Univerzitet u Nišu
Prirodno-matematički fakultet
Odsek za hemiju

Kinetičko određivanje nekih analgetika i sedativa

- Doktorska disertacija -

Aleksandra N. Pavlović, mag. hem. nauka

Niš, 2009. g

PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
NIŠ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj, RBR:	
Identifikacioni broj, IBR:	
Tip dokumentacije, TD:	monografska
Tip zapisa, TZ:	tekstualni / grafički
Vrsta rada, VR:	doktorska disertacija
Autor, AU:	Aleksandra Pavlović
Mentor, MN:	dr Snežana Mitić
Naslov rada, NR:	**Kinetičko određivanje nekih analgetika i sedativa**
Jezik publikacije, JP:	srpski
Jezik izvoda, JI:	engleski
Zemlja publikovanja, ZP:	Srbija
Uže geografsko područje, UGP:	Srbija
Godina, GO:	2009.
Izdavač, IZ:	autorski reprint
Mesto i adresa, MA:	Niš, Višegradska 33
Fizički opis rada, FO: (poglavlja/strana/ citata/tabela/slika/grafika/priloga)	8 poglavlja, 158 strane, 152 citata, 71 tabela, 70 grafika
Naučna oblast, NO:	Hemija
Naučna disciplina, ND:	Analitička hemija
Predmetna odrednica/Ključne reči, PO:	analgetici, sedativi, reakcija izmene liganada, kinetičko određivanje
UDK	543.23 : 615.212 + 615.214
Čuva se, ČU:	biblioteka
Važna napomena, VN:	
Izvod, IZ:	U radu su predložene nove kinetičko-spektrofotometrijske metode za određivanje mikrokoličina analgetika, derivata salicilne, propionske i aminofenilacetatne kiseline (acetilsalicilna kiselina, ibuprofen, diklofenak) i sedativa, derivata, etanolamina i benzodiazepina (dimenhidrinat, klonazepam, diazepam), a na osnovu njihovog uticaja na ravnotežu u kompleksirajućoj sredini (1-nitrozo-2-naftol / joni bakra, kobalta i kadmijuma). Razrađenim metodama pomenute aktivne supstance su određene u farmaceutskim preparatima i humanom kontrolnom serumu.
Datum prihvatanja teme, DP:	14.05.2008.
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:		monography
Type of record, TR:		textual / graphic
Contents code, CC:		Ph.D. dissertation
Author, AU:		Aleksandra Pavlović
Mentor, MN:		dr Snežana Mitić
Title, TI:		**Kinetic determination of some analgesics and sedatives**
Language of text, LT:		Serbian
Language of abstract, LA:		English
Country of publication, CP:		Serbia
Locality of publication, LP:		Serbia
Publication year, PY:		2009.
Publisher, PB:		author's reprint
Publication place, PP:		Niš, Višegradska 33
Physical description, PD: (chapters/pages/ref./tables/pictures/graphs/appendixes)		chapters: 8, pages: 158, references: 152, tables: 71, graphics: 70
Scientific field, SF:		Chemistry
Scientific discipline, SD:		Analytical Chemistry
Subject/Key words, S/KW:		analgesics, sedatives, ligand-exchange reactions, kinetic determination
UC		543.23 : 615.212 + 615.214
Holding data, HD:		library
Note, N:		
Abstract, AB:		In this Ph.D. dissertation the new kinetic-spectrophotometric methods for determination of microquantities of analgesics derivates salicylic acid, propionic and aminophenylacetic acid (acetylsalicylic acid, ibuprofen, diclofenac) and derivates ethanolamine and benzodiazepine (dimenhydrinate, clonazepam and diazepam) were developed. The methods are based on "ligand-exchange" reactions. Actually analgesic/sedative displace matal ion (cobalt/copper/cadmium) from the complex with 1-nitroso-2-naphthol. The developed methods were applied to the determination of analgesics and sedatives investigated in pharmaceuticals and human control serum.
Accepted by the Scientific Board on, ASB:		14.05.2008.
Defended on, DE:		
Defended Board, DB:	President:	
	Member:	
	Member, Mentor:	

S ljubavlju ćerki Minji
koja ume da me voli baš onako kako mi treba

Da bi uspeo u životu čovek mora imati dve stvari.
Prvo je sreća: to je ono kad se čoveku pruži povoljna prilika.
Drugo je pamet: ona čoveku omogućuje da iskoristi povoljnu priliku.
Ogledalo čoveka je njegov rad.

Poslovice naroda sveta

Ova doktorska disertacija urađena je u laboratoriji za instrumentalnu analitičku hemiju i fizičku hemiju Odseka za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu.

Sam rad ne bi nastao bez pomoći mnogih. Izradom ove disertacije rukovodila je dr Snežana Mitić, redovni profesor PMF-a u Nišu, koja me je daleke 1999. godine i uvela u oblast kinetičkih metoda analize. Njeni saveti, primedbe i sugestije tokom razrade metoda doprinele su veoma mnogo kvalitetu disertacije. Ovom prilikom joj se najsrdačnije zahvaljujem na divnoj saradnji i razumevanju..

Takođe, dugujem zahvalnost i dr Gordani Miletić, redovnom profesoru PMF-a u Nišu, kao i dr Biljani Kaličanin, docentu Medicinskog fakulteta u Nišu što su se rado prihvatile ocene ovog rada.

Želela bih da zahvalim dragoj prijateljici i koleginici, mr Snežani Tošić, na godinama prijatnog i timskog rada i radosti zajedničkih "bitaka" koje smo vodile.

Zahvaljujem se farmaceutskoj kući Galenika a.d., Beograd na tehničkoj pomoći.

Neizostavna je bila pomoć i razumevanje supruga i roditelja.

Sadržaj

1. UVOD.....11

2. TEORIJSKI DEO

2.1. Analgetici - opšte osobine.....13

2.1.1. Diklofenak.....14

2.1.1.1. Metode za određivanje diklofenaka.....15

2.1.2. Acetilsalicilna kiselina.....16

2.1.2.1. Metode za određivanje acetilsalicilne kiseline.....18

2.1.3. Ibuprofen.....19

2.1.3.1. Metode za određivanje ibuprofena.....20

2.2. Sedativi - opšte osobine.....22

2.2.1. Dimenhidrinat.....23

2.2.1.1. Metode za određivanje dimenhidrinata.....24

2.2.2. Klonazepam.....25

2.2.2.1. Metode za određivanje klonazepama.....26

2.2.3. Diazepam.....27

2.2.3.1. Metode za određivanje diazepama.....28

2.3. Kinetičke metode analize.....30

2.3.1. Hemijska kinetika–teorijske osnove.....30

2.3.2. Metode određivanja sadržaja analizirajućih supstanci u rastvoru na osnovu kinetičkih podataka.....32

2.3.3. Karakteristike kinetičkih metoda analize.....37

2.3.4. Reakcije izmene liganda i obrazovanja kompleksa, "ligand-exchange" reakcije…….....42

2.4. Regresiona i korelaciona analiza.....45

2.4.1. Regresiona analiza.....46

2.4.2. Korelaciona analiza.....48

2.5. Hromatografija.....49

2.5.1. HPLC hromatografija.....49

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Program i metodika rada……56

3.2. Eksperimentalni postupak.....57

3.2.1. Aparati…….....57

3.2.2. Reagensi…….....57

3.2.3. Spektrofotometrijski postupak za praćenje brzine indikatorske reakcije.....58

3.2.4. Priprema uzoraka za analizu……59

3.3. Izbor indikatorske reakcije..……...65

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Kinetičko određivanje mikrokoličina diklofenaka.....68

