0,93	0,88 \pm 0,06	6,82	-5,38
3,31	3,39 \pm 0,09	2,65	+2,42
9,30	9,36 \pm 0,16	1,71	+0,65

(*) Legenda veličina i odgovarajući izrazi dati su uz tabeli 9 u poglavlju 3.1.2.

Iz prikazanih rezultata se vidi da se relativna greška određivanja NaS ovom metodom kreće od 6,82 do 1,71 % za interval koncentracije NaS od 0,93 do 9,30 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$.

Selektivnost

Selektivnost ove metode je određena ispitivanjem uticaja većeg broja katjona i anjona i nekih šećera. Granica tolerancije posmatrana je pod optimalnim uslovima i konstantnom koncentracijom NaS od $4,13 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ($6,61 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$), a koncentracija ispitivanih supstanci je varirana u odnosu na zadatu koncentraciju NaS sve dok nije nađena ona koncentracija koja ometa njegovo određivanje (tabela 21). Granica tolerancije je ona koncentracija strane supstance koja daje odstupanje u koncentraciji manje od dve standardne devijacije koncentracije za sistem bez strane komponente (2s kriterijum) (Kirkbright, 1966) pri određivanju navedene koncentracije NaS. Granica tolerancije data je kao odnos molarnih koncentracija strane komponente i NaS u ispitivanom rastvoru.

Tabela 21. Selektivnost određivanja NaS.

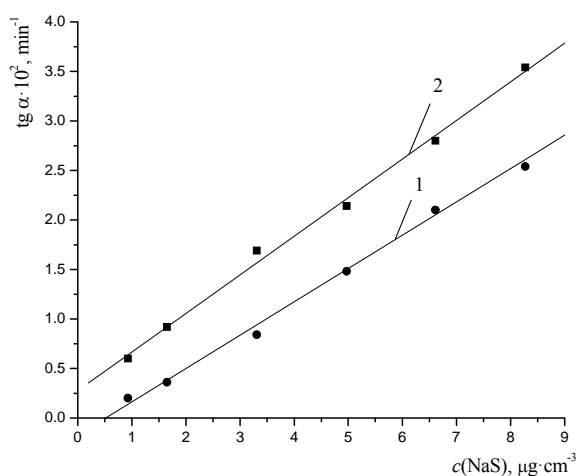
Granica tolerancije c_x / c_{NaS}	Jon/molekul (x)
10^3	NO_3^-
10^2	$\text{Li}^+, \text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}, \text{Co}^{2+}, \text{Cd}^{2+}$
10	$\text{Ni}^{2+}, \text{Cu}^{2+}$
1	$\text{Al}^{3+}, \text{Zn}^{2+}, \text{F}^-, \text{fruktoza}, \text{glukoza}, \text{tiamin}$
Interferiraju kod odnosa 1:1	$\text{laktoza}, \text{K}^+, \text{Mn}^{2+}, \text{HPO}_4^{2-}$

Rezultati ispitivanja selektivnosti metode pokazuju da metalni joni $\text{Li}^+, \text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}, \text{Co}^{2+}, \text{Cd}^{2+}$, kada su prisutni u višku 100:1, ne utiču na tačnost određivanja NaS. Metalni joni Ni^{2+} i Cu^{2+} takođe ne ometaju određivanje NaS kada su prisutni u koncentracijama do 10 puta većim od koncentracije NaS. Joni Al^{3+} i Zn^{2+} , kao i fruktoza, glukoza i tiamin ne interferiraju u odnosu 1:1,

dok laktoza i joni K^+ i Mn^{2+} , HPO_4^{2-} u istom odnosu ometaju određivanje NaS. Reakcija je najtolerantnija na prisustvo NO_3^- jona.

3.4.3. Termodinamičke karakteristike sistema

Brzina ispitivane reakcije praćena je pri odabranim optimalnim uslovima na tri temperature: 23, 26 i 29 °C. Grafičke zavisnosti brzine reakcije od koncentracije NaS na temperaturama 23 i 29 °C prikazani su na slici 70, dok je zavisnost na 26 °C data na slici 69.



Slika 70. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije NaS. Krive: 1) $t = 23,0$ °C i 2) $t = 29,0$ °C. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $c(Fe^{2+}) = 4,67 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(H_2O_2) = 6,67 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{pufera}) = 8,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. $pH = 3,9$.

Kalibraciona prava za određivanje NaS na $T = 296$ K može se prikazati jednačinom:

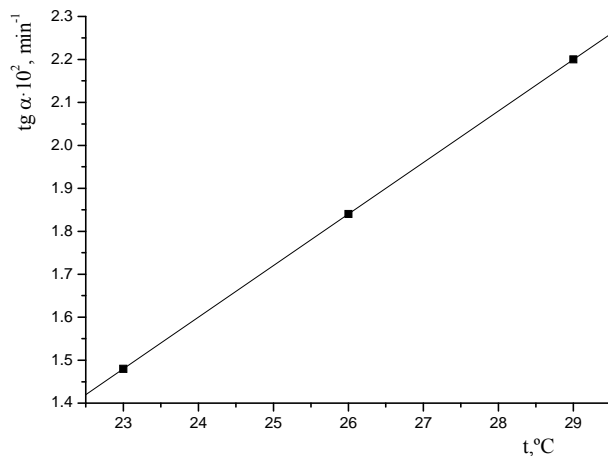
$$\begin{aligned} \text{tg } \alpha \cdot 10^2 &= (0,1669 \pm 0,0539) + (0,3311 \pm 0,0108) \cdot c(\text{NaS}); & (87) \\ r &= 0,9979; S_0 = 0,0687; n = 6 \end{aligned}$$

Kalibraciona prava za određivanje NaS na $T = 302$ K može se prikazati jednačinom:

$$\begin{aligned} \text{tg } \alpha \cdot 10^2 &= (0,2766 \pm 0,0639) + (0,3897 \pm 0,0127) \cdot c(\text{NaS}); & (88) \\ r &= 0,9978; S_0 = 0,0815; n = 6 \end{aligned}$$

Interval linearnosti se skraćuje i na $t = 23$ i 29 °C i svodi se na opseg koncentracija $0,93$ – $8,27$ $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$.

Na osnovu rezultata zavisnosti brzina reakcije od temperature za koncentraciju NaS od $4,97$ $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ dobijen je grafik prikazan na slici 71.



Slika 71. Zavisnost brzine reakcije od temperature. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $c(\text{Fe}^{2+}) = 4,67 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 6,67 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{NaS}) = 4,97 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$, $c(\text{pufera}) = 8,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. $\text{pH} = 3,9$

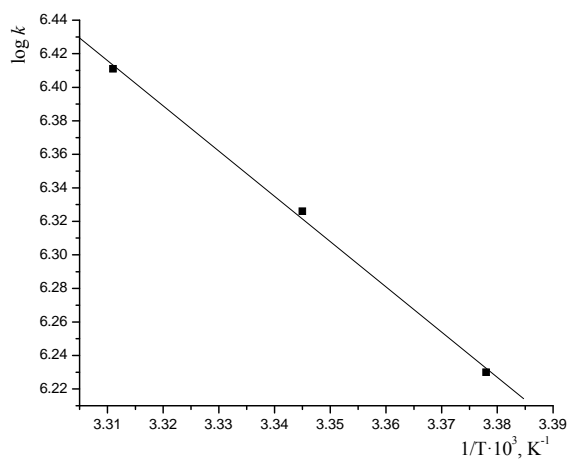
Na osnovu kinetičke jednačine (85) izračunata je uslovna konstanta brzine reakcije na tri različite temperature (tabela 22):

Tabela 22. Uslovna konstanta brzine reakcije na različitim temperaturama.

$k \cdot 10^6 \text{ (mol} \cdot \text{dm}^{-3})^{1-n} \text{ s}^{-1}$	T (K)
1,71	296
2,12	299
2,53	302

n – red reakcije

Termodinamički parametri reakcije degradacije kompleksa određeni su na osnovu vrednosti nagiba prave prikazane na slici 72.



Slika 72. Zavisnost log uslovne konstante brzine od recipročne vrednosti apsolutne temperature.

Iz nagiba ove prave izračunata je energija aktivacije primenom jednačine:

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{d(\log k)}{dT} = - \frac{E_a^*}{19,14} \quad (89)$$

Ostali termodinamički parametri, promena entalpije (ΔH^*), promena entropije (ΔS^*), promena slobodne energije (ΔG^*) i pK^* vrednost građenja aktiviranog kompleksa, izračunati su primenom sledećih jednačina:

$$\Delta H^* = E_a^* - nRT \quad (90)$$

gde je n – molekularnost,

odnosno,

$$\Delta H^* = E_a^* - RT \quad \text{za reakcije u rastvorima i reakcije prvog reda u gasnom stanju}$$

$$\Delta S^* = 19,14 (\log k - \log T - 10,3178 + \Delta H^* / 19,14 T) \quad (91)$$

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T \Delta S^* \quad (92)$$

$$pK^* = \Delta G^* / 19,14 T \quad (93)$$

Vrednost izračunatih termodinamičkih parametara reakcije degradacije aktiviranog kompleksa, primenom gore navedenih jednačina, date su u tabeli 23.

Tabela 23. Termodinamičke karakteristike degradacije kompleksa na 299 K.

E_a^* ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	ΔH^* ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	ΔS^* ($\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\text{mol}^{-1}$)	ΔG^* ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	pK^*
51,68	49,19	40,70	37,02	6,47

Za veliki broj hemijskih reakcija (čiji poluživot traje desetak minuta ili nekoliko sati) energija aktiviranja se kreće u granicama od 50 do 100 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Presek prave sa ordinatom daje vrednost $\log k_0$. Kako se $\log k_0$ dobija ekstrapolacijom prave na nultu vrednost promenljive $1/T$, k_0 ima izuzetno visoku vrednost i ona se kreće uglavnom u granicama od 10^8 do 10^{15} . Kod nekih reakcija ta vrednost može biti znatno niža. Sa slike 72 može se videti da k_0 iznosi $2,7\cdot 10^6$. Iz prikazanih rezultata (tabela 23) vidi se da je i dobijena vrednost energije aktivacije u skladu sa literaturnim podacima. Za reakcije kod kojih građenju aktiviranog kompleksa prethodi raskidanje veza u molekulu polaznih supstanci (reaktanata), karakteristična je pozitivna vrednost entropije, a mehanizam koji opisuje takve reakcije naziva se disocijativni (Milić i Sovilj, 2000, str. 36, 43).

3.4.4. Primena kinetičko–spektrofotometrijske metode za određivanje Na-salicilata

Aplikativnost predložene metode ispitana je određivanjem sadržaja NaS u belom vinu (tabela 24) i humanom serumu (tabela 25). Uzorci su pripremani po procedurama opisanim u Eksperimentalnom delu. Dobijeni rezultati su validirani upoređivanjem sa HPLC (*British Pharmacopoeia, 2005, str 103*) rezultatima primenom testa nulte hipoteze za obe vrste uzoraka. Dobijeni hromatogrami standarda i uzorka seruma (slika 73) pokazali su poklapanje retencionog vremena za analiziranu aktivnu komponentu, NaS. U cilju kvantitativne analize, određena je integrisana površina za dati pik i sa kalibracionog dijagrama za dobijene vrednosti površine pikova izračunate su koncentracije NaS u ispitivanim uzorcima. Vrednosti F-testa i Studentovog t-testa pokazale su da nema značajnije razlike u rezultatima dobijenim kinetičko-spektrofotometrijskom i HPLC metodom za obe vrste uzoraka ($F_{\text{eksp.}} < F_{\text{tab.}}$ i $t_{\text{eksp.}} < t_{\text{tab.}}$).

Tabela 24. Tačnost i reproduktivnost određivanja* NaS u belom vinu** metodom standardnih dodataka.

Koncentracija NaS ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)		određena HPLC metodom ($\bar{x} \pm \text{SD}$)	RSD (%)	$\frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \cdot 100$ (%)	Recovery (kinetička metoda) (%)	F-test	t-test
dodata μ	određena kinetičkom metodom ($\bar{x} \pm \text{SD}$)						
4,97	4,05 \pm 0,24	4,37 \pm 0,22	5,6	-18,51	81,50	1,20	2,2
3,20	2,70 \pm 0,22	2,91 \pm 0,20	8,1	-15,62	84,38	1,21	1,58

(*) Legenda veličina i odgovarajući izrazi dati su uz tabelu 14 u poglavlju 3.2.3.

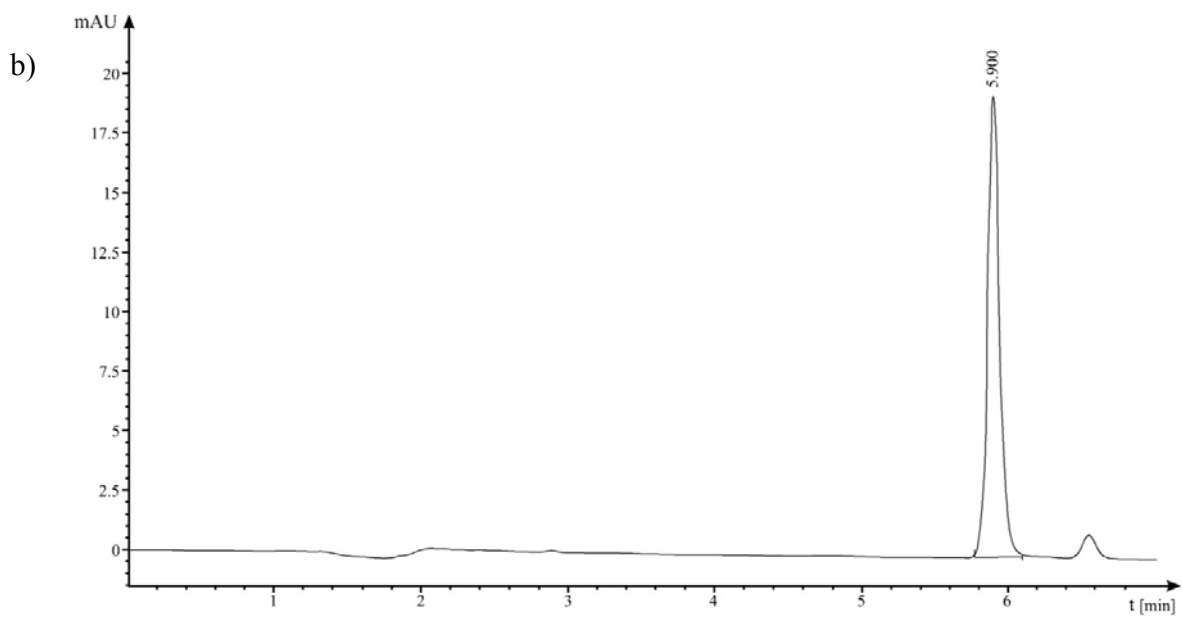
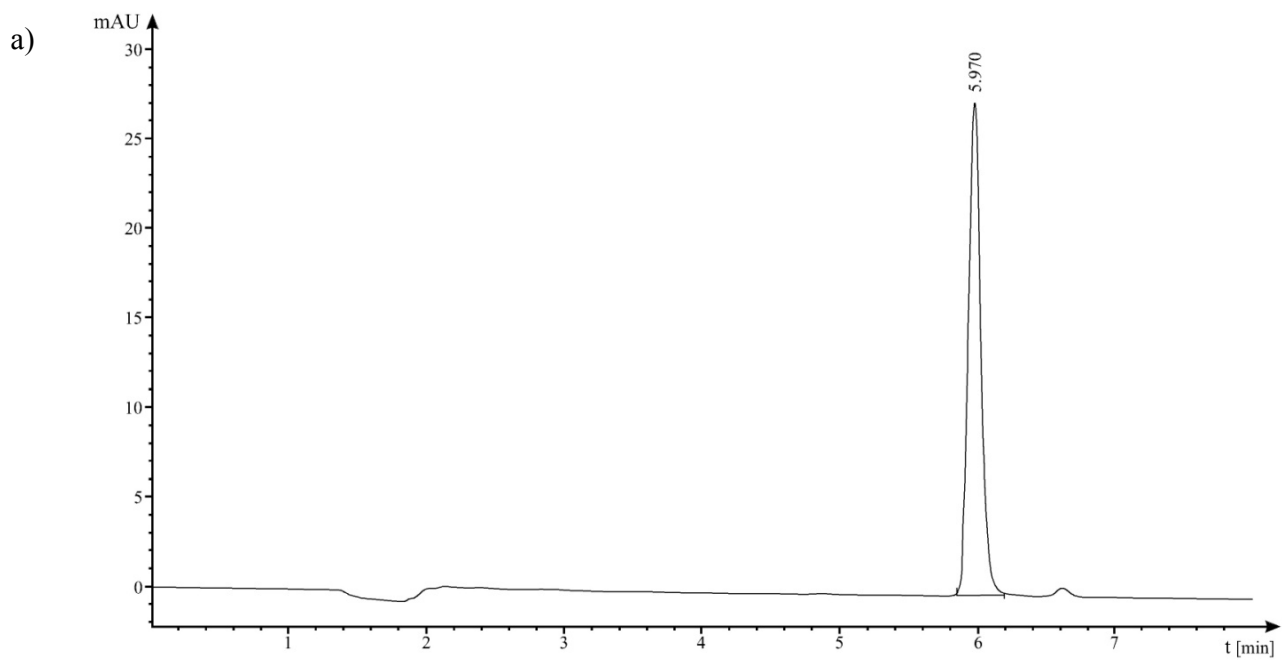
(**) Graševina, belo vino, A. D. Kruševac.

Tabela 25. Tačnost i reproduktivnost određivanja* NaS u humanom serumu** metodom standardnih dodataka.

Koncentracija NaS ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)		određena HPLC metodom ($\bar{x} \pm \text{SD}$)	RSD (%)	$\frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \cdot 100$ (%)	Recovery (kinetička metoda) (%)	F-test	t-test
dodata μ	određena kinetičkom metodom ($\bar{x} \pm \text{SD}$)						
4,97	4,46 \pm 0,09	4,55 \pm 0,07	2,02	-10,26	89,74	1,65	1,78
3,20	2,80 \pm 0,20	3,00 \pm 0,09	7,14	-12,50	87,50	4,94	2,14

(*) Legenda veličina i odgovarajući izrazi dati su uz tabelu 14 u poglavlju 3.2.3.