4.4.1. Određivanje optimalnih koncentracija.....68

4.4.2. Termodinamičke karakteristike sistema.....74

4.4.3. Tačnost i reproduktivnost određivanja diklofenaka.....77

4.4.4. Selektivnost određivanja diklofenaka.....78

4.4.5. Primena kinetičke metode za određivanje diklofenaka u farmaceutskim preparatima i humanom kontrolnom serumu.....79

4.2. Kinetičko određivanje mikrokoličina acetilsalicilne kiseline.....83

4.2.1. Određivanje optimalnih koncentracija.....83

4.2.2. Termodinamičke karakteristike sistema.....89

4.2.3. Tačnost i reproduktivnost određivanja acetilsalicilne kiseline.....91

4.2.4. Selektivnost određivanja acetilsalicilne kiseline.....92

4.2.5. Primena kinetičke metode za određivanje acetilsalicilne kiseline u farmaceutskim preparatima i humanom kontrolnom serumu.....93

4.3. Kinetičko određivanje mikrokoličina ibuprofena.....97

4.3.1. Određivanje optimalnih koncentracija.....97

4.3.2. Termodinamičke karakteristike sistema.....105

4.3.3. Tačnost i reproduktivnost određivanja ibuprofena.....107

4.3.4. Selektivnost određivanja ibuprofena.....108

4.3.5. Primena kinetičke metode za određivanje ibuprofena u farmaceutskim preparatima i humanom kontrolnom serumu.....109

4.4. Kinetičko određivanje mikrokoličina dimenhidrinata.....113

4.4.1. Određivanje optimalnih koncentracija.....113

4.4.2. Termodinamičke karakteristike sistema.....119

4.4.3. Tačnost i reproduktivnost određivanja dimenhidrinata.....121

4.4.4. Selektivnost određivanja dimenhidrinata.....122

4.4.5. Primena kinetičke metode za određivanje dimenhidrinata u farmaceutskim preparatima i humanom kontrolnom serumu.....123

4.5. Kinetičko određivanje mikrokoličina klonazepama.....126

4.5.1. Određivanje optimalnih koncentracija.....126

4.5.2. Termodinamičke karakteristike sistema.....132

4.5.3. Tačnost i reproduktivnost određivanja klonazepama.....134

4.5.4. Selektivnost određivanja klonazepama.....135

4.5.5. Primena kinetičke metode za određivanje klonazepama u farmaceutskim preparatima i humanom kontrolnom serumu.....136

4.6. Kinetičko određivanje mikrokoličina diazepam.....140

4.6.1. Određivanje optimalnih koncentracija.....140

4.6.2. Termodinamičke karakteristike sistema.....146

4.6.3. Tačnost i reproduktivnost određivanja diazepama.....148

4.6.4. Selektivnost određivanja diazepama.....149

4.6.5. Primena kinetičke metode za određivanje diazepama u farmaceutskim preparatima i humanom kontrolnom serumu.....150

5. ZAKLJUČAK.....155

6. SUMMARY.....167

7. LITERATURA.....179

INDEKS POJMOVA.....184

BIOGRAFIJA SA BIBLIOGRAFIJOM.....187

1. UVOD

Od davnina je poznato da su ljudi za lečenje raznih oboljenja koristili razne biljne i životinjske proizvode koji poseduju lekovite osobine. Tako, na primer, stari narodi koristili su koru vrbovog drveta kao lek protiv bolova i povišene temperature. Tek kasnije (XIX vek) iz kore vrbovog drveta izolovana je salicilna kiselina, čiji derivati su nosioci lekovitih svojstava vrbove kore. Zatim je nađeno da je acetilovana salicilna kiselina, "aspirin", po strukturi i lekovitim osobinama najbliža prirodnim derivatima, pa je izvršena laboratorijska a kasnije i industrijska sinteza aspirina i od tada (kraj XIX veka) počela je velika primena ovog sintetičkog leka.

U razvoju lekovitih supstanci hemija ima presudnu ulogu, jer je veliki broj lekova koje danas koristimo prvo otkriven u nekom prirodnom materijalu, zatim hemijski definisan i farmakološki proučen, pa tek onda stavljen na raspolaganje i korišćenje.

Imajući u vidu da je pojam leka vrlo teško razgraničiti od pojma otrova, jer je očigledno da ista supstanca, pod različitim uslovima, može delovati i kao lek i kao otrov, nije potrebno posebno isticati važnost praćenja sadržaja aktivnih supstanci u farmaceutskim preparatima i biološkim uzorcima.

Sama doktorska disertacija bi bila originalan naučni rad iz oblasti kinetičko-spektrofotometrijskog određivanja mikro količina analgetika: derivata salicilne, propionske, aminofenilacetatne kiseline (acetilsalicilna kiselina, ibuprofen, dikolofenak) i sedativa: derivata etanolamina i benzodiazepina (dimenhidrinat, klonazepam, diazepam) u biološkim uzorcima i farmaceutskim preparatima. Imajući u vidu da mnogi farmaceutski preparati imaju rok trajanja i da se mogu hemijski promeniti u toku čuvanja, kvantitativna analiza aktivnih komponenti je od značaja i predstavlja sastavni deo kontrole lekova. Takođe, vremenom dolazi do gubitka aktivnog dejstva leka i njegove smanjene aktivnosti, a u nekim slučajevima i pojave toksičnih efekata. Pri proceni potencijalne opasnosti koju lekovi mogu predstavljati po zdravlje ljudi potrebno je imati u vidu više faktora kao što su količina unetog leka, njegova resorpcija, metabolizam, način izlučivanja itd. Štetna dejstva nekih lekova su konstatovana posle njihove terapijske primene u vidu različitih toksičnih efekata. Ispitivanja na eksperimentalnim životinjama i njihovim embrionima su pokazala da neki lekovi mogu da imaju kancerogeno, mutageno i teratogeno delovanje.

S obzirom na to da je sve veća upotreba (i zloupotreba) lekova, postoji stalna potreba za razvojem novih, osetljivih analitičkih metoda kojima mogu da se detektuju i na taj način kontrolišu aktivne supstance i proizvodi njihovog raspadanja u farmceutskim preparatima i u uzorcima biološkog porekla. Kinetičke metode hemijske analize pružaju široke mogućnosti za relativno brzo i dovoljno selektivno odredjivanje niskih koncetracija različitih supstanci u rastvoru. Uz to, one ne zahtevaju skupu opremu i uglavnom koriste lako dostupne reagense, što ih čini pristupačnim za analizu u laboratorijskim uslovima.

Cilj ove disertacije bio je razrada novih kinetičko-spektrofotometrijskih metoda za određivanje analgetika (diklofenak, acetilsalicilna kiselina, ibuprofen) i sedativa (dimenhidrinat, klonazepam, diazepam) kao i primena razrađenih metoda u cilju analize pomenutih aktivnih komponenti u farmaceutskim preparatima i biološkom materijalu.

2. TEORIJSKI DEO

2.1. Analgetici - opšte osobine

Analgetici su lekovi koji u većoj ili manjoj meri otklanjaju bol.

Bol je opšte iskustvo afektivnog života čoveka i osećaj koji služi da čoveka upozori na opasnosti koje mu prete. Međutim stalan bol ili bol prouzrokovan u cilju odbrane od bolesti nepoželjan je i treba ga suzbijati. Savremena farmakoterapija raspolaže velikim brojem raznih analgetika, ali idealan analgetik još uvek predstavlja predmet mnogobrojnih istraživanja u tom polju. Problem je u tome što snažni analgetici često izazivaju naviku (toksikomanija) i nastojanja su usmerena u pravcu eliminisanja ove štetne osobine. Pravilna primena ovih lekova je povezana sa profesionalnom odgovornošću medicinskog osoblja, ali je ona takođe regulisana i posebnim zakonom.

Idealan analgetik treba da ispunjava sledeće uslove:

- da deluje protiv svih vrsta bolova,
- da nema neželjenih dejstava,
- da pri ponovljenoj upotrebi ne dovodi do tolerancije,
- da ne izaziva toksikomaniju i
- da je efikasan kada se primeni na bilo koji način, a naročito oralno.

Analgetici se dele u dve velike grupe:

- narkoanalgetike i
- analgoantipiretike.

U grupu narkoanalgetika spadaju:

- alakaloidi opijuma i njihovi polusintetski derivati: morfin, kodein, diacetilmorfin (heroin) i dr.,
- sintetski analgetici, zamena za prirodne alkaloide iz opijuma: petidin i metadon.

Analgoantipiretici se prema strukturi dele na:

- derivate salicilne kiseline,
- derivate para-amino fenola i
- derivate pirazolona.

Veliki broj jedinjenja iz grupe analgoantipiretika koriste se kao antireumatici-sredstva za lečenje reumatizma. U terapiji reumatskih bolesti koriste se dve velike grupe lekova:

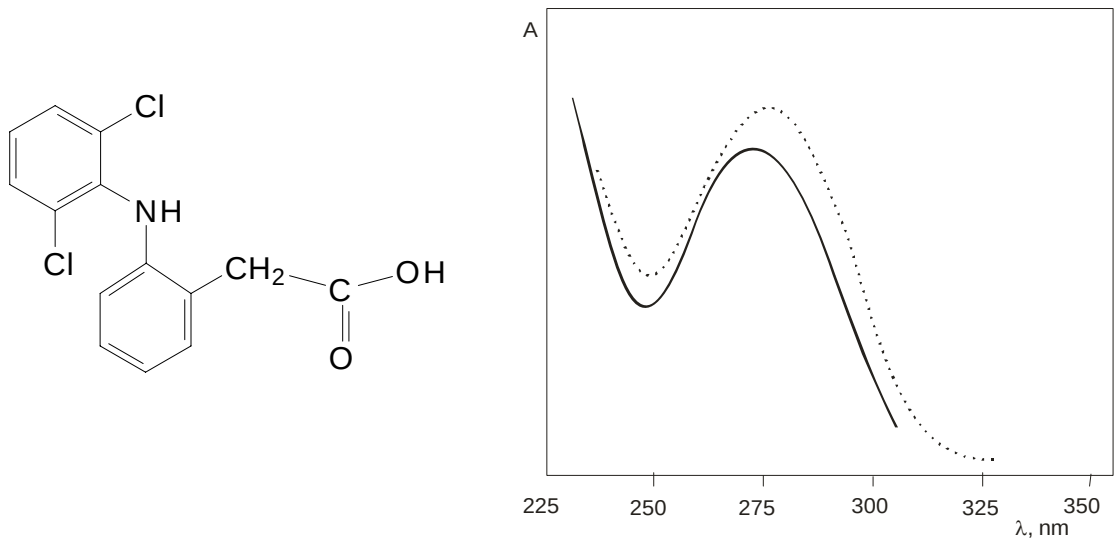
- steroidni hormoni (glikokortikoidi) i

- nesteroidni antiinflamatorni lekovi: salicilati, pirazoloni, ibuprofen i njegovi derivati (fluribiprofen, ketoprofen i dr.), indometacin i njegovi derivati, mefenaminska kiselina, diklofenak i piroksikam.

Narkoanalgetici imaju veoma jako analgetsko dejstvo, dok analgoantipiretici postižu znatno niži maksimalni efekat. Obe grupe analgetika suzbijaju podmukle i duboke bolove.[1-4]

2.1.1. Diklofenak

Dikolofenak (D), 2-[(2,6-dihloroanilino)fenil]acetat, je derivat aminofenil acetatne kiseline (slika 1). Najčešće je u obliku Na- ili K- soli. Te dve soli imaju različitu rastvorljivost. Kalijumova so diklofenaka je rastvorljivija od natrijumove soli, pa se učinak lekova sa kalijumovom soli javlja brže nego sa natrijumovom. To je beo, kristalan prah, slabo rastvoran u vodi i acetonu, dobro rastvoran u etanolu (96%) i metanolu, praktično nerastvoran u 1 M natrijum-hidroksidu. Spada u grupu nesteroidnih antiinflamatornih lekova. To je jedan od najpopularnijih nesteroidnih antireumatika i njegova potrošnja je izuzetno velika. Deluje izrazito antireumatički, analgetički, antiflogistički i antipiretički. Primenjuje se u terapiji upalnih i degenerativnih reumatskih obolenja. Nakon oralne primene, vrlo brzo se resorbuje iz digestivnog trakta, i to utoliko brže ukoliko je unesen na prazan želudac, i veže se preko 99% za proteine plazme. Izlučuje se u obliku metabolita uglavnom mokraćom, neznatni deo putem žuči. Neželjeni efekti su retki, blagi i najčešće prolazni. Najučestaliji su od strane gastrointestinalnog trakta (mučnina, povraćanje, abdominalni bol...), centralnog nervnog sistema (glavobolja, vrtoglavica, retko pospanost), kože (osip), hipersenzitivnost (retko astma, anafilaksija). Duže od 2 meseca ne treba ga uzimati zbog opasnosti od oštećenja jetre i bubrega.



Slika 1. Hemijska struktura diklofenaka i UV spektar vodenog rastvora:
— kisela sredina (273 nm),⋯ bazna sredina (275 nm)

2.1.1.1. Metode za određivanje diklofenaka

Za određivanje diklofenaka korišćene su različite metode kao što su gravimetrija, spektrofotometrija, fluorimetrija, "solid phase" spektrometrija (SPS), elektroforeza, potenciometrija, reflektometrija, tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC), tankoslojna hromatografija (TLC), tečna tandem masena hromatografija (LC/MS). Pregled nekih metoda za određivanje diklofenaka dat je u tabeli 1.