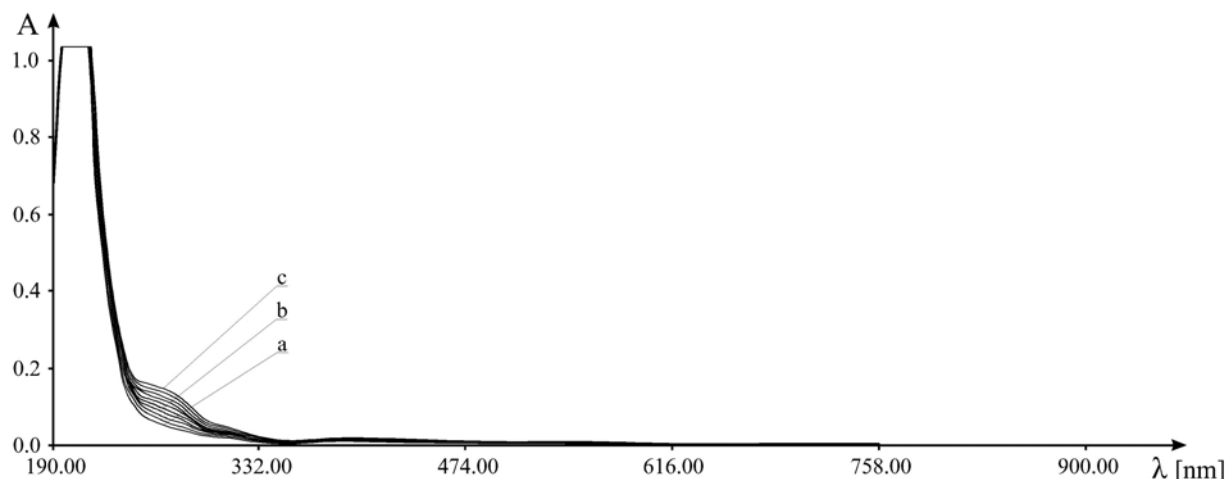
(**) Lyotrol N, humani kontrolni serum, bioMerieux®SA, Francuska.



Slike 73. HPLC hromatogrami: a) standardni rastvor NaS, $c = 4,97 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ i b) spajkovani humani serum, $c(\text{NaS}) = 4,97 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Kolona: Zorbax Eclipse Plus C18 ($5 \mu\text{m}$), dimenzija $250 \times 4,6 \text{ mm}$; $\lambda = 237 \text{ nm}$. Mobilna faza: fosforna kiselina, acetonitril i voda (2:400:600, v:v:v).

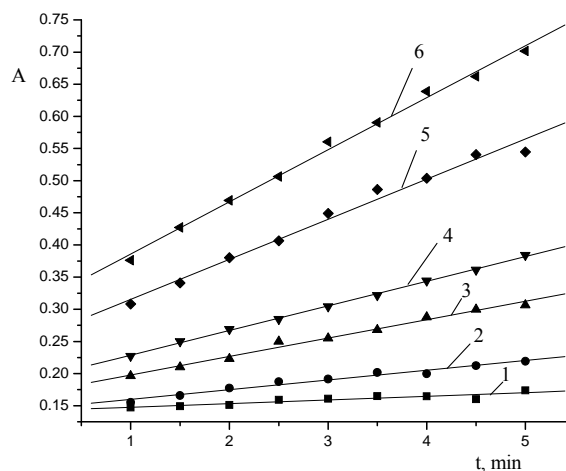
3.5. Kinetičko–spektrofotometrijsko određivanje ampicilina

Metoda za određivanje ampicilina (Amp) zasnovana je na reakciji građenja kompleksa između nikla i ampicilina u baznoj sredini i u prisustvu kalijum-hlorida, kao elektrolita za podešavanje jonske sile rastvora. Promena apsorpcionog spektra kompleksa Amp-Ni(II) sa vremenom prikazana je na slici 74.



Slika 74. Promena apsorpcionog spektra kompleksa Amp-Ni(II) sa vremenom, nakon: a) 1 min; b) 5,8 min i c) 11,8 min. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $c(\text{Ni}^{2+}) = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{Amp}) = 34,9 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$; $c(\text{NaOH}) = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{KCl}) = 1,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$.

Brzina reakcije građenja kompleksa u baznoj sredini praćena je spektrofotometrijski promenom apsorbance na 265 nm tokom 5 min, po isteku prve minute od inciranja reakcije. Dobijene zavisnosti $A = f(t)$ su za različite koncentracije Amp linearne u celom ispitivanom vremenskom intervalu (slika 75) što je omogućilo primenu diferencijalne varijante tangensne metode.

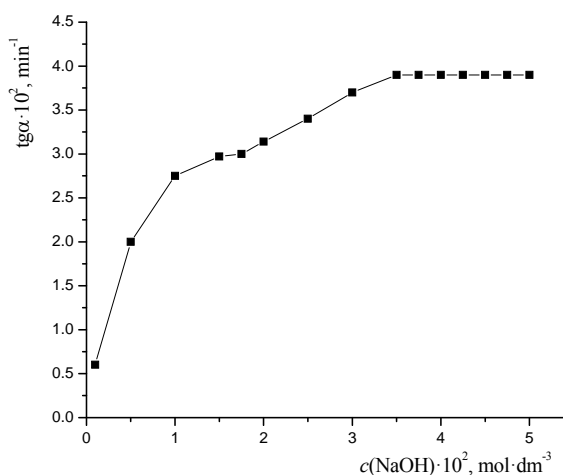


Slika 75. Promene apsorbance rastvora sa vremenom za različite koncentracije Amp: 1) $3,49 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, 2) $6,98 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, 3) $13,96 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, 4) $20,94 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, 5) $34,90 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ i 6) $48,86 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $c(\text{Ni}^{2+}) = 3,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $c(\text{NaOH}) = 4,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $c(\text{KCl}) = 1,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Da bi se našli optimalni uslovi odigravanja reakcije stvaranja kompleksa u cilju određivanja što nižih koncentracija ampicilina, praćena je brzina reakcije u zavisnosti od koncentracije svakog od učesnika u reakciji.

3.5.1. Određivanje optimalnih uslova odigravanja reakcije

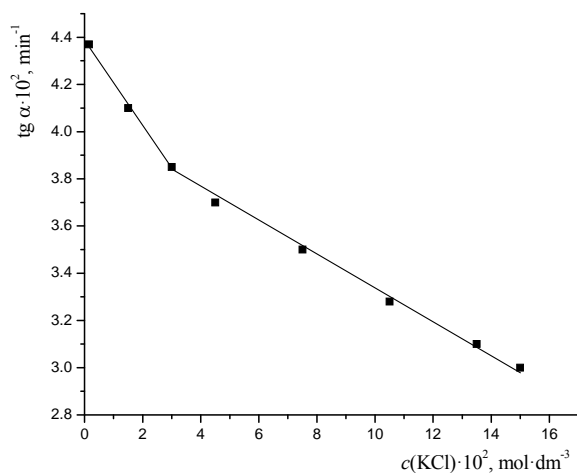
Uticaj promene koncentracije NaOH na brzinu ispitivane reakcije praćen je u intervalu $(0,1-5) \cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (slika 76).



Slika 76. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije NaOH. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $c(\text{Ni}^{2+}) = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $c(\text{Amp}) = 34,90 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$; $c(\text{KCl}) = 1,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Iz prikazane zavisnosti vidi se da brzina reakcije naglo raste sa povećanjem koncentracije NaOH do $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Sa daljim povećanjem koncentracije hidroksida do $3,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, brzina reakcije nastavlja da raste umereno. Nakon ove vrednosti brzina reakcije postaje nezavisna od daljeg povećanja koncentracije NaOH. Kao optimalna koncentracija NaOH, za dalji rad odabrana je vrednost od $4,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Reakcija je nultog reda u odnosu na koncentraciju hidroksida u intervalu $(3,5-5) \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

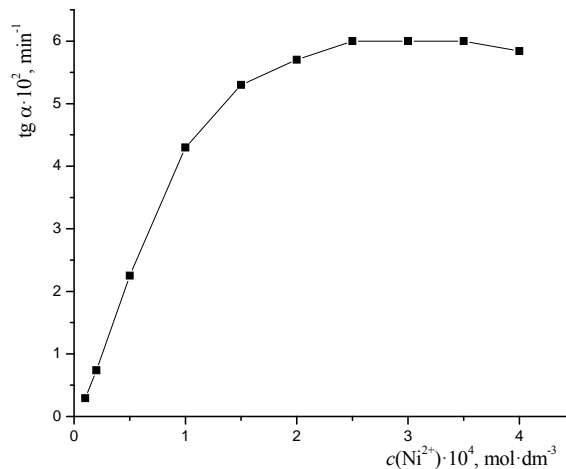
Uticaj jonske sile na brzinu reakcije praćen je promenom koncentracije KCl u intervalu $(0,15-15) \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (slika 77).



Slika 77. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije KCl. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $c(\text{Ni}^{2+}) = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{Amp}) = 34,90 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$; $c(\text{NaOH}) = 4 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$.

Brzina reakcije opada sa povećanjem koncentracije KCl u celom ispitivanom intervalu. Za dalji rad odabrana je koncentracija KCl od $1,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ kao optimalna vrednost. Reakcija je -1 reda u odnosu na koncentraciju KCl u celom ispitivanom intervalu.

Zavisnost brzine reakcije od koncentracije Ni(II) jona ispitivana je u intervalu $(0,1-4,0) \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (slika 78).



Slika 78. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije Ni(II). Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $c(\text{KCl}) = 1,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{Amp}) = 34,90 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$; $c(\text{NaOH}) = 4,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$.

Brzina reakcije raste sa povećanjem koncentracije jona nikla do vrednosti od $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. U intervalu koncentracije Ni(II) jona $(2,5-4,0) \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, brzina reakcije je konstantna i reakcija je nultog reda u odnosu na ovaj reaktant. Za dalji rad je odabrana koncentracija Ni(II) od $3,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Na osnovu prethodno dobijenih zavisnosti brzine reakcije od svakog reaktanta pojedinačno, kao i određivanog reda reakcije u odnosu na svaki reaktant pojedinačno, može se postaviti kinetička jednačina za ispitivani proces:

$$\frac{dc}{dt} = k \cdot c_{\text{KCl}}^{-1} \cdot c_{\text{Amp}} \quad (94)$$

za interval koncentracija:

$$\text{Ni(II)} = (2,5-4,0) \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$$

$$\text{NaOH} = (3,5-5) \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$$

$$\text{KCl} = (0,15-3,0) \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$$

gde je:

$$\frac{dc}{dt} \text{ – promena koncentracije indikatorske supstance,}$$

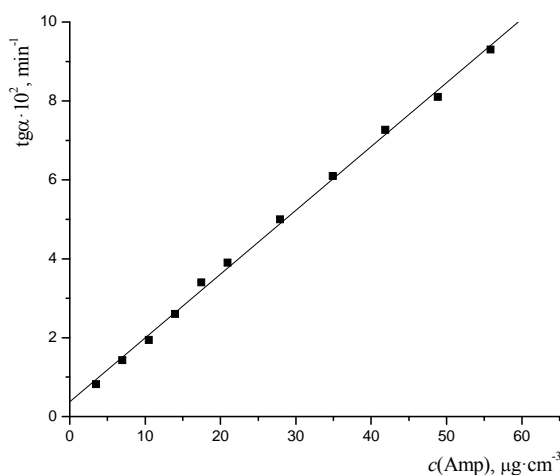
k – uslovna konstanta brzine reakcije.

3.5.2. Validacija analitičke metode za određivanje ampicilina

Validacija metode izvršena je određivanjem intervala linearnosti, limita detekcije, tačnosti, preciznosti i selektivnosti.

Linearnost

Uticaj ampicilina na brzinu reakcije praćen je pri prethodno odabranim optimalnim uslovima odigravanja reakcije: $c(\text{Ni}^{2+}) = 3,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{NaOH}) = 4,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{KCl}) = 1,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Dobijena je linearna zavisnost u intervalu koncentracija ampicilina od 3,49 do 55,84 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ (slika 79), koja se može koristiti za njegovo određivanje u rastvoru.



Slika 79. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije ampicilina. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $c(\text{Ni}^{2+}) = 3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{NaOH}) = 4 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{KCl}) = 1,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Kalibraciona prava može se prikazati sledećom jednačinom:

$$\text{tg}\alpha \cdot 10^2 = (0,3789 \pm 0,0765) + (0,1616 \pm 0,0025) \cdot c(\text{Amp}); \quad (95)$$
$$r = 0,9989; S_0 = 0,1388; n = 11$$

gde je:

$\text{tg}\alpha$ – nagib linearnog dela kinetičke krive u koordinatnom sistemu $A = f(t)$,
 $c(\text{Amp})$ – koncentracija ampicilina izražena u $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$,
 S_0 – standardna devijacija fitovanja.

Limit detekcije

Limit detekcije (LOD) određen je korišćenjem jednačina (76) i (77). Dobijene vrednosti su 2,83 i 1,84 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, respektivno.

Tačnost i reproduktivnost

Tačnost i reproduktivnost metode određene su za tri koncentracije sa kalibracione prave na osnovu rezultata iz pet merenja za svaku od izabranih koncentracija. Rezultati dobijeni statističkom obradom podataka prikazani su u tabeli 26.

Tabela 26. Tačnost i reproduktivnost određivanja* Amp.

Koncentracija Amp ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)		RSD (%)	$\frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \cdot 100$ (%)
odmerena μ	određena $\bar{x} \pm \text{SD}$		
3,49	3,08 \pm 0,24	7,79	-11,75
27,92	28,42 \pm 0,95	3,34	+1,79
55,84	55,03 \pm 1,76	3,20	-1,45

(*) Legenda veličina i odgovarajući izrazi dati su uz tabelu 9 u poglavlju 3.1.2.

Iz prikazanih rezultata vidi se da se relativna greška određivanja Amp ovom metodom kreće od 7,79 do 3,20 % za interval koncentracije Amp od 3,49 do 55,84 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$.

Selektivnost

U cilju utvrđivanja selektivnosti ove metode ispitan je uticaj nekih jona i organskih molekula na brzinu reakcije pri koncentraciji Amp od $8 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (27,92 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$). Koncentracija ispitivanih supstanci je varirana u odnosu na zadatu koncentraciju Amp sve dok nije nađena ona koncentracija koja ometa njegovo određivanje (tabela 27). Granica tolerancije data je kao odnos molarnih koncentracija strane komponente i Amp u ispitivanom rastvoru. Pri tome je uzeto da je granica tolerancije ona koncentracija strane supstance koja daje odstupanje do dve standardne devijacije koncentracije prilikom određivanja Amp (2s kriterijum) (Kirkbright, 1966).

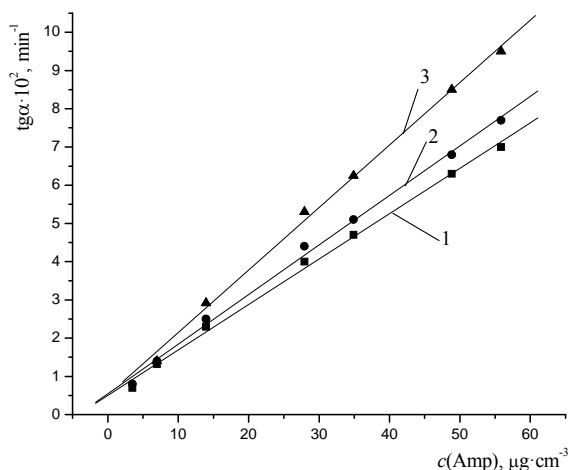
Tabela 27. Granica tolerancije stranih jona i molekula pri određivanju Amp.

Granica tolerancije c_x / c_{Amp}	Jon/molekul (x)
10^3	Li^+ , Ca^{2+} , F^-
10^2	CH_3COO^- , NO_3^- , I^-
10	alanin, metionin, lizin, arginin, fenilalanin, urea
1	manitol, glukoza, limunska kis., nikotinska kis., asparagin, Mg^{2+} , Sn^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Sr^{2+} , SO_4^{2-} , SO_3^{2-}
Interferiraju kod odnosa 1:1	sorbitol, fruktoza, laktoza, askorbinska kis., citrat, tiamin, histidin, serin, Al^{3+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$, HPO_4^{2-}

Joni Li^+ , Ca^{2+} i F^- u hiljadu puta većoj koncentraciji, kao i joni CH_3COO^- , NO_3^- i I^- u sto puta većoj koncentraciji od ampicilina, ne utiču na njegovo određivanje. Od ispitanih aminokiselina, alanin, metionin, lizin, arginin i fenilalanin, u desetostrukom višku, ne ometaju određivanje ampicilina. Asparagin, prisutan u odnosu 1:1 ne ometa određivanje Amp, kao i pojedini uobičajeni sastojci i eventualno prisutne primese tabletiranih i kapsuliranih lekova (glukoza, manitol, limunska kiselina). Isti efekat pokazuju i joni Mg^{2+} , Sn^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Sr^{2+} , SO_4^{2-} , SO_3^{2-} . Ometajući efekat histidina na brzinu reakcije iskorišćen je za razradu kinetičke metode za njegovo određivanje.

3.5.3. Termodinamičke karakteristike sistema

Brzina ispitivane reakcije praćena je pri odabranim optimalnim uslovima na četiri temperature: 19, 22, 25 i 28 °C. Grafičke zavisnosti brzine reakcije od koncentracije Amp na temperaturama 19, 22 i 28 °C prikazane su na slici 80, dok je ista zavisnost na temperaturi od 25 °C prikazana na slici 79.



Slika 80. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije ampicilina. Krive: 1) $t = 19,0$ °C, 2) $t = 22,0$ °C i 3) $t = 28,0$ °C. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $c(\text{Ni}^{2+}) = 3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{NaOH}) = 4 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{KCl}) = 1,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Kalibraciona prava na 19,0 °C može se prikazati sledećom jednačinom:

$$\begin{aligned} \operatorname{tg} \alpha \cdot 10^2 &= (0,5022 \pm 0,1035) + (0,1180 \pm 0,0031) \cdot c(\text{Amp}); \\ r &= 0,9983; S_0 = 0,1552; n = 7 \end{aligned} \quad (96)$$

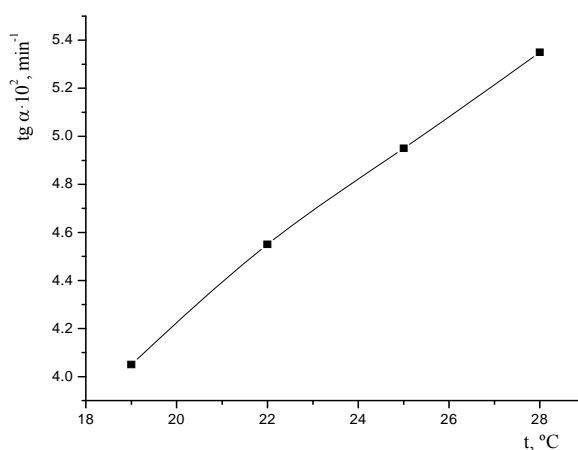
Kalibraciona prava na 22,0 °C može se prikazati sledećom jednačinom:

$$\begin{aligned} \operatorname{tg} \alpha \cdot 10^2 &= (0,54456 \pm 0,10841) + (0,12966 \pm 0,00326) \cdot c(\text{Amp}); \\ r &= 0,9984; S_0 = 0,1630; n = 7 \end{aligned} \quad (97)$$

Kalibraciona prava na 28,0 °C može se prikazati sledećom jednačinom:

$$\begin{aligned} \operatorname{tg} \alpha \cdot 10^2 &= (0,5120 \pm 0,1632) + (0,1634 \pm 0,0045) \cdot c(\text{Amp}); \\ r &= 0,9985; S_0 = 0,1941; n = 6 \end{aligned} \quad (98)$$

Na osnovu dobijenih rezultata predstavljen je grafik zavisnosti $\operatorname{tg} \alpha$ u funkciji od temperature (slika 81).