Britanska[5] i Američka farmakopeja[6] iz 2005., odnosno 2004. godine, daju postupak određivanja diklofenaka potenciometrijskom titracijom. Takođe je opisano i određivanje diklofenaka korišćenjem tečne hromatografije sa UV detekcijom na 254 nm.

Tabela 1. Metode za određivanje diklofenaka

Metoda	**Opseg linearnosti**	**Granica detekcije (LOD)**	**Uzorak**	**Ref.**
Gravimetrija	tablete, 50 mg ampule, 75 mg	/	farm. preparati	7.
Spektrofotometrija	25-125 mg cm^{-3}	/	farm. preparati	8.
	1,0-25,0 mg cm^{-3}	0,2 mg cm^{-3}	farm. preparati	9.
	1,0-30,0 mg dm^{-3}	0,46 mg dm^{-3}	farm. preparati	10.
Fluorimetrija	0,00-5,00 μg cm^{-3}	0,03 μg cm^{-3}	farm. preparati	11.
	0,2-5,0 mg dm^{-3}	0,2 mg dm^{-3}	farm. preparati	12.
	$1\cdot10^{-6}$-$1\cdot10^{-4}$ M	$6\cdot10^{-7}$ M	farm. preparati	13.
	124,3-600 ng cm^{-3}	72,7 ng cm^{-3}	farm. preparati	14.
SPS	0,40-5,75 μg cm^{-3}	0,086 μg cm^{-3}	farm. preparati	15.
	2,0-40,0 μg cm^{-3} 1,0-22,0 μg cm^{-3} 0,5-14,0 μg cm^{-3}	0,44 μg cm^{-3} 0,24 μg cm^{-3} 0,13 μg cm^{-3}	farm. preparati	16.
Elektroforeza	$1\cdot10^{-6}$-$1\cdot10^{-3}$ M	$1\cdot10^{-6}$ M	humani serum	17.
	25-500 μg dm^{-3}	9 μg dm^{-3}	vode	18.
	0,25-4 mg dm^{-3}	0,03 mg dm^{-3}	humani serum	19.
	0,6-10,5 μg cm^{-3}	0,26 μg cm^{-3}	goveđi serum	20.

Potenciometrija	$5 \cdot 10^{-6}$-$1 \cdot 10^{-2}$ M	$2 \cdot 10^{-6}$ M	farm. preparati	13.
Reflektometrija	1,0-18,0 mg cm^{-3}	0,7 mg cm^{-3}	farm. preparati	21.
HPLC	10-50 mg dm^{-3}	2,225 mg dm^{-3}	farm. preparati	22.
	/	0,29 mg dm^{-3}	površinske vode	23.
	10-50 μg cm^{-3}	0,300 μg cm^{-3}	farm. preparati	24.
	4-20 μg cm^{-3}	0,84 μg cm^{-3}	farm. preparati	25.
TLC	$(1,0\text{-}5,0) \cdot 10^{-5}$ M	1,2 μg cm^{-3}	farm. preparati	24.
LC/MS	10–250 μg dm^{-3}	3 μg dm^{-3}	rečna voda	26.
	1-50 μg cm^{-3}	0,345 μg cm^{-3}	farm. preparati	27.

2.1.2. Acetilsalicilna kiselina

Acetilsalicilna kiselina (ASA), aspirin, sadrži od 99,5% do 101,0% 2-(acetoksi)benzoeve kiseline, izračunato u odnosu na osušenu supstancu (slika 2). Ona je najpoznatiji analgoantipiretik. Dobija se sintetički, acetilovanjem salicilne kiseline. Ima oblik bezbojnih, sitnih i igličastih ili listastih kristala ili belog kristalnog praška, jedva primetnog mirisa na acetatnu kiselinu i slabo kiselog ukusa. Acetilsalicilna kiselina je teško rastvorljiva u vodi, lako rastvorljiva u alkoholu, umereno rastvorljiva u etru. Topi se na oko 143°C. Čuva se u dobro zatvorenoj posudi, na suvom mestu, zaštićena od svetlosti jer se lako razgrađuje, pri čemu oslobađa acetatnu kiselinu, a dekarboksilacijom i fenol.

To je najprodavaniji i najkorišćeniji lek na svetu. Acetilsalicilna kiselina svoje ime i poreklo duguje jednom drugom jedinjenu, a to je salicin. U pitanju je glukozid koji u svojoj stukturi sadrži i salicilnu kiselinu, a nalazi se u kori bele vrbe (*Salix alba*). Zbog toga se vrbova kora vekovima koristila kao analgetik i antipiretik, spominje se u staroegipatskoj medicini, a o njoj je pisao i Hipokrat.

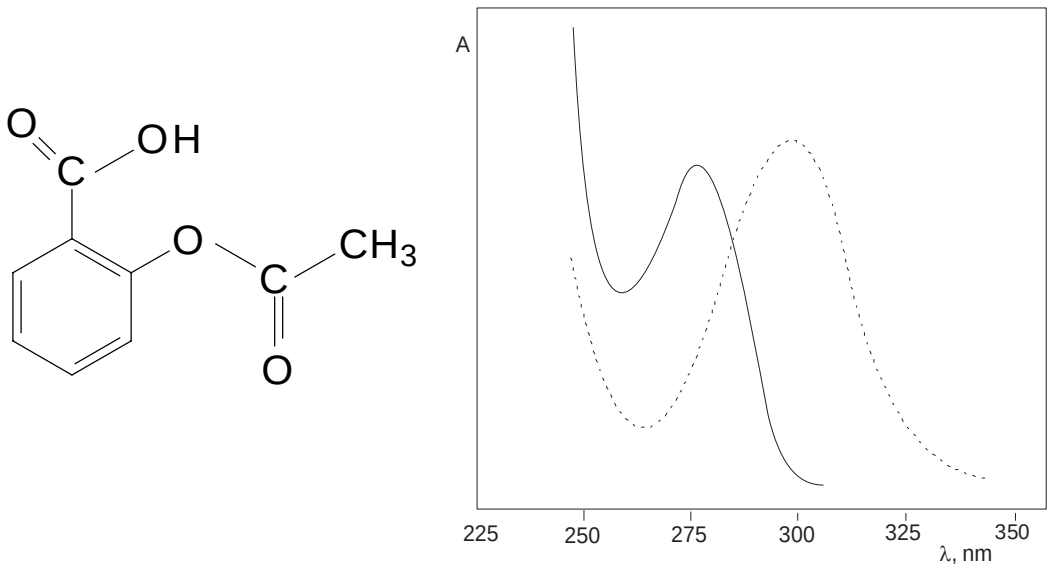
Međutim, acetilsalicilnu kiselinu je sintetisao 1897. godine dr Felix Hoffman, hemičar, radnik farmaceutske firme Bayer. Ta fabrika je ubrzo lansirala acetilsalicilnu kiselinu pod trgovačkim nazivom Aspirin i on je postao najpoznatiji lek na svetu. Najpre je Aspirin prodavan isključivo u apotekama u bočicama koje su sadržavale 250 g acetilsalicilne kiseline u obliku praha, ili u obliku papirnih vrećica od 1 g. Tek kasnije su se pojavile tablete koje su sadržavale 500 mg acetilsalicilne kiseline. 1953. godine je primećeno da acetilsalicilna kiselina smanjuje rizik nastanka kardiovaskularnih bolesti, tako da acetilsalicilna kiselina postaje i kardiološki lek.