Slika 81. Zavisnost brzine reakcije od temperature. Početne koncentracije u rastvoru: $c(\text{Ni}^{2+}) = 3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{Amp}) = 27,92 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$; $c(\text{NaOH}) = 4 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{KCl}) = 1,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

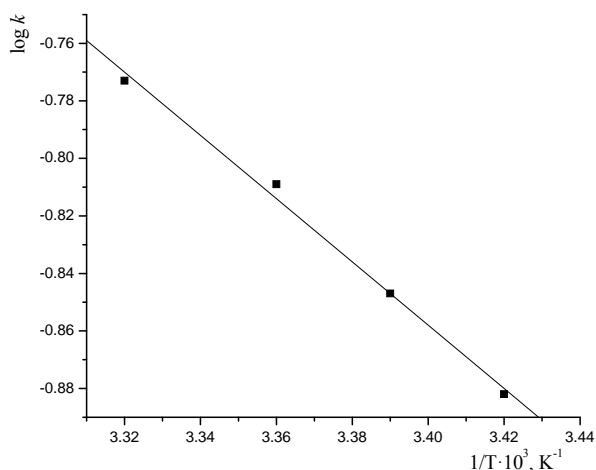
Uslovna konstanta brzine reakcije izračunata je na osnovu kinetičke jednačine (94) za četiri različite temperature (tabela 28).

Tabela 28. Uslovna konstanta brzine reakcije na različitim temperaturama.

$k \text{ (mol} \cdot \text{dm}^{-3})^{1-n} \text{ s}^{-1}$	T (K)
0,13	292
0,14	295
0,16	298
0,17	301

n – red reakcije

Termodinamički parametri reakcije određeni su na osnovu vrednosti nagiba prave prikazane na slici 82.



Slika 82. Zavisnost logaritma uslovne konstante brzine reakcije od recipročne vrednosti apsolutne temperature.

Iz nagiba ove prave izračunata je energija aktivacije primenom jednačine (89). Ostali termodinamički parametri: promena entalpije (ΔH^*), promena entropije (ΔS^*), promena slobodne energije (ΔG^*) i pK^* vrednost građenja kompleksa izračunati su primenom jednačina (90–93), tabela 29.

Tabela 29. Termodinamičke karakteristike stvaranja kompleksa na 298 K.

E_a^* ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	ΔH^* ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	ΔS^* ($\text{J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)	ΔG^* ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	pK^*
21,05	18,57	-197,94	77,56	13,60

Ukoliko je vrednost E_a^* manja, veći je faktor $e^{-E_a/RT}$, i obrnuto. Pošto se faktor učestanosti kod mnogih reakcija znatno ne menja, znači da E_a^* često određuje brzinu hemijskih reakcija na određenoj temperaturi: ukoliko je E_a^* veća, utoliko je, uglavnom, viša temperatura na kojoj brzina reakcije postaje znatna (Gleeson, 1970, str. 842). Dobijena vrednost za energiju aktivacije je dosta niža u odnosu na literaturni podatak ($50\text{--}100 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) što znači da bi brzina reakcije bila znatna i na nižim temperaturama.

Dobijena vrednost za promenu entalpije potvrđuje da je reakcija endotermna, ali se formiranje aktiviranog kompleksa odvija uz minimalnu apsorpciju toplote po molu supstance koja učestvuje u reakciji. Odgovor za dosta niske vrednosti E_a^* i ΔH^* leži u prirodi i reaktivnosti molekula Amp i jona nikla.

Velika negativna vrednost promene entropije aktivacije potvrđuje da se radi o asocijativnom mehanizmu reakcije i o većoj uređenosti aktiviranog kompleksa. I pored male promene entalpije aktiviranja, reakcija ne teče suviše brzo i može se koristiti za kinetičko određivanje.

3.5.4. Primena kinetičko–spektrofotometrijske metode za određivanje ampilina

Aplikativnost predložene metode ispitana je određivanjem sadržaja Amp u farmaceutskim preparatima (tabela 30) i humanom urinu (tabela 31). Uzorci su pripremani po procedurama opisanim u Eksperimentalnom delu. Dobijeni rezultati su validirani upoređivanjem sa HPLC (*Jugoslovenska farmakopeja 2000, str. 42*) rezultatima primenom testa nulte hipoteze za obe vrste uzoraka. Hromatogrami određivanja Amp u farmaceutskim preparatima dati su na slici 83. Dobijeni hromatogrami standarda i uzoraka pokazali su poklapanje retencionih vremena za analiziranu aktivnu komponentu, Amp. U cilju kvantitativne analize, određena je integrisana površina za dati pik i sa kalibracionog dijagrama za dobijene vrednosti površine pikova izračunate su koncentracije Amp u ispitivanim uzorcima. Vrednosti F-testa i Studentovog t-testa pokazale su da nema značajnije razlike u rezultatima dobijenim kinetičko–spektrofotometrijskom i HPLC metodom za sve uzorke ($F_{\text{eksp.}} < F_{\text{tab.}}$ i $t_{\text{eksp.}} < t_{\text{tab.}}$).

Tabela 30. Tačnost i reproduktivnost određivanja* Amp u farmaceutskim preparatima.

Koncentracija Amp ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)			RSD (%)	$\frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \cdot 100$ (%)	Recovery (kinetička metoda) (%)	F-test	t-test
odmerena μ	određena kinetičkom metodom ($\bar{x} \pm \text{SD}$)	određena HPLC metodom ($\bar{x} \pm \text{SD}$)					
20,94 ^{a/}	22,09 \pm 1,10	20,83 \pm 0,59	4,98	+5,49	105,49	3,47	2,26
20,94 ^{b/}	21,42 \pm 1,14	20,75 \pm 0,65	5,32	+2,29	102,29	3,08	1,14
10,47 ^{c/}	9,66 \pm 0,58	10,13 \pm 0,25	6,00	-7,74	92,26	5,38	1,65

(*) Legenda veličina i odgovarajući izrazi dati su uz tabelu 14 u poglavlju 3.2.3.

^{a/} *Pentrexyl*[®], capsule, 500 mg ampilina, Galenika, a. d., Beograd, Srbija,

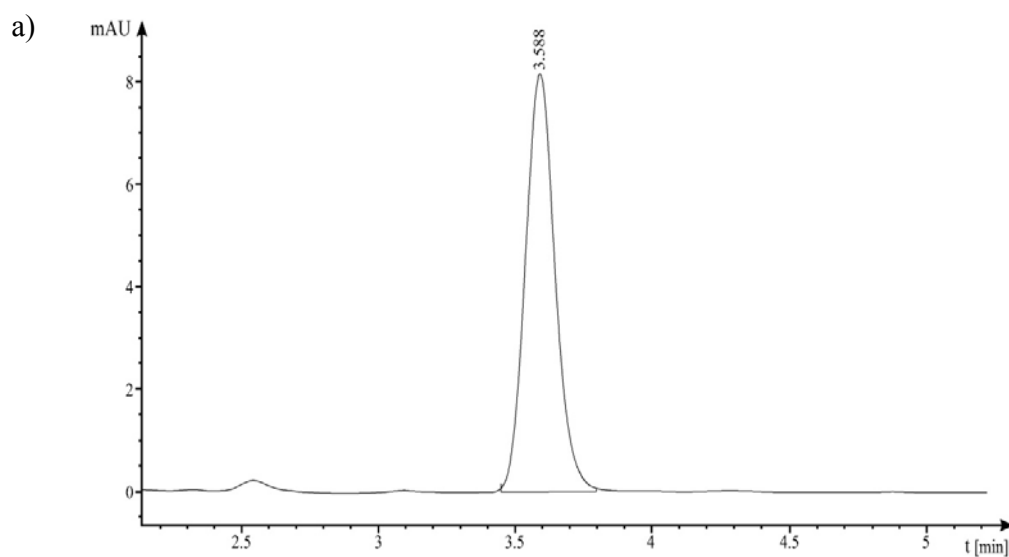
^{b/} *Ampicilin*, capsule, 500 mg ampilina, Panfarma, d. o. o., Beograd, Srbija,

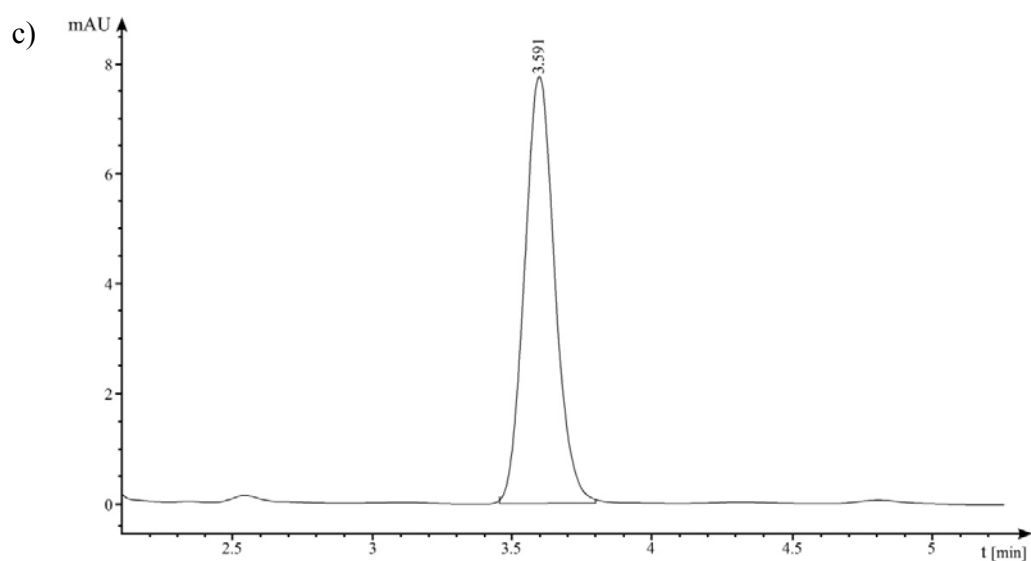
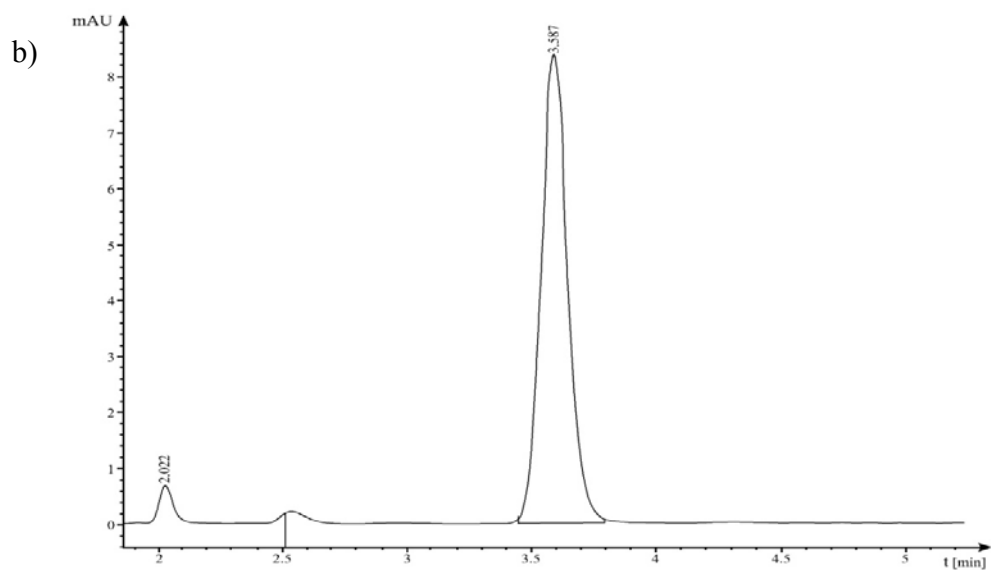
^{c/} *Pentrexyl*[®], prašak za oralnu suspenziju, 250 mg ampilina/5 cm³, Galenika, a. d., Beograd, Srbija.

Tabela 31. Tačnost i reproduktivnost određivanja* Amp u urinu metodom standardnog dodatka.

Koncentracija Amp ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)		RSD (%)	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ (%)	Recovery (kinetička metoda) (%)	F-test	t-test
dodata μ	određena kinetičkom metodom ($\bar{x} \pm \text{SD}$)					
10,47	9,02 \pm 0,85	9,42	-13,85	86,15	3,91	2,24
27,92	26,12 \pm 1,23	4,71	-6,44	93,56	3,00	2,10

(*) Legenda veličina i odgovarajući izrazi dati su uz tabelu 14 u poglavlju 3.2.3.

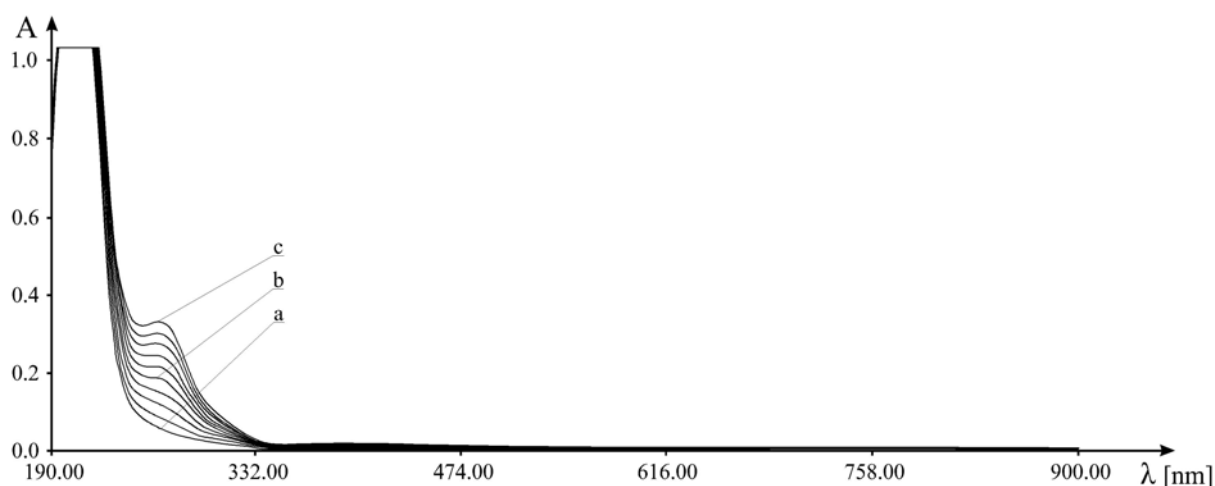




Slika 83. HPLC Hromatogrami: a) ampicilin kapsula ($20,94 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$); b) pentrexyl kapsula ($20,94 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) i c) pentrexyl sirup ($20,94 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$). Kolona: Zorbax Eclipse Plus C18 ($5 \mu\text{m}$), dimenzija $250 \times 4,6 \text{ mm}$; $\lambda = 254 \text{ nm}$. Mobilna faza: **A**($0,25 \text{ cm}^3$ glacijalne sirćetne kiseline, 25 cm^3 natrijum-dihidrogenfosfata, $c = 0,2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, 25 cm^3 acetonitrila i vode do ukupne zapremine od 500 cm^3) i **B**($0,25 \text{ cm}^3$ glacijalne sirćetne kiseline, 25 cm^3 natrijum-dihidrogenfosfata, $c = 0,2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, 200 cm^3 acetonitrila i vode do ukupne zapremine od 500 cm^3).

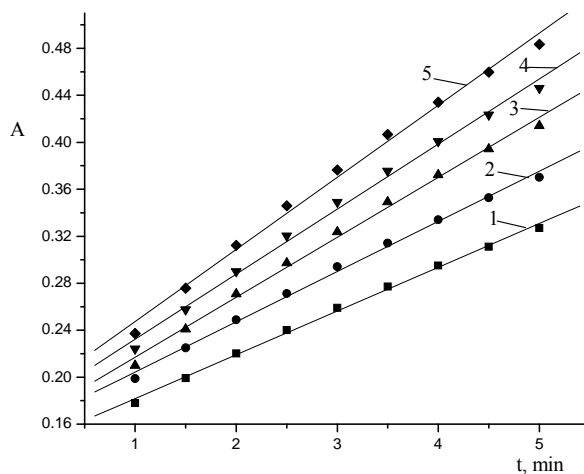
3.6. Kinetičko–spektrofotometrijsko određivanje histidina

Metoda za određivanje histidina (His) zasnovana je na njegovom uticaju da povećava brzinu reakcije građenja kompleksa između nikla i ampicilina u baznoj sredini i u prisustvu kalijum-hlorida, kao elektrolita za podešavanje jonske sile rastvora. Promena apsorpcionog spektra kompleksa Amp-Ni(II) u prisustvu His sa vremenom prikazana je na slici 84.



Slika 84. Promena apsorpcionog spektra kompleksa Amp-Ni(II) u prisustvu His sa vremenom, nakon: a) 1 min; b) 5,8 min i c) 11,8 min. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $c(\text{Ni}^{2+}) = 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{Amp}) = 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{His}) = 15,52 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$; $c(\text{NaOH}) = 1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{KCl}) = 1,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Sa prikazanih spektara (slike 74 i 84) se vidi da prisustvo histidina pri datoj koncentraciji znatno povećava brzinu reakcije između Ni(II) i Amp u baznoj sredini, što je dalo mogućnost za razradu kinetičko–spektrofotometrijske metode za određivanje histidina. Brzina reakcije praćena je spektrofotometrijski merenjem promene apsorbanca na 265 nm u toku 5 min, 60 s nakon iniciranja reakcije. Dobijene zavisnosti $A = f(t)$ su za različite koncentracije His linearne u celom ispitivanom vremenskom intervalu (slika 85) što je omogućilo primenu diferencijalne varijante tangensne metode.

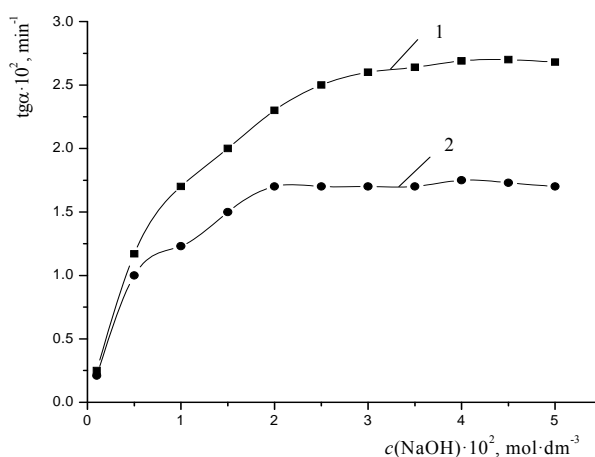


Slika 85. Promena apsorbance rastvora sa vremenom za različite koncentracije His: 1) $1,55 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, 2) $3,10 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, 3) $6,20 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, 4) $7,75 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ i 5) $10,85 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $c(\text{Ni}^{2+}) = 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $c(\text{NaOH}) = 3,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $c(\text{KCl}) = 7,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $c(\text{Amp}) = 8 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Da bi se odredile što niže koncentracije His, praćene su promene brzine osnovne (bez His) i ispitivane (sa His) reakcije u zavisnosti od koncentracije svih učesnika u reakciji.

3.6.1. Određivanje optimalnih uslova odigravanja reakcije

Uticaj NaOH na brzine reakcija praćen je u intervalu koncentracije $(0,1-5,0) \cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (slika 86).

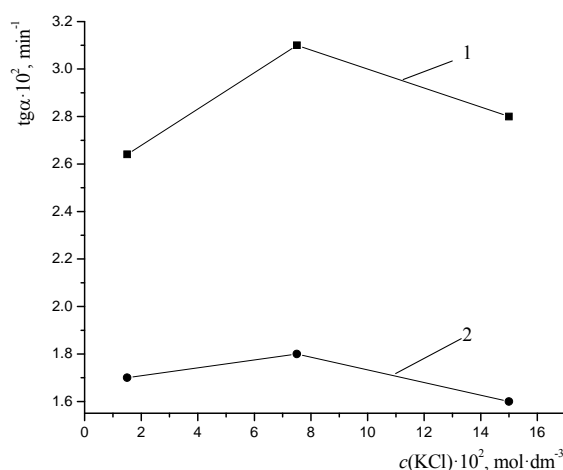


Slika 86. Zavisnost brzine ispitivane (1) i osnovne (2) reakcije od koncentracije NaOH. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $c(\text{Ni}^{2+}) = 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $c(\text{Amp}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $c(\text{KCl}) = 1,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $c(\text{His}) = 1,55 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

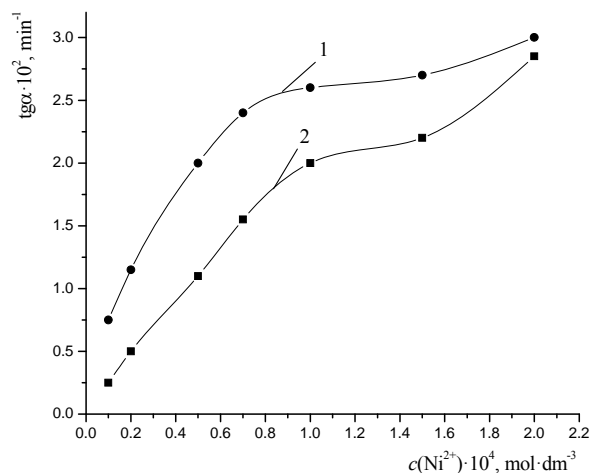
Sa slike se vidi da NaOH u intervalu koncentracije $(0,1-2,0) \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ značajno povećava brzine reakcija, dok u opsegu $(2,0-5,0) \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ nema uticaja na brzinu osnovne reakcije, te je nultog reda u odnosu na koncentraciju NaOH u tom opsegu koncentracija. Brzina ispitivane reakcije se praktično ne menja u opsegu koncentracija hidroksida od $(3,0-5,0) \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ i ona je za taj opseg koncentracija NaOH nultog reda u odnosu na NaOH. Dalja merenja su vršena pri koncentraciji NaOH od $3,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Zavisnost brzine reakcija od koncentracije KCl prikazana je na slici 87. Povećanje koncentracije ovog reaktanta jače utiče na povećanje brzine ispitivane reakcije. Najveća razlika u brzinama ovih reakcija je pri koncentraciji KCl od $7,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ i ona je korišćena u daljem radu. I ispitivana i osnovna reakcija su prvog reda u odnosu na koncentraciju KCl u intervalu koncentracije KCl $(1,5-7,5) \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Uticaj koncentracije Ni(II) jona na brzinu osnovne i ispitivane reakcije prikazan je na slici 88. Sa slike se vidi da brzine reakcija rastu sa povećanjem koncentracije ovog jona od $(0,1-1,0) \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Dalje povećanje koncentracije metalnog jona do $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ nema efekta na brzine odigravanja reakcija. Vrednosti koncentracija veće od ove iznova povećavaju brzine reakcija, ali ne u istoj meri, tako da razlika u brzinama postaje neznatna. Za dalji rad je odabrana koncentracija Ni(II) jona od $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. U opsegu koncentracije Ni(II) jona $(0,1-1,0) \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ obe reakcije su prvog reda u odnosu na koncentraciju Ni(II).

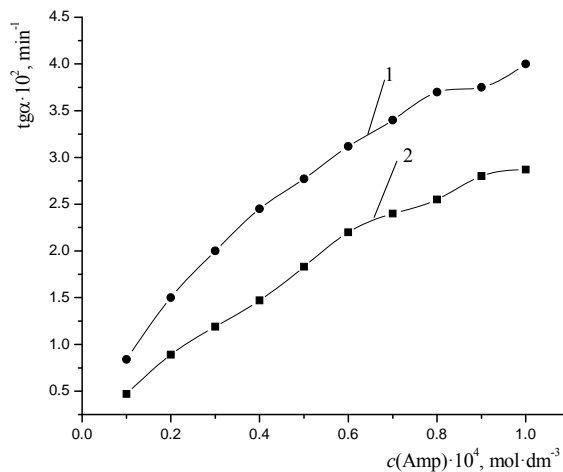


Slika 87. Zavisnost brzine ispitivane (1) i osnovne (2) reakcije od koncentracije KCl. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $c(\text{Ni}^{2+}) = 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{NaOH}) = 3,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{Amp}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{His}) = 1,55 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$; $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$.



Slika 88. Zavisnost brzine ispitivane (1) i osnovne (2) reakcije od koncentracije Ni(II). Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $c(\text{NaOH}) = 3,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{Amp}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{KCl}) = 7,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{His}) = 1,55 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$; $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$.

Na slici 89 prikazana je zavisnost brzine ispitivane i osnovne reakcije od koncentracije ampicilina. Brzine reakcija su približno linearne funkcije koncentracije ampicilina i obe su prvog reda u odnosu na koncentraciju ampicilina. Koncentracija ampicilina od $8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ odabrana je kao optimalna, jer se pri toj vrednosti javlja najveća razlika u brzinama reakcija.



Slika 89. Zavisnost brzine ispitivane (1) i osnovne (2) reakcije od koncentracije Amp. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $c(\text{Ni}^{2+}) = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{NaOH}) = 3,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{KCl}) = 7,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{His}) = 1,55 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$; $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$.

Na osnovu prethodno dobijenih zavisnosti brzine reakcije od koncentracije svakog reaktanta pojedinačno, kao i određivanja reda reakcije u odnosu na svaki reaktant pojedinačno, mogu se postaviti kinetičke jednačine:

osnovna reakcija

$$\frac{dc}{dt} = k_1 \cdot c_{\text{Ni}^{2+}} \cdot c_{\text{KCl}} \cdot c_{\text{Amp}} \quad (99)$$

za interval koncentracija:

$$\text{Ni(II)} = (0,1-1,0) \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$$

$$\text{NaOH} = (2,0-5) \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$$

$$\text{KCl} = (1,5-7,5) \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$$

$$\text{Amp} = (0,1-0,8) \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$$

ispitivana reakcija

$$\frac{dc}{dt} = k_2 \cdot c_{\text{Ni}^{2+}} \cdot c_{\text{KCl}} \cdot c_{\text{Amp}} \cdot c_{\text{His}} \quad (100)$$

za interval koncentracija:

$$\text{Ni(II)} = (0,1-1,0) \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$$

$$\text{NaOH} = (3,0-5,0) \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$$

$$\text{KCl} = (1,5-7,5) \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$$

$$\text{Amp} = (0,1-0,8) \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$$

gde je:

$\frac{dc}{dt}$ – promena koncentracije indikatorske supstance,

k_1 – uslovna konstanta brzine osnovne reakcije,

k_2 - uslovna konstanta brzine ispitivane reakcije.

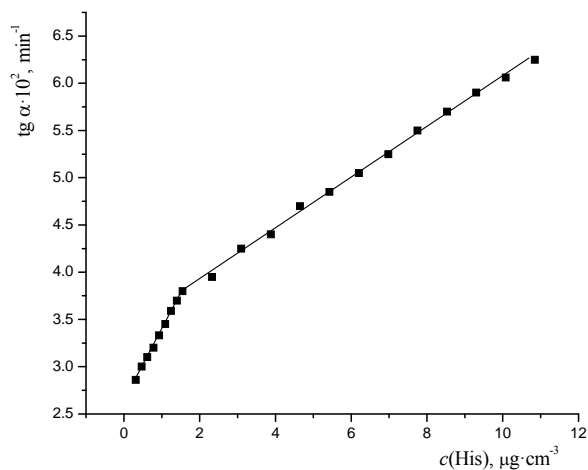
3.6.2. Validacija analitičke metode za određivanje histidina

Validacija metode izvršena je određivanjem intervala linearnosti, limita detekcije, tačnosti, preciznosti i selektivnosti.

Linearnost

Uticaj histidina u intervalu od 0,31 do 10,85 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ na brzinu reakcije (slika 90) praćen je pri prethodno odabranim optimalnim uslovima odigravanja reakcije: $c(\text{Ni}^{2+}) = 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$;

$c(\text{NaOH}) = 3,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{KCl}) = 7,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{Amp}) = 8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

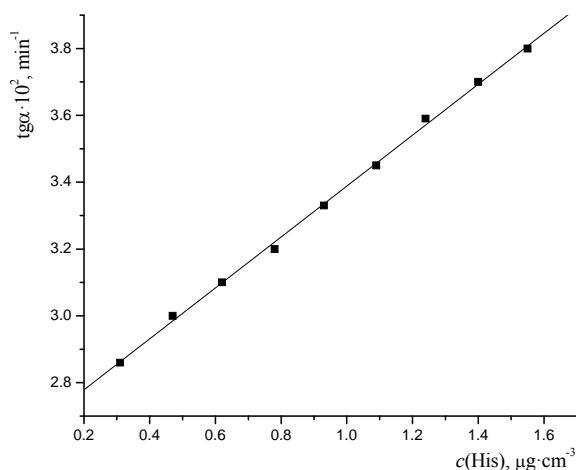


Slika 90. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije His. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $c(\text{Ni}^{2+}) = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{NaOH}) = 3,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{KCl}) = 7,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{Amp}) = 8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Sa prikazane slike se vidi da se kalibraciona prava sastoji iz dva linearna dela i da je tačka preloma pri koncentraciji histidina od $1,55 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$. Kalibraciona prava za opseg koncentracije His u intervalu od $0,31$ do $1,55 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ (slika 91) može se prikazati jednačinom:

$$\text{tg} \alpha \cdot 10^2 = (2,6260 \pm 0,0110) + (0,7624 \pm 0,0011) \cdot c(\text{His}); \quad (101)$$

$$r = 0,9993; S_0 = 0,0131; n = 9$$



Slika 91. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije His. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $c(\text{Ni}^{2+}) = 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{NaOH}) = 3,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{KCl}) = 7,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{Amp}) = 8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Kalibraciona prava za koncentraciju His u intervalu od 1,55 do 10,85 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ (slika 92) data je jednačinom:

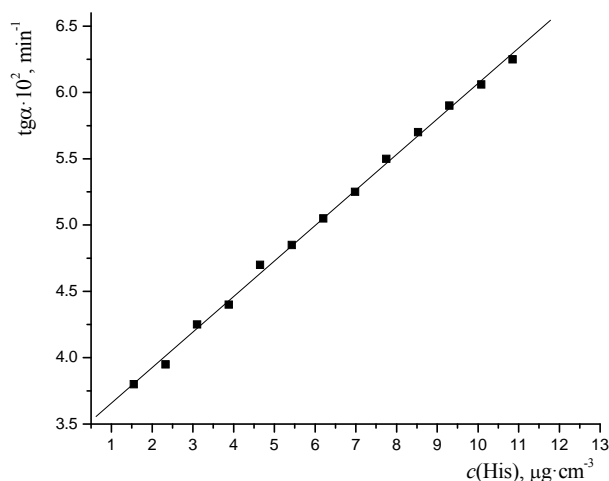
$$\begin{aligned} \text{tg}\alpha \cdot 10^2 &= (3,3908 \pm 0,0245) + (0,2676 \pm 0,0036) \cdot c(\text{His}); \\ r &= 0,9990; S_0 = 0,0373; n = 13 \end{aligned} \quad (102)$$

gde je:

$\text{tg}\alpha$ – nagib linearnog dela kinetičke krive u koordinatnom sistemu $A = f(t)$,

$c(\text{His})$ – koncentracija histidina izražena u $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ i

S_0 – standardna devijacija fitovanja.



Slika 92. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije His. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $c(\text{Ni}^{2+}) = 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $c(\text{NaOH}) = 3,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $c(\text{KCl}) = 7,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $c(\text{Amp}) = 8 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Limit detekcije

Limit detekcije (LOD) određen je korišćenjem jednačina (76) i (77). Dobijene vrednosti su $0,05 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ i $0,04 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, respektivno.

Tačnost i reproduktivnost

Tačnost i reproduktivnost metode određene su za tri koncentracije sa kalibracione prave sa slike 92 na osnovu rezultata iz pet merenja za svaku od izabranih koncentracija. Rezultati dobijeni statističkom obradom podataka prikazani su u tabeli 32.

Tabela 32. Tačnost i reproduktivnost određivanja* His.

Koncentracija His ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)		RSD (%)	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ (%)
odmerena μ	određena $\bar{x} \pm \text{SD}$		
1,55	1,49 \pm 0,12	8,05	-3,87
6,20	6,19 \pm 0,20	3,23	-0,16
10,85	10,42 \pm 0,21	2,02	-3,96

(*) Legenda veličina i odgovarajući izrazi dati su uz tabelu 9 u poglavlju 3.1.2.

Iz prikazanih rezultata vidi se da je relativna greška određivanja His ovom metodom od 8,05 do 2,02 % za interval koncentracije His od 1,55 do 10,85 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$.

Selektivnost

U cilju utvrđivanja selektivnosti ove metode ispitan je uticaj nekih jona i organskih molekula na brzinu katalitičke reakcije koju daje koncentracija His od $3\cdot 10^{-5}$ mol $\cdot\text{dm}^{-3}$ (4,65 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$). Koncentracija ispitivanih supstanci je varirana u odnosu na zadatu koncentraciju His sve dok nije nađena ona koncentracija koja ometa njegovo određivanje (tabela 33). Granica tolerancije data je kao odnos molarnih koncentracija strane komponente i His u ispitivanom rastvoru. Pri tome je uzeto da je granica tolerancije ona koncentracija strane supstance koja daje odstupanje do dve standardne devijacije koncentracije prilikom određivanja His (2s kriterijum) (Kirkbright, 1966).

Tabela 33. Granica tolerancije stranih jona i molekula pri određivanju His.

Granica tolerancije c_x/c_{His}	Jon/molekul (x)
10^3	Li ⁺ , urea
10^2	glukoza
10	Ba ²⁺ , Pb ²⁺ , Sn ²⁺ , As ³⁺ , nikotinska kis., CH ₃ COO ⁻
1	salicilna kis., sorbitol, manitol, arginin, metionin, serin, lizin, Mg ²⁺ , Zn ²⁺ , Ca ²⁺ , Cd ²⁺ , F ⁻ , C ₂ O ₄ ²⁻ , SO ₄ ²⁻
Interferiraju kod odnosa 1:1	laktoza, limunska kis., alanin, fenilalanin, triptofan, asparagin, Al ³⁺ , Hg ²⁺ , As ⁵⁺ , Fe ³⁺ , Co ²⁺ , Cu ²⁺ , NO ₃ ⁻ , HPO ₄ ²⁻

Jon Li⁺ i molekul uree u hiljadu puta većoj koncentraciji, kao i molekul glukoze u sto puta većoj koncentraciji od histidina, ne utiču na njegovo određivanje. Joni Ba²⁺, Sn²⁺, Pb²⁺, As³⁺, CH₃COO⁻, kao i nikotinska kiselina, ne utiču na brzinu reakcije kada su prisutni u desetostrukom višku. Od ispitanih aminokiselina, metionin, serin, lizin i arginin u koncentraciji $3\cdot 10^{-5}$ mol $\cdot\text{dm}^{-3}$ ne ometaju određivanje histidina, kao i salicilna kiselina i pojedini uobičajeni sastojci i

eventualno prisutne primese tabletiranih i kapsuliranih preparata (sorbitol, manitol). Isti efekat pokazuju i joni Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , F^- , $C_2O_4^{2-}$, SO_4^{2-} . Ostali ispitivani molekuli i joni interferiraju u odnosu 1:1.

3.6.3. Termodinamičke karakteristike sistema

Brzina ispitivane reakcije praćena je pri odabranim optimalnim uslovima na tri temperature: 20, 25 i 30 °C. Grafičke zavisnosti brzine reakcije od koncentracije His na temperaturama 20 i 30 °C prikazane su na slici 93, dok je ista zavisnost na temperaturi od 25 °C prikazana na slici 92.

Kalibraciona prava na 20,0 °C može se prikazati sledećom jednačinom:

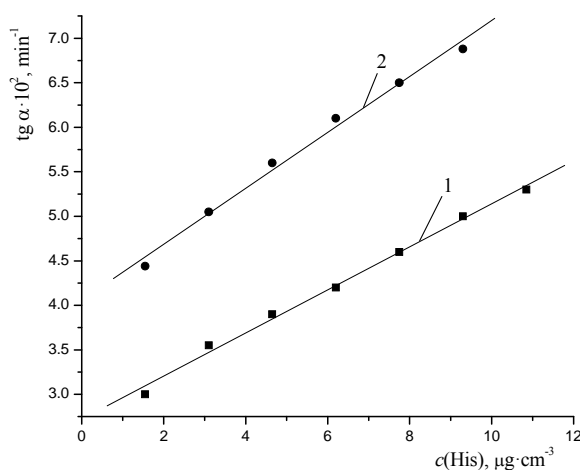
$$\begin{aligned} \text{tg}\alpha \cdot 10^2 &= (2,7214 \pm 0,0558) + (0,2419 \pm 0,0081) \cdot c(\text{His}); \\ r &= 0,9972; S_0 = 0,0660, n = 7 \end{aligned} \quad (103)$$

i važi za interval koncentracija His od 1,55 do 10,85 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$.

Kalibraciona prava na 30,0 °C može se prikazati sledećom jednačinom:

$$\begin{aligned} \text{tg}\alpha \cdot 10^2 &= (4,0567 \pm 0,0893) + (0,3143 \pm 0,0148) \cdot c(\text{His}); \\ r &= 0,9956; S_0 = 0,0960, n = 6 \end{aligned} \quad (104)$$

i važi za interval koncentracija His od 1,55 do 9,30 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$.