Godine 1997. acetilsalicilna kiselina je slavila svoj 100-ti rođendan. Kroz tih 100 godina Aspirin je postao sinonim za lek u obliku tablete.

Acetilsalicilna kiselina je antipiretik i analgetik, u većim dozama ona je i pouzdani antireumatik. Dokazano je da pri uzimanju acetilsalicilne kiseline nastaju mikroskopska oštećenja sluznice želuca i manja krvarenja. Uzimanjem acetilsalicilne kiseline sa dosta tečnosti ili sa antacidima ili puferima, takve smetnje se smanjuju.

Već u toku procesa resorpcije acetilsalicilna kiselina se brzo deacetiluje, a taj se proces dovrši tokom prvog prolaska kroz jetru. U krvi, likvoru i sinovijalnoj tečnosti može se naći samo posle unošenja velikih doza. U cirkulaciji sa nalazi samo metabolit salicilna kiselina, i ona je vezana za proteine plazme 66-98%. Kinetika eliminacije salicilne kiseline je dozno zavisna, jer je ograničava kapacitet enzima jetre: poluvreme eliminacije antitrombocitnih doza je 2-3 sata, a posle primene velikih analgetičkih doza do 12 sati. Glavni metaboliti salicilne kiseline su njen glicinski konjugat salicilurna kiselina, etarski i estarski glukuronidi salicilne kiseline, gentizinska kiselina i njen glicinski konjugat. Salicilna kiselina i njeni metaboliti sa pretežno izlučuju preko bubrega.

Kao neželjena dejstva mogu da se jave gastrointestinalne tegobe: muka, gorušica, povraćanje, bol u stomaku i krvarenje. Zbog gubitka krvi izuzetno se može razviti anemija. Moguća su retka oštećenja jetre i funkcije bubrega, hipoglikemija i teže reakcije po koži. Vrtoglavica i zujanje u ušima se mogu javiti kao znaci predoziranja, naročito kod dece i starih osoba. Takođe, acetilsalicilnu kiselinu je najstrožije zabranjeno davati deci mlađoj od 12 godina zbog velike mogućnosti pojave opasnog Reyev-og sindroma.



Slika 2. Hemijska struktura acetilsalicilne kiseline i UV spektar vodenog rastvora: — kisela sredina (278 nm),···· bazna sredina (298 nm)

2.1.2.1. Metode za određivanje acetilsalicilne kiseline

Za određivanje acetilsalicilne kiseline korišćene su različite metode kao što su spektrofotometrija, fluorimetrija, FT-Ramanska spektroskopija, FT-IR/ATR spektroskopija, kapilarna elektroforeza (CE), potenciometrija, reflektometrija, tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC), tečna tandem masena hromatografija (LC/MS). Pregled nekih metoda za određivanje acetilsalicilne kiseline dat je u tabeli 2.

Britanska[5] i Američka farmakopeja[6] iz 2005., odnosno 2004. godine, daju postupak određivanja acetilsalicilne kiseline volumetrijskom titracijom sa hlorovodoničnom kiselinom uz fenolftalein kao indikator. Takođe je opisano i određivanje acetilsalicilne kiseline korišćenjem tečne hromatografije sa UV detekcijom na 237 nm.

Tabela 2. Metode za određivanje acetilsalicilne kiseline

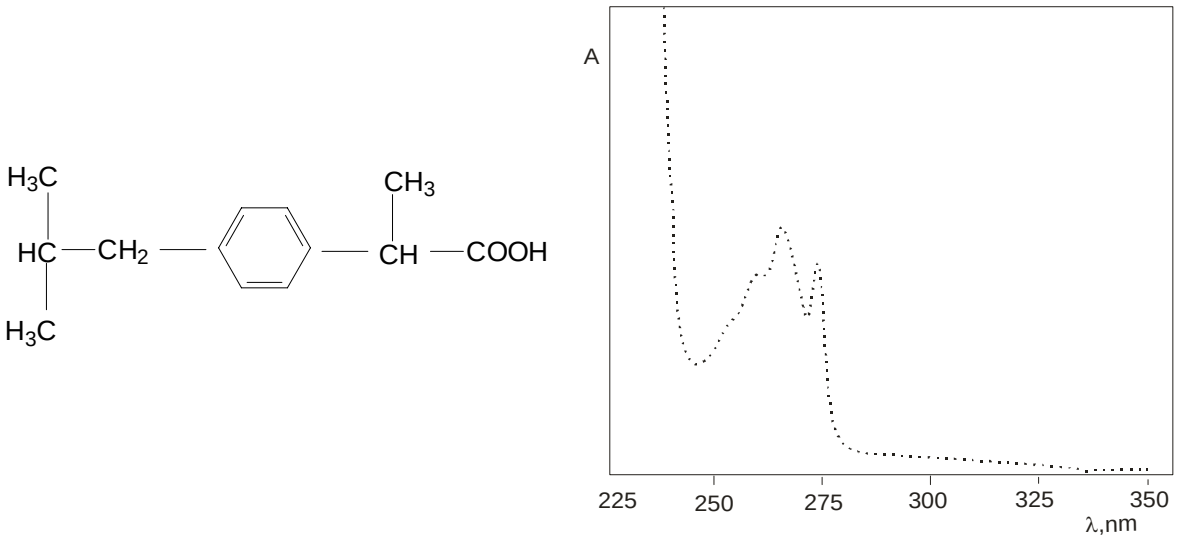
Metoda	**Opseg linearnosti**	**Granica detekcije (LOD)**	**Uzorak**	**Ref.**
Spektrofotometrija	0,2-103,2 μg cm^{-3}	0,2 μg cm^{-3}	farm. preparati	28.
	5,0-200,0 μg cm^{-3}	/	farm. preparati	29.
	10,0-15,0 μg cm^{-3}	/	farm. preparati	30.
Fluorimetrija	/	10^{-7} M	farm. preparati	31.
	25-250 μg cm^{-3}	4,0 μg cm^{-3}	farm. preparati	32.
	0,021-41,62 μg cm^{-3}	0,0013 μg cm^{-3}	farm. preparati	33.
FT-Ramanska spektroskopija	0,34-0,60 mg	/	farm. preparati	34.
CE	/	1 μg cm^{-3}	humani urin	35.
Potenciometrija	$1\cdot10^{-5}$-$1\cdot10^{-3}$ M	/	farm. preparati	36.
	$5\cdot10^{-3}$-$5\cdot10^{-1}$ M	/	farm. preparati	37.
	$4{,}0\cdot10^{-3}$-$4{,}0\cdot10^{-2}$ M	/	farm. preparati	38.
Reflektometrija	0,0-13,2 mg	0,6 mg	farm. preparati	39.
	0,10-5,00 μg cm^{-3}	0,04 μg cm^{-3}	humana plazma	40.