Slika 93. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije His. Krive: 1) $t = 20,0$ °C i 2) $t = 30,0$ °C. Početne koncentracije reaktanata u rastvoru: $c(\text{Ni}^{2+}) = 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{NaOH}) = 3,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{KCl}) = 7,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{Amp}) = 8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

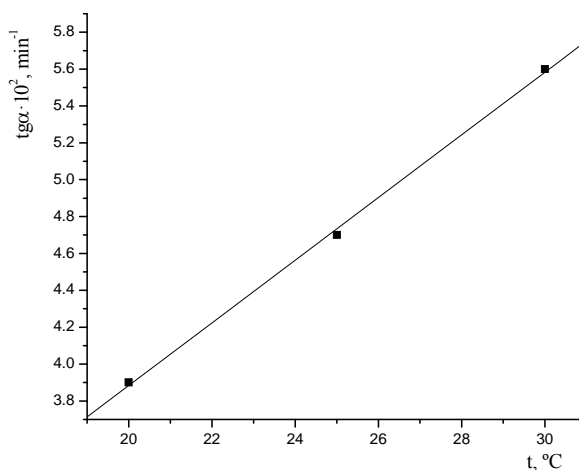
Uslovna konstanta brzine reakcije izračunata je na osnovu kinetičke jednačine (100) za tri različite temperature (tabela 34).

Tabela 34. Uslovna konstanta brzine reakcije na različitim temperaturama.

$k \cdot 10^{-10} \text{ (mol} \cdot \text{dm}^{-3})^{1-n} \text{ s}^{-1}$	T (K)
3,61	293
4,35	298
5,20	303

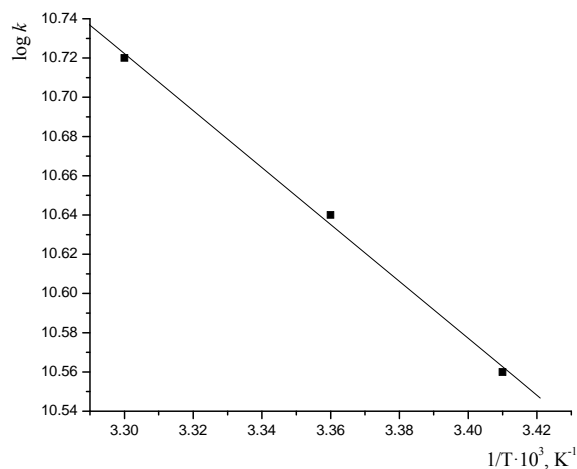
n – red reakcije

Na osnovu dobijenih rezultata predstavljen je grafik zavisnosti t_{α} u funkciji od temperature (slika 94).



Slika 94. Zavisnost brzine reakcije od temperature. Početne koncentracije u rastvoru: $c(\text{Ni}^{2+}) = 3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{Amp}) = 8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{NaOH}) = 4,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{KCl}) = 1,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{His}) = 4,65 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$.

Termodinamički parametri reakcije određeni su na osnovu vrednosti nagiba prave prikazane na slici 95.



Slika 95. Zavisnost logaritma uslovne konstante brzine reakcije od recipročne vrednosti apsolutne temperature.

Iz nagiba ove prave izračunata je energija aktivacije primenom jednačine (89). Ostali termodinamički parametri: promena entalpije (ΔH^*), promena entropije (ΔS^*), promena slobodne energije (ΔG^*) i pK^* vrednost građenja kompleksa izračunati su primenom jednačina (90–93). Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 35.

Tabela 35. Termodinamičke karakteristike stvaranja kompleksa na 298 K.

E_a^* ($kJ \cdot mol^{-1}$)	ΔH^* ($kJ \cdot mol^{-1}$)	ΔS^* ($J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}$)	ΔG^* ($kJ \cdot mol^{-1}$)	pK^*
27,75	25,27	43,57	12,29	2,15

Energija aktivacije je često koristan podatak u aproksimaciji brzine hemijske reakcije, međutim brzinu hemijske reakcije definiše promena slobodne energije aktivacije i delimično promena entropije aktiviranja. Katalizator je supstanca koja smanjuje energiju aktivacije neke promene koja se dešava uz smanjenje slobodne energije, ali prema teoriji apsolutnih brzina reakcije, tačnije je ako se kaže da katalizator smanjuje slobodnu energiju aktivacije. Kod nekih katalitičkih reakcija dolazi do povećanja promene entalpije aktivacije, ali odgovarajuće povećanje proizvoda temperature i promene entropije aktivacije potpuno kompenzuje tu promenu (*Gleston, 1970, str. 872; Obradović et al., 1987, str. 169*).

Upoređivanjem termodinamičkih karakteristika prikazanih u tabelama 29 i 35 može se pretpostaviti da His ima ulogu katalizatora u reakciji između Amp i Ni(II) u baznoj sredini na osnovu povećanja promene entropije i smanjenja slobodne energije aktivacije.

IZVOD

Na osnovu prikazanih rezultata proučavanja kinetike ispitivanih reakcionih sistema, a u cilju određivanja mikrokoličina uree, streptomocina, neomicina, natrijum-salicilata, ampicilina i histidina, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Dobijeni eksperimentalni rezultati opisuju karakteristike predloženih kinetičko-spektrofotometrijskih metoda za određivanje navedenih supstanci (tabela 36).

Tabela 36. Karakteristike razrađenih kinetičko-spektrofotometrijskih metoda za određivanje ispitivanih supstanci.

Supstanca	$t \pm 0,1$ (°C)	λ_{\max} (nm)	Interval linearnosti ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)	LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)	$\frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \cdot 100$ (%)	Uzorak
Urea	25,0	700	0,25 – 2,5	0,12	–4,00 do –0,80	Krema
Streptomicin- sulfat	25,0	700	18,2 – 182	11,75	8,85 do –3,63	Prašak za injekcije, urin
Neomicin	25,0	700	15,37 – 46,12 76,88 – 153,7	3,19	–2,47 do –4,55 –4,25 do –0,75	Kapi za oči
Na-salicilat	26,0	525	0,93 – 9,3	0,67	–5,38 do 0,65	Serum, vino
Ampicilin	25,0	265	3,49 – 55,84	2,58	–11,75 do –1,45	Kapsule, sirup, urin
Histidin	25,0	265	0,31 – 1,55 1,55 – 10,85	0,05	/ –3,87 do –3,96	/

Metode za određivanje uree, streptomicin-sulfata i neomicina zasnovane su na uticaju navedenih antibiotika na kolorimetrijsko određivanje uree u rastvoru i na rezultatima analize kinetike reakcionog sistema modifikovane Berthelot-ove metode u prisustvu i bez prisustva navedenih supstanci. Dobijeni rezultati su iskorišćeni za razradu kinetičko-spektrofotometrijskih metoda za određivanje navedenih komponenti.

Kinetičko-spektrofotometrijska metoda za određivanje natrijum-salicilata zasnovana je na praćenju brzine degradacije kompleksa Fe(III)-salicilat slobodnim radikalima u acetatnom puferu.

Kinetičko-spektrofotometrijska metoda za određivanje ampicilina bazira se na njegovoj reakciji sa jonima Ni(II) u baznoj sredini i u prisustvu kalijum-hlorida kao elektrolita za podešavanje jonske sile rastvora. Ovu reakciju katalizuju mikrokoličine aminokiseline histidina, što je iskorišćeno za razradu kinetičke metode za njegovo određivanje.

2. Razrađena je kinetičko-spektrofotometrijska metoda za određivanje mikrokoličina uree u rastvoru na osnovu adaptacije kolorimetrijske modifikovane Berthelot-ove procedure. Ova procedura je složeni, dvostruko katalizovani sistem reakcija, koje vode do formiranja zeleno obojenog kompleksa, 2,2'-dikarboksiindofenola. Brzina građenja ovog kompleksa (reakcija u prisustvu uree) praćena je na 700 nm, u odnosu na osnovnu reakciju, jer je na toj talasnoj dužini evidentiran maksimum apsorbance kompleksa zelene boje. Ravnomerne promene apsorbance su se dešavale optimalnom brzinom u vremenskom intervalu pogodnom za određivanja diferencijalnom varijantom tangensne metode. Ispitivanjem uticaja svakog reaktanta pojedinačno na brzine reakcije određeni su optimalni uslovi odigravanja reakcije za kinetičko određivanje uree u rastvoru na 25 °C: $0,5 \text{ cm}^3 R_3[c(\text{Na-salicilat}) = 7,75 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{Na-nitroprusid}) = 4,19 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{EDTA}) = 1,25 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]; $c(\text{ureaza}) = 175 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$; $0,2 \text{ cm}^3 R_4[c(\text{NaOCl}) = 1,24 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{NaOH}) = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]; $\text{pH} = 7,5$. Relativna standardna devijacija izračunata za interval koncentracije uree od 0,25 do 2,5 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ kreće se od 8,33 do 2,02 %. Na osnovu zavisnosti $\text{tg} \alpha$ od koncentracije reagujućih komponenata postavljene su kinetičke jednačine za osnovnu i ispitivanu reakciju. Rezultati ispitivanja selektivnosti metode pokazali su da streptomycin i neomicin imaju značajan uticaj na brzinu reakcije građenja 2,2'-dikarboksiindofenola, što je poslužilo za razradu kinetičko-spektrofotometrijskih metoda za njihovo određivanje. Metoda je primenjena za određivanje uree u kremi (tabela 37).

3. Razrađena je kinetičko-spektrofotometrijska metoda za određivanje mikrokoličina streptomycin-sulfata (SMS) u rastvoru, a na osnovu njegovog inhibitornog efekta na reakciju građenja 2,2'-dikarboksiindofenola primenom kinetičko-spektrofotometrijske metode za određivanje mikrokoličina uree u rastvoru. Brzina odigravanja ispitivane reakcije praćena je na 700 nm na temperaturi od 25 °C u odnosu na osnovnu reakciju. Diferencijalna varijanta tangensne metode korišćena je za obradu kinetičkih podataka. Ispitivanjem uticaja svakog reaktanta pojedinačno na brzinu osnovne i ispitivane reakcije određeni su optimalni uslovi odigravanja reakcije za kinetičko određivanje SMS u rastvoru: $1,0 \text{ cm}^3 R_3[c(\text{Na-salicilat}) = 1,55 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{Na-nitroprusid}) = 8,38 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{EDTA}) = 2,50 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]; $c(\text{urea}) = 2,08 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{ureaza}) = 175 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$; $0,2 \text{ cm}^3 R_4[c(\text{NaOCl}) = 1,24 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{NaOH}) = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]; $\text{pH} = 7,5$. Relativna standardna devijacija izračunata za interval koncentracije SMS od 18,2 do 182 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ kreće se od 8,83 do 0,55 %.

Na osnovu zavisnosti t_{90} od koncentracije reagujućih komponenata postavljene su kinetičke jednačine za osnovnu i ispitivanu reakciju. Rezultati ispitivanja selektivnosti metode pokazali su da nema značajne interferencije sa stanovišta aplikativnosti metode, jer je ona direktno primenjena za određivanje SMS u farmaceutskom preparatu (prašak za injekcije, tabela 37) i humanom urinu (tabela 38). Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima određivanja HPLC metodom u navedenim uzorcima.

4. Razrađena je kinetičko-spektrofotometrijska metoda za određivanje mikrokoličina neomicina u rastvoru, a na osnovu njegovog inhibitornog efekta na reakciju građenja 2,2'-dikarboksiindofenola primenom kinetičko-spektrofotometrijske metode za određivanje mikrokoličina uree u rastvoru. Brzina ispitivane reakcije praćena je na 700 nm na temperaturi od 25 °C u odnosu na osnovnu reakciju. Diferencijalna varijanta tangensne metode korišćena je za obradu kinetičkih podataka. Ispitivanjem uticaja svakog reaktanta pojedinačno na brzinu osnovne i ispitivane reakcije određeni su optimalni uslovi odigravanja reakcije za kinetičko određivanje neomicina u rastvoru: $1,0 \text{ cm}^3 R_3 [c(\text{Na-salicilat}) = 1,55 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c(\text{Na-nitroprusid}) = 8,38 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c(\text{EDTA}) = 2,50 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$; $c(\text{urea}) = 4,16 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{ureaza}) = 175 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$; $0,2 \text{ cm}^3 R_4 [c(\text{NaOCl}) = 1,24 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c(\text{NaOH}) = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$; $pH = 7,5$. Relativna standardna devijacija izračunata za interval koncentracije neomicina od 76,88 do 153,7 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ kreće se od 1,99 do 0,68 %. U opsegu nižih koncentracija od 15,37 do 46,12 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ neomicin je pokazivao aktivatorni efekat. Relativna standardna devijacija za taj opseg kreće se od 3,47 do 2,79 %. Na osnovu zavisnosti t_{90} od koncentracije reagujućih komponenata postavljene su kinetičke jednačine za osnovnu i ispitivanu reakciju. Rezultati ispitivanja selektivnosti metode pokazali su da nema značajne interferencije sa stanovišta aplikativnosti metode, jer je direktno primenjena za određivanje neomicina u farmaceutskim preparatima (kapi za oči, tabela 37). Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima mikrobiološkog određivanja disk difuzionom metodom u navedenim uzorcima.
5. Razrađena je kinetičko-spektrofotometrijska metoda za određivanje mikrokoličina natrijum-salicilata (NaS) u rastvoru, na osnovu degradacije njegovog kompleksa sa Fe(III) jonima, koji je formiran kao proizvod Fenton-ovog reagensa i NaS u acetatnom puferu. Brzina reakcije praćena je na 525 nm na temperaturi od 26 °C. Diferencijalna varijanta tangensne metode korišćena je za obradu kinetičkih podataka. Ispitivanjem uticaja svakog reaktanta pojedinačno na brzinu reakcije degradacije određeni su optimalni uslovi za kinetičko određivanje NaS u rastvoru: $c(\text{Fe}^{2+}) = 4,67 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 6,67 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{pufer}) = 8,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $pH = 3,9$. Relativna standardna devijacija izračunata za interval koncentracije NaS od 0,93 do 9,30 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ kreće se od 6,82 do 1,71 %. Na osnovu zavisnosti t_{90} od koncentracije reagujućih komponenata postavljena je kinetička jednačina reakcije. Uslovna konstanta brzine reakcije izračunata je za temperature 23, 26 i 29 °C. Iz dobijenih vrednosti uslovne konstante brzine na tri temperature izračunati su termodinamički parametri za predloženu metodu: energija aktivacije ($E_a^* = 51,68 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$), aktivaciona entalpija ($\Delta H^* =$

49,19 kJ·mol⁻¹), aktivaciona entropija ($\Delta S^* = 40,70 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$) i Gibbs-ova slobodna energija aktivacije ($\Delta G^* = 37,02 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). Selektivnost metode je ispitana na neke metalne jone, anjone i organske molekule. Metoda je primenjena za određivanje mikrokoličina NaS u serumu (tabela 37) i u vinu (tabela 39). Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima određivanja HPLC metodom.

6. Razrađena je kinetičko-spektrofotometrijska metoda za određivanje mikrokoličina ampicilina (Amp) u rastvoru na osnovu njegove reakcije sa jonima Ni(II) u baznoj sredini i u prisustvu KCl. Brzina reakcije praćena je na 265 nm na 25 °C. Diferencijalna varijanta tangensne metode korišćena je za obradu kinetičkih podataka. Ispitivanjem uticaja svakog reaktanta pojedinačno na brzinu reakcije određeni su optimalni uslovi za kinetičko određivanje Amp u rastvoru: $c(\text{Ni}^{2+}) = 3,0\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $c(\text{NaOH}) = 4,0\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $c(\text{KCl}) = 1,5\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Relativna standardna devijacija izračunata za interval koncentracije Amp od 3,49 do 55,84 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ kreće se od 7,79 do 3,20 %. Na osnovu zavisnosti $\text{tg}\alpha$ od koncentracije reagujućih komponenata postavljena je kinetička jednačina reakcije. Uslovna konstanta brzine reakcije izračunata je za četiri temperature: 19, 22, 25 i 28 °C. Iz dobijenih vrednosti uslovne konstante brzine na ovim temperaturama izračunati su termodinamički parametri za predloženu metodu: energija aktivacije ($E_a^* = 21,05 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), aktivaciona entalpija ($\Delta H^* = 18,57 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), aktivaciona entropija ($\Delta S^* = -197,94 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$) i Gibbs-ova slobodna energija aktivacije ($\Delta G^* = 77,56 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). Selektivnost metode je ispitana na neke metalne jone, anjone, amino kiseline i dr. organske molekule, koji se mogu naći, kao ekscipijenti u farmaceutskim preparatima. Katalitički efekat histidina iskorišćen je za razradu kinetičke metode za njegovo određivanje. Metoda je primenjena za određivanje mikrokoličina Amp u kapsulama, sirupu (tabela 37) i urinu (tabela 38). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima određivanja HPLC metodom.
7. Razrađena je kinetičko-spektrofotometrijska metoda za određivanje mikrokoličina histidina (His) u rastvoru na osnovu njegovog katalitičkog efekta na reakciju ampicilina sa jonima Ni(II) u baznoj sredini i u prisustvu KCl. Brzina reakcije praćena je na 265 nm na 25 °C. Diferencijalna varijanta tangensne metode korišćena je za obradu kinetičkih podataka. Ispitivanjem uticaja svakog reaktanta pojedinačno na brzinu reakcije određeni su optimalni uslovi odigravanja reakcije za kinetičko određivanje His u rastvoru: $c(\text{Ni}^{2+}) = 1,0\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $c(\text{NaOH}) = 3,5\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $c(\text{KCl}) = 7,5\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $c(\text{Amp}) = 8\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Relativna standardna devijacija izračunata za interval koncentracije His od 1,55 do 10,85 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ kreće se od 8,05 do 2,02 %. Na osnovu zavisnosti $\text{tg}\alpha$ od koncentracije reagujućih komponenata postavljene su kinetičke jednačine osnovne i ispitivane reakcije. Uslovna konstanta brzine reakcije izračunata je za ispitivanu reakciju na tri temperature: 20, 25 i 30 °C. Iz dobijenih vrednosti uslovne konstante brzine na ovim temperaturama izračunati su termodinamički parametri za predloženu metodu: energija aktivacije ($E_a^* = 27,75 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), aktivaciona entalpija ($\Delta H^* = 25,27 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), aktivaciona entropija ($\Delta S^* = 43,57 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$) i Gibbs-ova slobodna energija aktivacije ($\Delta G^* = 12,29 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). Selektivnost

metode je ispitana na neke metalne jone, anjone, amino kiseline i dr. organske molekule, koji se mogu naći kao ekscipijenti u farmaceutskim preparatima.

Tabela 37. Tačnost i reproduktivnost određivanja ispitivanih komponenata u farmaceutskim preparatima.