HPLC	10–500 μM	1 μM	farm. preparati	41.
	100-1000 μg cm^{-3}	0,4 μg cm^{-3}	farm. preparati	42.
	27,8-2222 μM	13,9 μM	farm. preparati serum	43.
LC/MS	0,25-50,0 μg cm^{-3}	0,25 μg cm^{-3}	jetra (pacov)	44.
	5,0-500,0 ng cm^{-3}	5,0 ng cm^{-3}	humana plazma	45.

2.1.3. Ibuprofen

Ibuprofen (IB) sadrži od 98,5% do 101,0% (RS)-2-(4-(izobutilfenil) propionske kiseline, izračunato u odnosu na osušenu supstancu (slika 3). Ibuprofen je nesteroidni analgetik, antiinflamator i antipiretik iz grupe derivata propionske kiseline. To je beo kristalni prašak, gotovo nerastvorljiv u vodi, lako rastvorljiv u acetonu, etru, metanolu i metilenhloridu. Rastvara se u razblaženim rastvorima alkalnih hidroksida i karbonata. Topi se na temperaturi od 75°C do 78°C. Čuva se u dobro zatvorenom kontejneru.

Posle peroralne primene ibuprofen se dobro resorbuje iz gastrointestinalnog trakta. Maksimalne koncentracije u plazmi dostižu se posle 1-2 sata od primene, a u sinovijalnoj tečnosti posle 6 sati. Oko 99 % primenjene doze se vezuje za proteine plazme, poluživot eliminacije je 2 sata, izlučuje se urinom, najvećim delom u obliku neaktivnih metabolita. Ibuprofen prolazi placentalnu barijeru i u maloj količini se izlučuje mlekom. Mehanizam dejstva je inhibicija konstitutivne i inducibilne izoforme enzima ciklooksigenaze-1 (COX-1) i ciklooksigenaze-2 (COX-2), što dovodi do redukcije biosinteze prostanglandina, najznačajnijih medijatora inflamacije, bola i hiperpireksije. Ibuprofen u približnom stepenu inhibira oba izoenzima, što rezultira dobrim antiiflamatornim, analgetičkim i antipiretičkim dejstvom, a umerenim neželjenim dejstvom, posebnom gastrointestinalnim. Ibuprofen efikasno redukuje i kontroliše simptome reumatskih i nereumatskih muskuloskeletnih bolesti i poremećaja, uklanja bolove umerene jačine i snižava telesnu temperaturu kod dece i odraslih. Po tome je vrlo sličan acetilsalicilnoj kiselini. Ibuprofen se dobro podnosi i pri dugotrajnoj primeni. Treba istaći da ibuprofen, iako je dosta korišćen lek, ipak nije sasvim bezazlen. Dugotrajno korišćenje ibuprofena može dovesti do ozbiljnijeg oštećenja jetre ili bubrega. Takođe, kao neželjeni efekti mogu da se jave blage digestivne smetnje ili alergijske reakcije. 2005. godine pojavila se britanska studija koja je upućivala da ibuprofen, poput koksiba, možda povećava rizik srčanog udara. Iako se tada digla velika bura, studija je bila manjkava i nije dokazala svoje tvrdnje.



Slika 3. Hemijska struktura ibuprofena i UV spektar vodenog rastvora:
···· bazna sredina (265 nm, 273 nm)

2.1.3.1. Metode za određivanje ibuprofena

Za određivanje ibuprofena korišćene su različite metode kao što su spektrofotometrija, fluorimetrija, potenciometrija, kapilarno zonska elektroforeza (CZE), tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC), tečna tandem masena (LC/MS) i gasna tandem masena hromatografija (GC/MS). Pregled nekih metoda za određivanje ibuprofena dat je u tabeli 3.

Britanska[5] i Američka farmakopeja[6] iz 2005., odnosno 2004. godine, daju postupak određivanja ibuprofena volumetrijskom titracijom sa natrijum-hidroksidom uz fenolftalein kao indikator. Takođe je opisano i određivanje ibuprofena korišćenjem tečne hromatografije sa UV detekcijom na 214 nm odnosno 254 nm.

Tabela 3. Metode za određivanje ibuprofena

Metoda	**Opseg linearnosti**	**Granica detekcije (LOD)**	**Uzorak**	**Ref.**
Spektrofotometrija	10-40 μg cm^{-3}	/	farm. preparati	46.
	0,5-3,2 mg cm^{-3}	/	farm. preparati	47.
	0-600 mg cm^{-3}	/	farm. preparati	48.
	300-1300 μg cm^{-3}	60 μg cm^{-3}	farm. preparati	49.

	2,4-12 μg cm^{-3}	0,17 μg cm^{-3}	farm. preparati	50.
Fluorimetrija	2-73 mg dm^{-3}	/	farm. preparati	51.
	4,7-58 μg cm^{-3} 5-70 μg cm^{-3}	1,6 μg cm^{-3}	farm. preparati serum	52.
	6,0-60,0 mg dm^{-3}	4,5 mg dm^{-3}	farm. preparati	53.
Potenciometrija	1-10 mg	/	farm. preparati	54.
	$1 \cdot 10^{-2}$-$2 \cdot 10^{-5}$ M	0,8-1,3 μg cm^{-3}	farm. preparati	55.
	$1 \cdot 10^{-4}$-$1 \cdot 10^{-1}$ M	$4 \cdot 10^{-5}$ M	farm. preparati	56.
	$5,0 \cdot 10^{-5}$-$1,0 \cdot 10^{-1}$ M	$3,8 \cdot 10^{-5}$ M	farm. preparati	57.
CZE	2-500 mg dm^{-3}	0,5 mg dm^{-3}	farm. preparati	58.
HPLC	0,1-50,0 μg cm^{-3}	0,1 μg cm^{-3}	humana plazma	59.
	10-80 μg cm^{-3}	/	farm. preparati	60.
	/	0,77 mg dm^{-3}	površinske vode	23.
	10-50 μg cm^{-3}	0,800 μg cm^{-3}	farm. preparati	24.
LC/MS	0,7-94,0 ng dm^{-3}	/	česmenska voda	61.
	/	0,0025-0,2 μg cm^{-3}	humana plazma	62.
	/	3-5 ng dm^{-3}	površinske i otpadne vode	63.
	0,1-50 μg cm^{-3}	0,035-1,0 ng cm^{-3}	farm. preparati	64.
GC/MS	/	0,4-2,5 ng dm^{-3}	otpadne vode	65.
	/	1-18 ng dm^{-3}	otpadne vode	66.
	/	< 5 ng dm^{-3} < 10 ng dm^{-3}	česmenska voda rečna voda	67.