Koncentracija ispitivane supstance ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)			RSD (%)	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ (%)	Recovery (kinetička metoda) (%)	F-test	t-test
Odmerena ^{a/} Deklarisana ^{**/} μ	određena kinetičkom metodom ($\bar{x} \pm \text{SD}$)	određena uporednom metodom ($\bar{x} \pm \text{SD}$)					
U r e a							
1,19 ^{*a}	0,91 \pm 0,06	/	6,59	-23,53	76,47	/	/
S t r e p t o m i c i n – s u l f a t (m g)							
1000,00 ^{**b}	1091,00 \pm 46,23	1052,00 \pm 18,91	4,24	+9,1	109,10	5,97	1,75
N e o m i c i n (m g \cdot c m ^ { - 3 })							
5,00 ^{**c}	4,94 \pm 0,11	4,67 \pm 0,45	2,23	-1,2	98,80	16,73	1,00
3,50 ^{**d}	3,78 \pm 0,10	3,93 \pm 0,35	2,65	+8,0	108,00	12,25	0,70
3,50 ^{**e}	3,81 \pm 0,15	4,05 \pm 0,4	3,94	+8,8	108,88	7,11	0,98
N a – s a l i c i l a t (\mu g \cdot c m ^ { - 3 })							
4,97 ^{*f}	4,46 \pm 0,09	4,55 \pm 0,07	2,02	+10,26	89,74	1,65	1,78
3,20 ^{*f}	2,80 \pm 0,20	3,00 \pm 0,09	7,14	+12,50	87,50	4,94	2,14
A m p i c i l i n (\mu g \cdot c m ^ { - 3 })							
20,94 ^{*g}	22,09 \pm 1,10	20,83 \pm 0,59	4,98	+5,49	105,49	3,47	2,26
20,94 ^{*h}	21,42 \pm 1,14	20,75 \pm 0,65	5,32	+2,29	102,29	3,08	1,14
10,47 ^{*i}	9,66 \pm 0,58	10,13 \pm 0,25	6,00	-7,74	92,26	5,38	1,65

^{a/} *Atopic*, krema, 5 % uree, Medical Cosmetics, Crystal derma d.o.o, Beograd;

^{b/} *Streptomycin*, prašak za injekcije, 1 g streptomicina u obliku streptomycin-sulfata, Galenika[®], a.d. Beograd;

^{c/} *Deksametazon Neomicin* kapi za oči, 5 mg/cm³ neomicinsulfata, Galenska laboratorija, Apotekarska ustanova Niš;

^{d/} *Dexamethason Neomycin* kapi za oči, 3,5 mg/cm³ neomicina, Galenika a.d., Beograd;

^{e/} *Neodeksacin* kapi za oči, 3,5 mg/cm³ neomicina, Hemofarm, a.d., Vršac;

^{f/} *Lyotrol N*, humani kontrolni serum, bioMerieux[®]SA, Francuska;

^{g/} *Pentrexyl*[®], capsule, 500 mg ampicilina, Galenika, a. d., Beograd, Srbija;

^{h/} *Ampicilin*, capsule, 500 mg ampicilina, Panfarma, d. o. o., Beograd, Srbija;

^{i/} *Pentrexyl*[®], prašak za oralnu suspenziju, 250 mg ampicilina/5 cm³, Galenika, a. d., Beograd, Srbija.

Tabela 38. Tačnost i reproduktivnost određivanja ispitivanih komponenata u humanom urinu metodom standardnih dodataka.

Koncentracija ispitivane supstance ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)			RSD (%)	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ (%)	Recovery (kinetička metoda) (%)	F-test	t-test
dodata μ	određena kinetičkom metodom ($\bar{x} \pm \text{SD}$)	određena uporednom metodom ($\bar{x} \pm \text{SD}$)					
S t r e p t o m i c i n - s u l f a t ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)							
72,85	65,00 \pm 5,00	70,60 \pm 2,56	7,69	-10,78	89,22	3,81	2,23
91,00	83,59 \pm 5,99	85,68 \pm 2,58	7,17	-8,14	91,86	5,39	0,72
127,48	119,07 \pm 4,22	123,47 \pm 2,33	3,54	-6,60	93,40	3,28	2,04
A m p i c i l i n ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)							
10,47	9,02 \pm 0,85	9,97 \pm 0,43	9,42	-13,85	86,15	3,91	2,24
27,92	26,12 \pm 1,23	27,45 \pm 0,71	4,71	-6,44	93,56	3,00	2,10

Tabela 39. Tačnost i reproduktivnost određivanja Na-salicilata u vinu* metodom standardnih dodataka.

Koncentracija Na-salicilata ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)			RSD (%)	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ (%)	Recovery (kinetička metoda) (%)	F-test	t-test
dodata μ	određena kinetičkom metodom ($\bar{x} \pm \text{SD}$)	određena HPLC metodom ($\bar{x} \pm \text{SD}$)					
4,97	4,05 \pm 0,24	4,37 \pm 0,22	5,6	-18,51	81,50	1,20	2,2
3,20	2,70 \pm 0,22	2,91 \pm 0,20	8,1	-15,62	84,38	1,21	1,58

(*) Graševina, belo vino, A. D. Kruševac.

SUMMARY

Next conclusions can be deduced on the basis of presented results of examining the kinetics of the studied reaction systems, and in order to determine micro quantities of urea, streptomycin, neomycin, sodium-salicylate, ampicillin and histidine:

1. Displayed experimental results describe characteristics of the proposed kinetic-spectrophotometric methods for the determination of mentioned substances (Table 36).

Table 36. Characteristics of the proposed kinetic-spectrophotometric methods for the determination of studied substances.

Substance	$t \pm 0.1$ (°C)	λ_{\max} (nm)	Linearity interval ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)	LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu} \cdot 100$ (%)	Sample
Urea	25.0	700	0.25 – 2.5	0.12	–4.00 do –0.80	Cream
Streptomycin-sulfat	25.0	700	18.2 – 182	11.75	8.85 do –3.63	Powder for injection, Urine
Neomycin	25.0	700	15.37 – 46.12 76.88 – 153.7	3,19	–2.47 do –4.55 –4.25 do –0.75	Eye drops
Na-salicylate	26.0	525	0.93 – 9.3	0.67	–5.38 do 0.65	Serum, Wine
Ampicillin	25.0	265	3.49 – 55.84	2.58	–11.75 do –1.45	Capsules, Syrup, Urine
Histidine	25.0	265	0.31 – 155 1.55 – 10.85	0.05	/ –3.87 do –3.96	/

Methods for the determination of urea, streptomycin-sulfate and neomycin are based on the results of analysis of reaction system kinetics of modified Berthelot method and effect of these substances on the colorimetric determination of urea. Obtained results are used for the development of kinetic-spectrophotometric methods for the determination of these compounds.

The kinetic–spectrophotometric method for the determination of sodium-salicylate is based on monitoring the degradation rate of the Fe(III)–salicylate complex by free radicals, formed via Fenton mechanism, in acetate buffer.

The kinetic–spectrophotometric method for the ampicillin determination is based on its reaction with Ni(II) ions in alkaline medium in the presence of potassium-chloride as the electrolyte regulating ionic strength of the solution. The fact that this reaction is catalyzed by micro quantities of amino acid histidine is used for the development of the kinetic method for the histidine determination.

2. The kinetic–spectrophotometric method for the determination of micro quantities of urea in solution, based on adaptation of colorimetric modified Berthelot procedure, has been developed. This procedure is a complex, double catalyzed reaction system, that leads to the formation of green colored complex of 2,2'-dicarboxyindophenol. The complex formation rate (reaction in the presence of urea) at 700 nm was monitored, with respect to the blank reaction, because the greater increment of the absorption maximum at this wavelength appeared. The equal absorbance changes occurred with the optimal rate during time interval appropriate for using differential variant of the tangent method. Examining the impact of each reactant on both monitored reactions' rate, optimal working conditions for kinetic determination of urea in solution at 25 °C were determined as follows: $0.5 \text{ cm}^3 R_3[c(\text{Na-salicylate}) = 7.75 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{Na-nitroprusside}) = 4.19 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{EDTA}) = 1.25 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]; $c(\text{urease}) = 175 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$; $0.2 \text{ cm}^3 R_4[c(\text{NaOCl}) = 1.24 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{NaOH}) = 2.5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]; $\text{pH} = 7.5$. Relative standard deviation for the urea concentration interval from 0.25 to 2.5 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ranges from 8.33 to 2.02 %. On the basis of tga dependance on reaction components concentration, the kinetics equations for reaction with and without urea were given. The method selectivity in the presence of some metal ions, aions and molecules was examined. Streptomycin and neomycin showed significant interferences on the reaction rate. The effects were used for the development of kinetic–spectrophotometric methods for the determination of these antibiotics. The method was applied to determining urea in cream (Table 37).
3. The kinetic–spectrophotometric method for the determination of micro quantities of streptomycin-sulfate (SMS) in solution was developed. It was based on SMS inhibitory effect on reaction of formation of 2,2'-dicarboxyindophenol using the proposed kinetic–spectrophotometric method for the determination of micro quantities of urea. The reaction rate was monitored at 700 nm at the temperature of 25 °C with respect to the blank reaction. A differential variation of the tangent method was used to process the kinetic data. Examining the impact of each reactant on both monitored reactions' rate, optimal working conditions for kinetic determination of SMS in solution at 25 °C were determined as follows: $1.0 \text{ cm}^3 R_3[c(\text{Na-salicylate}) = 1.55 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{Na-nitroprusside}) = 8.38 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{EDTA}) = 2.50 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]; $c(\text{urea}) = 2.08 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $c(\text{urease}) = 175 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}$; 0.2 cm^3

$R_4[c(\text{NaOCl}) = 1.24 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c(\text{NaOH}) = 2.5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}]; \text{pH} = 7.5$. Relative standard deviation for the SMS concentration interval from 18.2 to 182 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ranges from 8.83 to 0.55 %. The kinetics equations for both reactions were given on the basis of $\text{tg}\alpha$ dependance on the reaction components concentration. The obtained results for the method selectivity showed that there are no interferences regarding method applicability, since it was directly applied to the determination of SMS in pharmaceutical (injection powder, Table 37) and urine (Table 38). The obtained results are in accordance with the HPLC determination results in mentioned samples.

4. The kinetic–spectrophotometric method for the determination of micro quantities of neomycin in solution has been developed, based on neomycin inhibitory effect on reaction of formation of 2,2'-dicarboxyindophenol using the proposed kinetic-spectrophotometric method for determination of micro quantities of urea. The reaction rate was monitored at 700 nm at the temperature of 25 °C with respect to the blank reaction. A differential variation of the tangent method was used to process the kinetic data. Examining the impact of each reactant on both monitored reactions' rate, optimal working conditions for kinetic determination of neomycin at 25 °C were determined as follows: $\text{pH} = 7.5; 1.0 \text{ cm}^3 R_3[c(\text{Na-salicylate}) = 1.55 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c(\text{Na-nitroprusside}) = 8.38 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c(\text{EDTA}) = 2.50 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}]; c(\text{urea}) = 4.16 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}; c(\text{urease}) = 175 \text{ U} \cdot \text{dm}^{-3}; 0.2 \text{ cm}^3 R_4[c(\text{NaOCl}) = 1.24 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c(\text{NaOH}) = 2.5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$. Relative standard deviation for the neomycin concentration interval from 76.88 to 153.7 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ranges from 1.99 to 0.68 %. On the basis of $\text{tg}\alpha$ dependance on reaction components concentration, the kinetics equations for both reactions were given. The results of the method selectivity showed no significant interferences regarding method applicability, since it was directly applied to determining of neomycin in pharmaceuticals (ophthalmic drops, Table 37). The obtained results are in accordance with disc-diffusion microbiological method results in mentioned samples.
5. The kinetic–spectrophotometric method for the determination of micro quantities of sodium-salicylate (NaS) in solution has been developed. It was based on the degradation of the complex between Fe(III) and salicylate ions, formed as the product of reaction between Fenton's reagent and NaS in acetic buffer. The reaction rate was monitored at 525 nm at the temperature of 26 °C. A differential variation of the tangent method was used to process the kinetic data. Examining the impact of each reactant on the reaction rate, optimal working conditions for kinetic determination of NaS in solution at 26 °C were determined as follows: $\text{pH} = 3.9; c(\text{Fe}^{2+}) = 4.67 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}; c(\text{H}_2\text{O}_2) = 6.67 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}; c(\text{pufer}) = 8.6 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Relative standard deviation for the NaS concentration interval from 0.93 to 9.30 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ranges from 6.82 to 1.71 %. The kinetics equation for reaction was given on the basis of $\text{tg}\alpha$ dependance on reaction components concentration. The relative reaction rate constant was calculated for temperatures 23, 26 and 29 °C. According to the relative reaction rate constant values for three temperatures, the thermodynamic parameters were obtained for the

proposed method: activation energy ($E_a^* = 51.68 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), activation enthalpy ($\Delta H^* = 49.19 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), activation entropy ($\Delta S^* = 40.70 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$) and Gibb's energy ($\Delta G^* = 37.02 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). The effects of some metal ions, aions and organic molecules were investigated in order to assess the method selectivity. The method was applied to determining micro quantities of NaS in serum (Table 37) and wine (Table 39). The obtained results were in accordance with the HPLC method results.

6. The kinetic–spectrophotometric method for the determination of micro quantities of ampicilline (Amp) in solution has been developed. It was based on its reaction with Ni(II) ions in alkaline medium in the presence of KCl. The reaction rate was monitored at 265 nm at the temperature of 25 °C. A differential variation of the tangent method was used to process the kinetic data. Examining the impact of each reactant on the reaction rate, optimal working conditions for kinetic determination of Amp at 25 °C in solution were determined: $c(\text{Ni}^{2+}) = 3.0\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $c(\text{NaOH}) = 4.0\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $c(\text{KCl}) = 1.5\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Relative standard deviation for the Amp concentration interval from 3.49 to 55.84 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ranges from 7.79 to 3.20 %. The kinetics equation for reaction was given on the basis of $\text{tg}\alpha$ dependance on reaction components concentration. The relative reaction rate constant was calculated for temperatures 19, 22, 25 and 28 °C. According to the relative reaction rate constant values for four temperatures, the thermodynamic parameters were obtained for the proposed method: activation energy ($E_a^* = 21.05 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), activation enthalpy ($\Delta H^* = 18.57 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), activation entropy ($\Delta S^* = -197.94 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$) and Gibb's energy ($\Delta G^* = 77.56 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). The effects of some metal ions, aions, amino acids and other molecules which can be found as excipients in pharmaceuticals were investigated in order to assess the method selectivity. The catalytic effect of the amino acid histidine was used for the development of the kinetic method for its determination. The method was applied to determining micro quantities of Amp in capsules, syrup (Table 37) and urine (Table 38). The obtained results are in accordance with the HPLC method results.
7. The kinetic–spectrophotometric method for the determination of micro quantities of histidine (His) in solution has been developed. It was based on the catalytic effect of His on the reaction between ampicillin and Ni(II) ions in alkaline medium in the presence of KCl. The reaction rate was monitored at 265 nm at the temperature of 25 °C with respect to the blank reaction rate. A differential variation of the tangent method was used to process the kinetic data. Examining the impact of each reactant on the reaction rate, optimal working conditions for kinetic determination of His in solution at 25 °C were determined: $c(\text{Ni}^{2+}) = 1.0\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $c(\text{NaOH}) = 3.5\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $c(\text{KCl}) = 7.5\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $c(\text{Amp}) = 8\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Relative standard deviation for the His concentration interval from 1.55 to 10.85 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ranges from 8.05 to 2.02 %. The kinetics equations for both reactions were given on the basis of $\text{tg}\alpha$ dependance on reaction components concentration. The relative reaction rate constant was calculated for temperatures 20, 25 and 30 °C. According to the relative reaction rate constant values for these temperatures, the thermodynamic parameters were obtained for

the proposed method: activation energy ($E_a^* = 27.75 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), activation enthalpy ($\Delta H^* = 25.27 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), activation entropy ($\Delta S^* = 43.57 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$) and Gibb's energy ($\Delta G^* = 12.29 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). The effects of some metal ions, aions, amino acids and other molecules which can be found as excipients in pharmaceuticals were investigated in order to assess the method selectivity.

Table 37. Accuracy and reproducibility of determination of studied components in pharmaceutical preparations.

Concentration of the studied component ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)							
Measured Declared ^{*/} μ	Determined by kinetic method ($\bar{x} \pm \text{SD}$)	Determined by referent method ($\bar{x} \pm \text{SD}$)	RSD (%)	$\frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \cdot 100$ (%)	Recovery (kinetic method) (%)	F- test	t-test
U r e a							
1.19 ^{*/a}	0.91 \pm 0.06	/	6.59	-23.53	76.47	/	/
S t r e p t o m y c i n - s u l f a t (mg)							
1000.00 ^{**/b}	1091.00 \pm 46.23	1052.00 \pm 18.91	4.24	+9.1	109.10	5.97	1.75
N e o m y c i n (mg·cm⁻³)							
5.00 ^{**/c}	4.94 \pm 0,11	4.67 \pm 0.45	2.23	-1.2	98.80	16.73	1.00
3.50 ^{**/d}	3.78 \pm 0.10	3.93 \pm 0.35	2.65	+8.0	108.00	12.25	0.70
3.50 ^{**/e}	3.81 \pm 0.15	4.05 \pm 0.4	3.94	+8.8	108.88	7.11	0.98
N a - s a l i c y l a t e ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)							
4.97 ^{*/f}	4.46 \pm 0.09	4.55 \pm 0.07	2.02	+10.26	89.74	1.65	1.78
3.20 ^{*/f}	2.80 \pm 0.20	3.00 \pm 0.09	7.14	+12.50	87.50	4.94	2.14
A m p i c i l l i n ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)							
20.94 ^{*/g}	22.09 \pm 1.10	20.83 \pm 0.59	4.98	+5.49	105.49	3.47	2.26
20.94 ^{*/h}	21.42 \pm 1.14	20.75 \pm 0.65	5.32	+2.29	102.29	3.08	1.14
10.47 ^{*/i}	9.66 \pm 0.58	10.13 \pm 0.25	6.00	-7.74	92.26	5.38	1.65

^{a/} Atopic, cream, 5 % uree, Medical Cosmetics, Crystal derma d.o.o, Beograd, Srbija;

^{b/} Streptomycin, injection powder, 1 g of streptomycin in the form of streptomycin-sulfat, Galenika[®], a.d. Beograd, Srbija;

^{c/} Dekametazon Neomicin, ophthalmic drops, 5 mg/cm³ of neomycin -sulfat, Galenska laboratorija, Pharmacy Niš;

^{d/} Dexamethason Neomycin, ophthalmic drops, 3,5 mg/cm³ neomycin, Galenika a.d., Beograd; Srbija;

^{e/} Neodeksacin, ophthalmic drops, 3,5 mg/cm³ neomycin, Hemofarm, a.d., Vršac, Srbija;

^{f/} Lyotrol N, human control serum, bioMerieux[®] SA, France;

^{g/} Pentrexyl[®], capsules, 500 mg ampicillin, Galenika, a. d., Beograd, Srbija;

^{h/} Ampicilin, capsules, 500 mg ampicillin, Panfarma, d. o. o., Beograd, Srbija;

^{i/} Pentrexyl[®], powder for oral suspension, 250 mg ampicillin/5 cm³, Galenika, a. d., Beograd, Srbija.