2.2. Sedativi - opšte osobine

Lek sa sedativnim (anksiolitičkim) dejstvom smanjuje anksioznost i prouzrokuje umirenje, a da pri tome ne menja mentalne i motorne funkcije centralnog nervnog sistema. Nasuprot tome, lek sa hipnotočkim dejstvom prouzrokuje pospanost, a zatim i san i održavanje stanja sna. Ovo spavanje treba što je moguće više da liči na prirodni san.

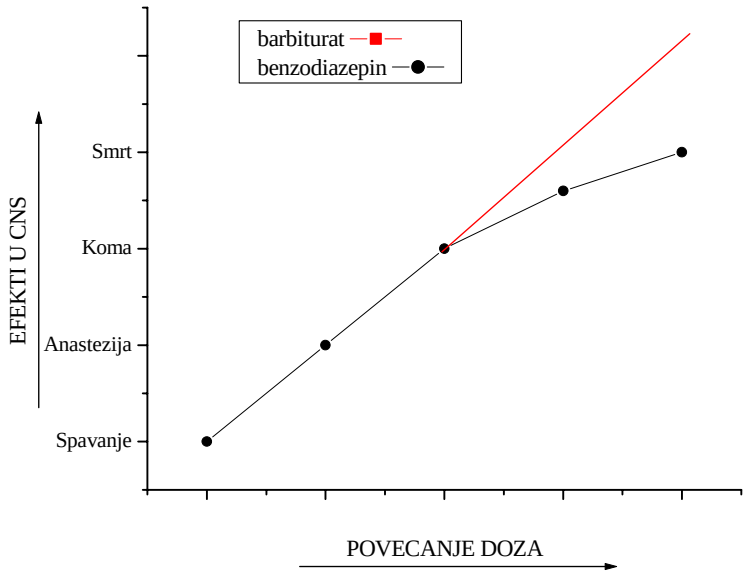
Sedativi (anksiolitici) prouzrokuju manji stepen depresije centralnog nervnog sistema, dok je kod hipnotika ta depresija jača.

U grupu sedativa spadaju benzodiazepini. U grupu derivata benzodiazepina spadaju:

- diazepam (Bensedin)
- lorazepam (Loram)
- alprazolam (Ksalol)
- bromazepam (Lexilium)
- klorazepat (Tranex)
- prazepam (Demetrin)

Sedativi kao i hipnotici, svojim dejstvom na centralni nervni sistem prouzrokuju: anksiolizu, sedaciju, san, opštu anesteziju (posebno barbiturati), blagu relaksaciju skeletnih mišića (posebno benzodiazepini), a u dovoljno velikim dozama deluju antikonvulziono. Razlika u odnosu doza i efekata između barbiturata i benzodiazepina prikazana je na slici 4. Male doze barbiturata prouzrokuju samo umirenje, nešto veće doze prouzrokuju san, još veće doze opštu anesteziju, a najveće komu i smrt. Ovde je odnos doze i efekata pravolinijski. Nasuprot barbituratima, velike doze benzodiazepina ne prouzrokuju komu i opštu anesteziju, a to znači da se odnos doze i efekata kod benzodiazepina ne odigrava pravolinijski, što je njihovo veliko preimućstvo nad barbituratima.

Najopasnija interakcija benzodiazepina je sa alkoholom, jer se može završiti dubokom depresijom centralnog nervnog sistema i smrću. Uznemirena osoba pod dejstvom alkohola ne sme se smirivati benzodiazepinima, i obrnuto, osoba koja se leči benzodizepinima ne sme uzimati alkoholna pića.

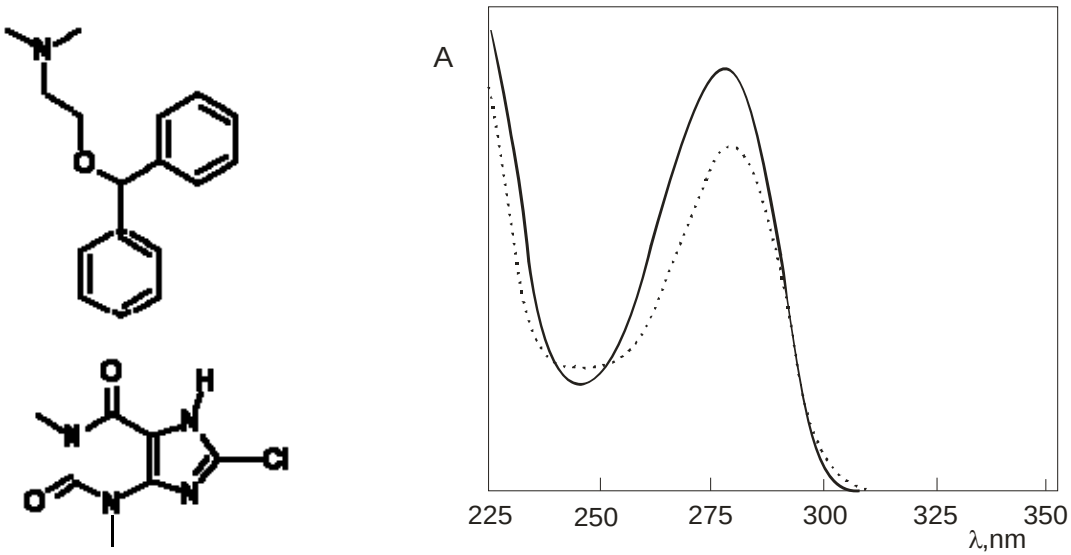


Slika. 4. Razlika u odnosu doza i efekata između barbiturata i benzodiazepina

2.2.1. Dimenhidrinat

Dimenhidrinat (DMH) sadrži od 53,0% do 55,5% difenhidramina (2-(difenilmetoksi)-N,N-dimetiletilamin) i od 44,0% do 46,5% 8-hlorteofilina (8-hlor-3,7-dihidro-1,3-dimetil-1H-purin-2,6-dion) (slika 5). Hemijski, dimenhidrinat je so difenhidramina i 8-hloroteofilina. To je beo kristalni prašak, teško rastvorljiv u vodi, lako rastvorljiv u alkoholu, slabo rastvorljiv u etru. Topi se na temperaturi od 102°C do 106°C.

Dimenhidrinat je sedativni H_1 (receptori se nalaze u glatkim mišićima) antihistaminik koji ublažava mučninu i vrtoglavicu kod kinetoza, tj. bolesti kretanja. Naime, kod bolesti vožnje dolazi do nadražaja vestibularnog aparata u unutrašnjem uhu, što uzrokuje mučninu i povraćanje. Kao H_1 antihistaminik deluje depresivno na centralni nervni sistem. Kao neželjena reakcija najčešće se javlja pospanost. Kod dece se paradoksalno može javiti i ekscitacija (nesanica, nervoza, nemir). Ostali neželjeni efekti uključuju glavobolju, zamagljen vid, zujanje u ušima, suvoću usta, lupanje srca, vrtoglavicu i pad krvnog pritiska. Ređe se javljaju zatvor ili dijareja i otežano mokrenje. Oprez je potreban kod pacijenata s epilepsijom i kod trudnica.