Table 38. Accuracy and reproducibility of determination of SMS and Amp in human urine by standard addition method.

Concentration of the studied component ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)							
Added μ	Determined by kinetic method ($\bar{x} \pm \text{SD}$)	Determined by HPLC method ($\bar{x} \pm \text{SD}$)	RSD (%)	$\frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \cdot 100$ (%)	Recovery (kinetic method) (%)	F-test	t-test
S t r e p t o m y c i n - s u l f a t ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)							
72.85	65.00 \pm 5.00	70.60 \pm 2.56	7.69	-10.78	89.22	3.81	2.23
91.00	83.59 \pm 5.99	85.68 \pm 2.58	7.17	-8.14	91.86	5.39	0.72
127.48	119.07 \pm 4.22	123.47 \pm 2.33	3.54	-6.60	93.40	3.28	2.04
A m p i c i l l i n ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)							
10.47	9.02 \pm 0.85	9.97 \pm 0.43	9.42	-13.85	86.15	3.91	2.24
27.92	26.12 \pm 1.23	27.45 \pm 0.71	4.71	-6.44	93.56	3.00	2.10

Table 39. Accuracy and reproducibility of determination of NaS in wine* by standard addition method.

Concentration of Na-salicylate ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)							
Added μ	Determined by kinetic method ($\bar{x} \pm \text{SD}$)	Determined by HPLC method ($\bar{x} \pm \text{SD}$)	RSD (%)	$\frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \cdot 100$ (%)	Recovery (kinetic method) (%)	F-test	t-test
4.97	4.05 \pm 0.24	4.37 \pm 0.22	5.6	-18.51	81.50	1.20	2.20
3.20	2.70 \pm 0.22	2.91 \pm 0.20	8.1	-15.62	84.38	1.21	1.58

(*) Graševina, white wine, A. D. Kruševac.

LITERATURA

Adams E., Liu L., Dierick K., Guyomard S., Nabet P., Rico S., Louis P., Roets E., Hoogmartens J., Neomycin: microbiological assay or liquid chromatography?, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1998, 17(4), 757-766.

Adams E., Schepers R., Gathu L. W., Kibaya R., Roets E., Hoogmartens J., Liquid chromatographic analysis of a formulation containing polymixin, gramicidin and neomycin, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1997, 15(4), 505-511.

Agrawal J. K., Harmalkar S. G., Vijayavargiya R., Spectrophotometric studies of neomycin-copper complex and determination of neomycin sulfate using an auxiliary ligand, *Microchem. J.*, 1976, 21(2), 202-208.

Akhtar M. J., Khan S., Salma Khan M. A., Determination of ampicillin in human plasma by high-performance liquid chromatography using ultraviolet detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1993, 11(4-5), 375-378.

Al-Momani I. F., Flow-injection spectrophotometric determination of amoxicillin, cephalixin, ampicillin and cephadrine in pharmaceutical formulations, *Anal. Lett.*, 2004, 37(10), 2099-2110.

Aman T., Rashid A., Kulsoom R., Khokhar I., Spectrophotometric determination of streptomycin, *Anal. Lett.*, 1995, 28 (5), 881-892.

Ambrose J. A., Crimm A., Burton J., Paullin K, Ross C., Fluorimetric determination of histidine, *Clin. Chem.*, 1969, 15(5), 361-366.

Amin A. S., Modified spectrophotometric method for the determination of some important antibiotics through charge-transfer complexation reaction with chloranil, *Spectrosc. Lett.*, 1996, 29(6), 1003-1011.

Amin A. S., Issa Y. M., Ion-association method for the colorimetric determination of neomycin sulphate in pure and dosage forms, *Spectrochim. Acta Part A*, 2003, 59(4), 663-670.

Amin A. S., Moustafa M. E., Issa Y. M., Spectrophotometric microdetermination of ampicillin and amoxicillin with picric and picramic acids, *Microchem. J.*, 1994, 50(1), 6–13.

Amtul Z., Atta-ur-Rahman, Siddiqui R. A. i Choudhary M. I., Chemistry and mechanism of urease inhibition, *Current medicinal chemistry*, 2002, 9, 1323-1348.

Ardakani M. M., Pourhakkak P., Salavati-Niasari M., Potentiometric coated wire electrode for salicylate based on zinc(II) acetylacetonate, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2007, 18, 782-788.

Baranovskii S. F., Bolotin P. A., Association of riboflavin, caffeine and sodium salicylate in aqueous solution, *J. Appl. Spectrosc.* 2007, 74(2), 211-218.

Belal F., El-Ashry S. M., El Kerdawy M. M., El Wasseef D. R., Spectrofluorimetric determination of streptomycin in dosage forms and in spiked plasma using 9,10-phenanthraquinone, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2001, 26, 435-441.

Belal F., El-Kerdawy M. M., El-Ashry S. M., El-Wasseef D. R., Kinetic spectrophotometric determination of ampicillin and amoxicillin in dosage forms, *Il Farmaco*, 2000, 55, 680-686.

Belal F., Rizk M. S., Eid M., Polarographic determination of some penicillins through nitrosation, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1998, 17, 275-282.

Binns R. B., Tsuji K., High-performance liquid chromatographic analysis of neomycin in petrolatum-based ointments and in veterinary formulations, *J. Pharm. Sci.*, 1984, 73(1), 69-71.

bioMérieux[®]sa, France, Urea–Kit S 180/1000, Ref. 61912/61913.

Bojić J., Radovanović B., Dimitrijević J., Spectrophotometric determination of urea in dermatologic formulations and cosmetics, *Anal. Sci.*, 2008, 24, 769-774.

Bončev P. R., Kompleksoobrazovane i katalitična aktivnost, Nauka i izkustvo, Sofia, 1972.

Bouvrette P., Luong J. H.T., A coupled enzymatic assay for salicylate and acetylsalicylate using salicylate hydroxylase and tyrosinase, *Anal. Chim. Acta*, 1996, 335(1-2), 169-175.

British Pharmacopoeia 98/34/EEC, The Stationery Office, London, 2005.

Brody T. M., Larner J., Minneman K. P., Human Pharmacology-Molecular to Clinical. 3rd ed. Mosby-Year Book Inc., 1998.

Buskin J. N., Upton R. A., Williams R. L., Improved liquid chromatography of aspirin, salicylate and salicylic acid in plasma, with a modification for determining aspirin metabolites in urine, *Clin. Chem.*, 1982, 28(5), 1200-1203.

Chubb S.A. P., Campbell R. S., Ramsay J. R., Hammond P. M., Atkinson T. and Price C. P., An enzyme mediated colorimetric method for the measurement of salicylate, *Clin. Chim Acta.*, 1986, 155(3), 209-220.

Confino M., Bontchev P., Spectrophotometric determination of amikacin, kanamycin, neomycin and tobramycin, *Mikrochim. Acta*, 1990, 102(4-6), 305-309.

Correia D. P. A., Magalhaes J. M. C. S., Machado A. A. S. C., Array of potentiometric sensors for simultaneous analysis of urea and potassium, *Talanta*, 2005, 67, 773-782.

Dallet Ph., Labat L., Kummer E., Dubost J. P., Determination of urea, allantoin and lysine pyroglutamate in cosmetic samples by hydrophilic interaction chromatography, *J. Chromatogr. B*, 2000, 742, 447-452.

Damiani P. C., Borraccetti M. D., Olivieri A. C., Direct and simultaneous spectrofluorometric determination of naproxen and salicylate in human serum assisted by chemometric analysis, *Anal. Chim. Acta*, 2002, 471, 87-96.

Devani M. E., Patel I. T., Patel T. M, Spectrophotometric determination of ampicillin and its dosage forms, *Talanta*, 1992, 39(10), 1391-1394.

Edder P., Cominoli A., Corvi C., Determination of streptomycin residues in food by solid-phase extraction and liquid chromatography with post-column derivatization and fluorimetric detection, *J. Chromatogr A*, 1999, 830(2), 345-351.

El-Sayed G., Amin A. S., Issa Y. M., D-C Polarographic determination of ampicillin in pharmaceutical dosage forms, *Anal. Lett.*, 1994, 27(13), 2515-2521.

El-Sebai A. I., Abdel-hamid M. E., Abuirjele M. A., Hurani A. M., Rapid high performance liquid chromatographic determination of ampicillin in human urine, *Anal. Lett.*, 1988, 21(3), 423-434.

El-Shafie F. S., Gad-Kariem E. A., Al-Rashood K. A., Al-Khamees H. A., El-Obeid H. A., Colorimetric method for the determination of ampicillin and amoxicillin, *Anal. Lett.*, 1996, 29(3), 381-393,

Ermer J., Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrated approach, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2001, 24, 755-767.

Fawcett J. K., Scott J. E., A rapid and precise method for determination of urea, *J. Clin. Pathol.*, 1960, 13, 156-159.

Fernandez-Gonzalez A., Badia R., Diaz-Garcia M. E., Micelle-mediated spectrofluorimetric determination of ampicillin based on metal ion-catalysed hydrolysis, *Anal. Chim. Acta*, 2003, 484, 223-231.

Fernández-González A., Badia R., Diaz-Garcia M.E., Comparative study of the micellar enhanced spectrophotometric determination of β -lactamic antibiotics by batch and flow injection analysis using a multisimplex design, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002, 29(4), 669-679.

Flurer C. L., The analysis of aminoglycoside antibiotics by capillary electrophoresis, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1995, 13, 809.

Francis P. S., Lewis S. W., Lim K. F., Analytical methodology for the determination of urea: current practice and future trends, *Trends in Anal. Chem.*, 2002, 21 (5), 389-400.

Frew J. E., Bayliff S. W., Gibbs P. N. B., Green M. J., Amperometric biosensor for the rapid determination of salicylate in whole blood, *Anal. Chim. Acta*, 1989, 224, 39-46.

Gala B., Gomez-Hens A., Perez-Bendito D., Individual and joint stopped flow kinetic spectrofluorimetric determination of neomycin and tyrothricin, *Anal. Chim. Acta*, 1995, 303(1), 31-37.

Gala B., Gomez-Hens A., Perez-Bendito D., Simultaneous determination of ampicillin and tetracycline in milk by using stopped-flow/T-format spectrofluorimeter, *Talanta*, 1997, 44, 1883-1889.

Gala B., Gomez-Hens A., Perez-Bendito D., Use of a stopped/flow/T-format spectrofluorimeter for simultaneous kinetic analyses, *Anal. Chim. Acta*, 1995, 310(3), 453-459.

Garcia M. S., Sanchez-Pedreno C., Albero M. I., Rodenas V., Determination of ampicillin or amoxicillin in pharmaceutical samples by flow injection analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1994, 12(12), 1585-1589.

Gerber D. A., Determination of histidine in serum with o-phthalaldehyde, *Anal. Biochem.*, 1970, 34, 500-504.

Gill R., High pressure liquid chromatography. U: Clarke's isolation and identification of drugs, Moffat A. C., 2nd ed., The Pharmaceutical press, London, 1986

Gleston S., Udžbenik fizičke hemije, Naučna knjiga, Beograd, 1970.

Gonzalez-Rodriguez J., Perez-Juan P., Luque de Castro M. D., Method for monitoring urea and ammonia in wine and must by flow injection-pervaporation, *Anal. Chim. Acta*, 2002. 471, 105-111.

Granados O., Meza G., A direct HPLC method to estimate streptomycin and its putative ototoxic derivate, streptidine, in blood serum: Application to streptomycin-treated humans, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2007, 43(2), 625-630.

Grant G. H., Silverman L. M., Christenson R. H., Aminokiseline i proteini. U: Osnovi kliničke hemije, Tietz N. W., urednik, 3. izdanje, Velarta, Beograd, 1997.

Guilbault G. G., Seo M. L., Amperometric determination of urea using an NADH-dependent coupled enzyme, *Talanta*, 1994, 41(6), 1029-1033.

Gupta V. D., Stewart K. R., Gunter J. M., Quantitation of amikacin, kanamycin, neomycin and tobramycin in pharmaceutical dosage forms using the Hantzsch reaction, *J. Pharm. Sci.*, 1983, 72(12), 1470-1471.

Gupta R. N., Zamkanej M., Simplified fluorometric determination of salicylate in plasma, *Clin. Chem.*, 1990, 36(9), 1690-1691.

Gutman I., Bergmeyer H. U. U: Method of enzymatic analysis, 2nd ed. , vol. IV, New York, Academic Press, 1974.

Haasnoot W., Stouten P., Cazemier G., Lommen A., Nouws J. F. M., Keukens H. J., Immunochemical detection of aminoglycosides in milk and kidney, *Analyst*, 1999, 124 301–305.

Hallet C. J., Cook J. G. H., Reduced nicotinamide adenine dinucleotide-coupled reaction for emergency blood urea estimation, *Clin. Chim. Acta*, 1971, 35(1), 33-37.

Hanko V. P., Rohrer J. S., Determination of neomycin sulfate and impurities using high-performance anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2007, 43, 131-141.

Hauptmann S., Graefe J., Remane H., Lehrbuch der organischen chemie, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, 1977.

Hermann K., Abeck D., Determination of histidine and urocanic acid isomers in the human skin by high-performance capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. B*, 2000, 749, 41-47.

Horn M. J., Jones D. B., Blum A. E., Microbiological determination of histidine in proteins and foods, *J. Biol. Chem.*, 1948, 172, 149-153.

Houston P. H., Chemical Kinetics and Reaction Dynamics, McGraw-Hill, New York, 2001

Huang Y., Zang Z., Zang D., Lv J., Flow-injection analysis chemiluminescence detection combined with microdialysis sampling for studying protein binding of drug, *Talanta*, 2001, 53(4), 835-841.

Huidobro A. L., Garcia A., Barbas C., Rapid analytical procedure for neomycin determination in ointments by CE with direct UV detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2009, 49(5), 1303-1307.

Iida Y., Ikeda M., Aoto M., Satoh I., Fluorometric determination of urea in alcoholic beverages by using an acid urease column-FIA system, *Talanta*, 2004, 64, 1278-1282.

Ishida M., Kobayashi K., Awata N, Sakamoto F., Simple high-performance liquid chromatography of ampicillin in human serum using solid-phase extraction disk cartridges, *J. Chromatogr. B*, 1999, 727, 245-248.

Jacimirskii K. B., Kinetičeskie metodi analiza, Himija, Moskva, 1967.

Jaselskis B., Voltammetric determination of histidine, *Anal. Chem.*, 1958, 30(12), 1968-1971.

Jawetz E., Aminoglycosides & Polymyxins. U: Basic & Clinical Pharmacology, Katzung B. G., Ed., 6th ed., Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut, 1995.

Jugoslovenska farmakopeja 2000, 5. Izdanje, knjiga 1, Savezni zavod za zaštitu i unapređenje zdravlja i Savremena administracija, Beograd, 2001.

Junior L. R., Neto G. O., Fernandes J. R., Kubota L. T., Determination of salicylate in blood serum using an amperometric biosensor based on salicylate hydroxylase immobilized in a polypyrrole-glutaraldehyde matrix, *Talanta*, 2000, 51(3), 547- 557.

Kavarić J. i Rakić Lj., Klinička biohemija i laboratorijska dijagnostika, NIO Univerzitet. riječ-Nikšić, Med. knjiga Beograd i Med. institut Titograd, 1987.

Kiba N., Koga A., Tachibana M., Tani K., Koizumi H., Koyama T., Yamamura A., Matsumoto K., Okuda T., Yokotsuka K., Flow-injection determination of L-histidine with an immobilized histidine oxidase from *Brevibacillus borstelensis* KAIT-B-022 and chemiluminescence detection, *Anal. Sci.*, 2006, 22, 95-98.

Kirkbright G. F., Development and publication of new spectrophotometric methods of analysis, *Talanta*, 1966, 13(1), 1-14.

Knorst M. T., Neubert R., Wohlrab W., Analytical methods for measuring urea in pharmaceutical formulations, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1997, 15 (11), 1627-1632.

Kopple J. D., Swendseid M. E., Evidence that histidine is an essential amino acid in normal and chronically uremic man, *J. Clin. Invest.*, 1975, 55(5), 881-891.

Koraćević D., Enzimi. U: Biohemija, Koraćević D., Bjelaković G., Đorđević J., Nikolić J., Pavlović D. i Kocić G., 2. izdanje, Savremena administracija, Beograd, 2000.

Kubo H., Li H., Kobayashi Y., Kinoshita T., Fluorometric determination of streptomycin in serum by high-performance liquid chromatography using mobile phase containing fluorogenic reagent, *Anal. Biochem.*, 1987, 162, 219-223.

Kurosawa N., Kuribayashi S., Owada E., Ito K., Nioka M., Arakawa M., Fukuda R., Determination of streptomycin in serum by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B*, 1985, 343, 379-385.

Kurzawa M., Jastrzebska A., Szlyk E., Application of isotachophoretic and conductometric methods for neomycin trisulphate determination, *Chem. Pap.*, 2009, 63(3), 255-260.

Laidler K. J., Chemical Kinetics, 2nd Ed, McGraw-Hill, New York, 1965.

Larcher R., Nicolini G., Bertoldi D., Application of differential pH technique to the determination of urea in Italian wines, *Vitis*, 2007, 46 (3), 148-153.

Li Q.-M., Gao L.-X., *Anal. Lett.*, A novel method for the determination of streptomycin using sodium nitroprusside as a chromogenic reagent by spectrophotometry, 2008, 41 (14), 2595-2607.

Lida Y., Ikeda M., Aoto M., Satoh I, Fluorimetric determination of urea in alcoholic beverages by using an acid urease column-FIA system, *Talanta*, 2004, 64, 1278-1282.

Litowitz T. L., KleinSchwartz W., White S. *et al.*, Annual Report of the American Association of Poison Control Centers Toxic Exposure Surveillance System. *Am. J. Emerg. Med.*, 2001, 19(5), 337-395.

Luca G. C., Reis B. F., Sistema em fluxo para determinacao espectrofotometrica de ureia em plasma de sangue animal empregando leguminosa como fonte natural da enzima ureaze, *Quim. Nova*, 2001, 24(2), 191-194.

Luo W., Ang C. Y. W., Thompson Jr. H. C., Rapid method for the determination of ampicillin residues in animal muscle tissues by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Chromatogr. B*, 1997, 694, 401-407.

Luzzana M., Giardino R., Urea determination in milk by a differential pH technique, *Lait*, 1999, 79, 261-267.

Mahgoub H., Aly F. A., UV-spectrophotometric determination of ampicillin and sulbactam sodium in two-component mixtures, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1998, 17(8), 1273-1278.

Maia P. P., Amaya-Farfan J., Rath S., Reyes Reyes F. G., Simultaneous determination of streptomycin and oxytetracycline in agricultural antimicrobials by CZE after an experimental design, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2007, 43, 450-456.

Majkić-Singh, S. Spasić, M. Stojanov, Z. Jelić-Ivanović, V. Spasojević-Kalimanovska, Medicinska biohemija, Praktikum, Beograd, 1995.

Marques M. R. C., Hackmann E. R. M., Saito T., Spectrophotometric determination of neomycin with 2,4-dinitrofluorobenzene, *Anal. Lett.*, 1989, 22(3), 621-633.

Megoulas N. C., Koupparis M. A., Enhancement of evaporative light scattering detection in high-performance liquid chromatographic determination of neomycin based on highly volatile mobile phase, high-molecule-mass ion-pairing reagents and controlled peak shape, *J. Chromatogr. A*, 2004, 1057, 125-131.

Milić N., Sovilj S., Kinetičko-termodinamički principi i mehanizam hemijskih reakcija, priručnik za računke i eksperimentalne vežbe, NIK, Beograd, 2000.

Mitić S. S., Miletić G. Ž, Petrović A. N., Tošić S. B., Kinetic determination of histidine in pharmaceutical sample, *Oxidation Communications*, 2004, 27(2), 453-462.

Mitić S. S., Sunarić S. M., Tosić S. B., Determination of streptomycin in a pharmaceutical sample based on its degradation by hydrogen peroxide in the presence of copper (II), *Anal. Sci.*, 2006, 22, 753-756.

Moffat A. C., Clarke's isolation and identification of drugs, 2nd ed., The Pharmaceutical press, London, 1986.

Moreira J. C., Fogg A. G., Differential-pulse adsorptive stripping voltammetric determination of tyrosine and histidine at a hanging mercury drop electrode after coupling with diazotized sulphanic acid, *Analyst*, 1991, 116, 249-252.

Morelli B., Determination of iron(III) and copper(II) by zeroth, first and second derivative spectrophotometry with 2-thiobarbituric acid (4,6-dihydroxy-2-mercaptopyrimidine) as reagent, *Analyst*, 1983, 108(1288), 870-879.

Morelli B., Simultaneous determination of ceftriaxone and streptomycin in mixture by 'ratio-spectra' 2nd derivative and zero-crossing 3rd derivative spectrophotometry, *Talanta*, 1994, 41(5), 673-683.

Morishita Y., Nakane K., Fukatsu T., Nakashima N., Tsuji K., Soya Y., Yoneda K., Asano S., Kawamura Y., Kinetic assay of serum and urine for urea with use urease and leucine dehydrogenase, *Clin. Chem.*, 1997, 43 (10), 1932-1936.

Moss D. W., Henderson A. R., Kachmar J. F., Enzimi. U: Osnovi kliničke hemije. Tietz N. W., urednik, 3. izdanje, Velarta, Beograd, 1997.

Moyer T. P., Pippenger Jr. C. E., Blanke R. V., Blouin R. A., Terapijsko određivanje lekova. U: Osnovi kliničke hemije. Tietz N. W., urednik, 3. izdanje, Velarta, Beograd, 1997.

Muller H., Otto M., Warner G., Katalitičke metode v analize sledov elementov, Mir, Moskva, 1983.

Nelis H. J., Vandenbranden J., Verhaeghe B., De Kruif A., Mattheeuws D., De Leenheer A. P., Liquid chromatographic determination of ampicillin in bovine and dog plasma by using a tandem solid-phase extraction method, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1992, 36(8), 1606-1610.

Newman P. M., Turnbull J. H., A new colorimetric method for the estimation of histidine and histamine, *Biochem J.*, 1960, 74(2), 379-382.

Nikolić J., Metabolizam proteina i aminokiselina. U: Biohemija, Koraćević D., Bjelaković G., Đorđević J., Nikolić J., Pavlović D. i Kocić G., 2. izdanje, Savremena administracija, Beograd, 2000.

Obradović M. et al., Hemijsko tehnološki priručnik, Hemijski i fizički podaci i veličine, Rad, Beograd, 1987.

Oertel R., Renner U., Kirch W., Determination of neomycin by LC-tandem mass spectrometry using hydrophilic interaction chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2004, 35(3), 633-638.

Orsonneau J.-L., Massoubre C., Cabanes M., Lustenberger P., Simple and sensitive determination of urea in serum and blood, *Clin. Chem.*, 1992, 38(5), 619-623.

Otte X., Eurard B., Oelattre L., Thunus L., Development and validation of a new Fourier transform infrared spectrometric method for the quantification of urea in creams and ointments, *Anal. Chim. Acta*, 2002, 451, 323-328.

Patel V. B., Patel K. N., Shan M. M., Mayank B., Spectrophotometric determination of histidine hydrochloride monohydrate in pharmaceutical formulations, *International J. PharmTech Research*, 2009, 1(3), 852-856.

Patton C. J., Crouch S. R., Spectrophotometric and kinetics investigation of the Berthelot reaction for the determination of ammonia, *Anal. Chem.* 1977, 49(3), 464-469.

Perez-Bendito D., Silva M., Kinetic Methods in Analytical Chemistry, Ellis Horwood, Chichester, 1988.

Pignatello J. J., Oliveros E., MacKay A., Advanced oxidation processes for organic contaminant destruction based on the Fenton reaction and related chemistry, *Crit Rev in Environ Sci Technol.*, 2006, 36, 1-84.

Posyniak A., Zmudzki J., Niedzielska J., Sample preparation for residue determination of gentamicin and neomycin by liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 2001, 914(1-2), 59-66.

Proudfoot A. T., Toxicity of salicylates, *Am. J. Med.*, 1983, 75(5A), 99-103.

Rahman N., Ahmad Y., Azmi S. N. H., Kinetic spectrophotometric method for the determination of ramipril in pharmaceutical formulations, *A. A. P. S. PharmSciTech.*, 2005, 6, 543-551.

Randox Lab. Ltd. United Kingdom, Urea, Cat. No. UR 107/108/109.

Rizk M., El-Shabrawy Y., Zakhari N. A., Toubar S. S., Carreira L. A, Fluorimetric determination of aminoglycoside antibiotics using lanthanide probe ion spectroscopy, *Talanta*, 1995, 42, 1849-1856.

Robertson D. B. I Maibach H. I., *Dermatologic Pharmacology. U: Basic & Clinical Pharmacology*, Katzung B. G., Ed., 6th ed., Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut, 1995.

Rouessac F, Rouessac A., *Chemical Analysis*, 2.izdanje, John Wiley & Sons, Ltd., 2007.

Sastry C. S. P., Rao S. G., Naidu P. Y., Srinivas K. R., New spectrophotometric method for the determination of some drugs with iodine and wool fast blue BL, *Talanta*, 1998, 45(6), 1227–1234.

Sehitogullari A., Uslan A. H., Preparation of a potentiometric immobilized urease electrode and urea determination in serum, *Talanta*, 2002, 57 (6), 1039-1044.

Shaikh B., Jackson J., Guyer B., Ravis W., Determination of neomycin in plasma and urine by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B*, 1991, 571, 189-198.

Shieh P., Cheng S.-S., Kuo D.-H., Fu W.-C., Hsu M.-C., Chen F.-A., Simple and rapid liquid chromatographic method for determination of histidine HCl in pharmaceutical preparations, *Taiwan Pharm. J.*, 2007, 59(3), 141-148.

Shin M.-H., Park M.-K., Yu C.-H., Choi J.-K., Determination of ampicillin and cloxacillin mixture by NMR, *Arch. Pharm. Res.*, 1981, 4(1), 9-17.

Skoog D. A., Holler F. J., Nieman T. A., *Principles of Instrumental Analysis*, 5. izdanje, Brooks/Cole Thomson Learning, USA, 1998.

Simpson D. L., Kobos R. K., Potentiometric microbiological assay of gentamicin, streptomycin and neomycin with carbon dioxide gas-sensing electrode, *Anal. Chem.*, 1983, 55(12), 1974-1977.

Smith J. W. G., De Grey G. E., Patel V. J., The spectrophotometric determination of ampicillin, *Analyst*, 1967, 92(1093), 247–252.

Smith M. J. H., Smith P. K. *The salicylates, a critical bibliographic review*. Interscience, New York, 1966.

Stead D. A., Current methodologies for the analysis of aminoglycosides, *J. Chromatogr. B*, 2000, 747(1-2), 69-93.

Stewart M.S., Watson I. D., Analytical reviews in clinical chemistry: methods for the estimation of salicylate and paracetamol in serum, plasma and urine. *Ann. Clin. Biochem.* 1987, 24(6), 552-565.

Stojanović O., Stojanović N., Kosanović Đ., Hemijsko tehnološki priručnik, knjiga 4, Rad, Beograd, 1984.

Suhren G., Knapstein K., Detection of incurred dihydrostreptomycin residues in milk by liquid chromatography and preliminary confirmation methods, *Analyst*, 1998, 123, 2797-2801.

Sunarić S. M., Mitić S. S., Miletić G. Ž., Kostić D. A., Trutić N. V., Spectrophotometric initial-rate method for determination of neomycin in ophthalmic drops, *Chem. Anal. (Varšava)*, 2007, 52, 811-816.

Sunderman Jr. F. W., Derman H., Drug interference in clinical biochemistry, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 1970, 1(3), 427-449.

Swain A. R., Dutton S. P., Truswell A. S., Salicylates in foods, *J. Am. Diet. Assoc.* 1985, 85(8), 950-960.

Tateda N., Matsuhisa K., Hasebe K., Miura T., Sensitive and specific determination of histidine in human serum, urine and stratum corneum by a flow injection method based on fluorescence derivatization with o-phthalaldehyde, *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.*, 2001, 24(20), 3181-3196.

Thavarungkul P., Asawatreratanakul P., Kanatharana P., Duenjumroon J., Chaibundit C., A flow-through enzyme reactor system for urea determination in blood serum using conductometric measurement, *ScienceAsia*, 1999, 25, 157-163.

Tobias D. Y., First-derivative spectroscopic determination of acetaminophen and sodium salicylate in tablets, *J. Assoc. Off Anal. Chem.*, 1983, 66, 1450-1454.

Trinder P., Rapid determination of salicylate in biological fluids, *Biochem J.*, 1954, 57(2), 301-303.

Tsou T.-L., Huang Y.-C., Lee C.-W., Lee A.-R., Wang H.-J., Chen S.-H., Simultaneous determination of ampicillin, cefoperazone and sulbactam in pharmaceutical formulations by HPLC with β -cyclodextrin stationary phase, *J. Sept. Sci.*, 2007, 30, 2407-2413.

Tsuji K., Goetz J. F., VanMeter W., Gusciora K., Normal-phase high-performance liquid chromatographic determination of neomycin sulfate derivatized with 1-fluoro-2,3-dinitrobenzene, *J. Chromatogr.*, 1979, 175, 141-152.

Van Giessen B., Tsuji K., GLC assay method for neomycin in petrolatum-based ointments, *J. Pharm. Sci.*, 1971, 60(7), 1068-1070.

Van Soestbergen A. A., Large-plate method for the assay of neomycin in serum, *Appl. Microbiol.*, 1969, 18(3), 350-354.

Villaseñor S. R., Limpert G. W., Simple rugged non-aqueous potentiometric titration assay for urea, *Analyst*, 1998, 123, 1149-1150.

Vujaklija M., Leksikon stranih reči i izraza, Prosveta-Beograd, 1961.

Wadud S., Or-Rashid M. M., Onodera R., Method for determination of histidine in tissues by isocratic highperformance liquid chromatography and its application to the measurement of histidinol dehydrogenase activity in six cattle organs, *J. Chromatogr. B*, 2002, 767, 369-374.

Wan G.-H., Cui H., Zheng H.-S., Pang Y.-Q., Liu L.-J., Yu X.-F., Flow-injection determination of streptomycin residues in milk using the luminol-periodate-Mn²⁺ chemiluminescence system, *Luminescence*, 2006, 21, 36-42.

Whall T. J., Determination of streptomycin sulfate and dihydrostreptomycin sulfate by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, 1981, 219(1), 89-100.

Xu L., Yuan R., Fu Y. Z., Chai Y. Q., Potentiometric membrane electrode for salicylate based on an organotin complex with a salicylal Schiff base of amino acid, *Anal. Sci.*, 2005, 21, 287-292.

You K., Polarographic quantification of salicylate in serum by salicylate hydroxylase, *Clin. Chim. Acta*, 1985, 149, 281-284.

You K., Bittikofer J. A., Quantification of salicylate in serum by use of salicylate hydroxylase, *Clin. Chem.*, 1984, 30(9), 1549-1551.

Zakhari N. A., Spectrophotometric assay of certain aminoglycosides using cyanoacetamide, *Anal. Lett.*, 1990, 23 (10), 1843-1856.

Zhu L. D., Li Y. X., Zhu G. Y., Flow-injection analysis of histidine with enhanced electrogenerated chemiluminescence of luminol, *Chin. Chem. Lett.*, 2002, 13(11), 1093-1096.

Zuidema T, Mulder P. P. J., Lasaroms J. J. P., Stappers S., Van Rhijn j. A., Can high-performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection under all conditions be regarded as a sufficiently conclusive confirmatory method for B-group substances?, *Food Addit. Contam.*, 2006, 23(11), 1149-1156.

BIOGRAFIJA SA BIBLIOGRAFIJOM

BIOGRAFSKI PODACI



Ivana Rašić Mišić rođena je 05.08.1978. god. u Nišu. Filozofski fakultet Univerziteta u Nišu, smer hemija, upisala je školske 1997/98. god. i diplomirala na istom oktobra 2002. god. sa prosečnom ocenom 9,27. Diplomski rad pod nazivom “Spektrofotometrijsko određivanje sastava kompleksa Cu(II)-kvercetin” odbranila je ocenom 10 i time stekla pravo na diplomu o visokoj stručnoj spremi i stručni naziv diplomirani hemičar opšte hemije. Za postignute visoke akademske rezultate dodeljena joj je diploma i jednokratna stipendija od strane Ambasade Kraljevine Norveške u Beogradu. Poslediplomske studije na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Nišu, Odsek za hemiju, smer analitička hemija, upisala je školske 2002/03. godine. Nakon položenih ispita na magistarskim studijama, upisala je doktorske akademske studije iz oblasti analitičke hemije školske 2006/07. god. na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Nišu i položila sve ispite predviđene planom i programom prosečnom ocenom 10,00.

Profesionalna karijera

Nakon završetka osnovnih studija zasnovala je radni odnos na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Nišu kao asistent-pripravnik na Odseku za hemiju 1. marta 2003. godine. Kao asistent-pripravnik bila je angažovana na vežbama iz predmeta: Fizička hemija I, Analitička hemija I, Instrumentalna analitička hemija I, Instrumentalna analitička hemija II (smer diplomirani hemičar), Instrumentalna analitička hemija (smer profesor hemije). Od školske 2007/08. angažovana je na predmetima: Analitička hemija II, Analitička hemija III i Odabrana poglavlja u volumetriji. U zvanje asistenta izabrana je 15. maja 2010.

Učešće na projektima

”Razvoj novih i poboljšanje postojećih analitičkih metoda za praćenje kvaliteta industrijskih proizvoda i životne sredine” (br. 1211) od 2003. do 2005. godine koji je finansiralo Ministarstvo za nauku, tehnologiju i razvoj Republike Srbije.

"Razvoj i primena metoda za praćenje kvaliteta industrijskih proizvoda i životne sredine" (br. 142015) od 2006. godine koji finansira Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

BIBLIOGRAFSKI PODACI

Radovi objavljeni u časopisima međunarodnog značaja $M_{23} = 3$

1. Danijela A. Kostić, Gordana Ž. Miletić, Snežana S. Mitić, Ivana D. Rašić, Valentina V. Živanović, Spectrophotometric Determination of Microamounts of Quercetin Based on its Complexation with Copper(II), *Chemical Papers*, 61 (2), 73-76, 2007
2. Snežana S. Mitić, Valentina V. Živanović, Gordana Ž. Miletić, Danijela A. Kostić, Ivana D. Rašić, Kinetic Method for the Determination of 2,4-Dinitrophenol, *Revista de chimie*, 59(7), 782-786, 2008.
3. Snežana S. Mitić, Gordana Ž. Miletić, Danijela A. Kostić, Daniela Č. Nasković-Đokić, Biljana B. Arsić, Ivana D. Rašić, A rapid and reliable determination of doxycycline hyclate by HPLC with UV detection in pharmaceutical samples, *Journal of the Serbian Chemical Society*, 73(6), 665-671, 2008.
4. Snežana S. Mitić, Gordana Ž. Miletić, Ivana D. Rašić, Aleksandra N. Pavlović, Kinetic quantification of sodium salicylate in human serum and wine, *Journal of Analytical Chemistry*, 66(1), 94-101, 2011.

5. Snežana S. Mitić, Gordana Ž. Miletić, Danijela A. Kostić, Ivana D. Rašić, A spectrophotometric study of streptomycin effect on the clinical urea determination, *Chinese Journal of Chemistry*, 29(1), 135-142, 2011.

Radovi saopšteni na skupovima međunarodnog značaja štampani u izvodu M₃₄

1. Snežana S. Mitić, Gordana Ž. Miletić, Danijela A. Kostić, Ivana D. Rašić, A kinetic-enzymatic method for determination of urea, International conference of analytical chemistry and chemical analysis (AC&CA-05), Book of abstracts p. 371, September 12-18, 2005, Kyiv, Ukraine.
2. Danijela A. Kostić, Gordana Ž. Miletić, Snežana S. Mitić, Ivana D. Rašić, Kinetic-enzymatic determination of streptomycin, 5th International conference of the south-east European chemical societies (ICOSECS), Book of abstracts, Volume I, p. 127, September 10-14, 2006, Ohrid, Republic of Macedonia.
3. Snežana S. Mitić, Gordana Ž. Miletić, Danijela A. Kostić, Ivana D. Rašić, Biljana B. Arsić, Aleksandra Zarubica, A Kinetic-enzymatic method for the determination of neomycin, Euroanalysis XIV, Book of abstracts p. 847, 9-14. September 2007, Antwerp, Belgium.
4. Snežana S. Mitić, Gordana Ž. Miletić, Danijela A. Kostić, Daniela Č. Nasković-Đokić, Biljana B. Arsić, Ivana D. Rašić, A rapid and reliable determination of doxycycline hyclate by HPLC with UV detection in pharmaceutical samples, Euroanalysis XIV, Book of abstracts p. 835, 9-14 September 2007, Antwerp, Belgium.
5. Snežana S. Mitić, Gordana Ž. Miletić, Ivana D. Rašić, Aleksandra N. Pavlović, Kinetic Quantification of Sodium salicylate in Human Serum and Wine, Euroanalysis XV 6-10 Sept 2009, Innsbruck, Austria.

Rad saopšten na skupu nacionalnog značaja štampan u izvodu M₆₄

1. Danijela A. Kostić, Snežana S. Mitić, Blaga Radovanović, Snežana B. Tošić, Aleksandra N. Pavlović Saša Despotović, Ivana D. Rašić, Određivanje metala u grožđu Jugoistočne Srbije ICP-OES tehnikom, 5. Simpozijum Hemija i zaštita životne sredine sa međunarodnim učešćem, Knjiga izvoda str. 74, Tara, 27-30 Maj, 2008.