Slika 5. *Hemijska struktura dimenhidrinata i UV spektar vodenog rastvora: — kisela sredina (276 nm),···· bazna sredina (278 nm)*

2.2.1.1. Metode za određivanje dimenhidrinata

Za određivanje dimenhidrinata korišćene su različite metode kao što su spektrofotometrija, "solid-phase" spektrometrija (SPS), striping voltametrija, tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC), tečna tandem Furierova infracrvena spektrometrija (HPLC/FT-IR), tečna tandem masena (LC/MS). Pregled nekih metoda za određivanje dimenhidrinata dat je u tabeli 4.

Britanska[5] i Američka farmakopeja[6] iz 2005. odnosno 2004. godine daju postupak određivanja dimenhidrinata volumetrijskom titracijom sa hlorovodoničnom kiselinom uz metil crveno kao indikator. Takođe je opisano i određivanje dimenhidrinata korišćenjem tankoslojne hromatografije.

Tabela 4. Metode za određivanje dimenhidrinata

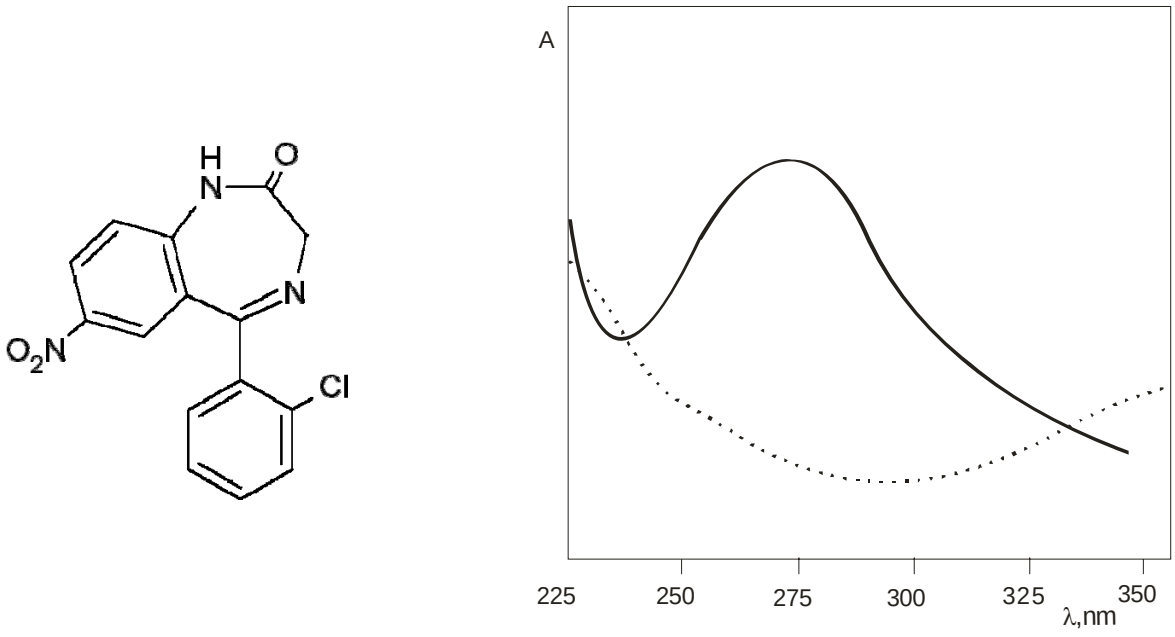
Metoda	Opseg linearnosti	Granica detekcije (LOD)	Uzorak	Ref.
Spektrofotometrija	200-1000 μg cm^{-3}	/	farm. preparati	68.
SPS	1,0-6,0 μg cm^{-3}	/	farm. preparati	69.
Striping voltametrija	$2\cdot10^{-8}$-$2\cdot10^{-7}$ M	$1\cdot10^{-8}$ M	farm. preparati	70.
HPLC	/	25 ng/500 μL	serum	71.

	0-1,3 mg cm^{-3}	< 0,001 mg cm^{-3}	farm. preparati	72.
HPLC/FT-IR	/	> 1 ng cm^{-3}	model sistem	73.
LC/MS	0,4-200,0 ng cm^{-3}	0,4 ng cm^{-3}	humana plazma	74.
	1-500 ng cm^{-3}	1 ng cm^{-3}	plazma	75.

2.2.2. Klonazepam

Klonazepam (KZP) sadrži od 99,0% do 101,0% 5-(2-hlorfenil)-7-nitro-2,3-dihidro-1H-1,4-benzodiazepin-2-on, izračunato u odnosu na osušenu supstancu (slika 6). Spada u grupu benzodiazepina. To je bledoložućkast, kristalan prašak, praktično nerastvorljiv u vodi, rastvorljiv u etanolu i metanolu, vrlo teško rastvorljiv u etru. Topi se na oko 239°C. Čuva se u dobro zatvorenom kontejneru, zaštićeno od svetlosti.

Klonazepam ima antikonvulzivno dejstvo, što znači da sprečava nastavak konvulzija (epileptičnih grčeva). Najčešći neželjeni efekti klonazepama su: umor, pospanost, ošamućenost, vrtoglavica, smanjen tonus mišića. Poremećaji kordinacije su uglavnom prolaznog karaktera i spontano nestaju tokom lečenja ili smanjenjem doze. Mogu se javiti i slaba koncentracija, nemir, konfuzija i dezorjentacija. Kod pacijenata lečenih klonazepamom može se javiti depresija, ali takođe može biti posledica osnovne bolesti.



Slika 6. Hemijska struktura klonazepama i UV spektar:
— u vodi (kisela sredina, 273 nm),···· u metanolu

2.2.2.1. Metode za određivanje klonazepama

Za određivanje klonazepama korišćene su različite metode kao što su spektrofotometrija, tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC), gasna hromatografija (GC), polarografija, fluorimetrija, potenciometrija. Pregled nekih metoda za određivanje klonazepama dat je u tabeli 5.

Britanska[5] i Američka[6] farmakopeja iz 2005., odnosno 2004. godine, daju postupak određivanja klonazepama potenciometrijskom titracijom sa perhlornom kiselinom. Takođe je opisano i određivanje klonazepama korišćenjem tečne hromatografije sa UV detekcijom na 254 nm (Britanska farmakopeja).

Tabela 5. Metode za određivanje klonazepama

Metoda	**Opseg linearnosti**	**Granica detekcije (LOD)**	**Uzorak**	**Ref.**
Spektrofotometrija	1,05-14,70 μg cm^{-3}	/	farm. preparati	76.
	2-20 μg cm^{-3}	1 μg cm^{-3} 0,5 μg cm^{-3}	plazma urin	77.
	2-16 μg cm^{-3}	/	farm. preparati	78.
	63,2-316,0 μg cm^{-3}	63,2 μg cm^{-3}	farm. preparati	79.
	0,316-3,16 μg cm^{-3}	0,13 μg cm^{-3}	farm. preparati urin	80.
HPLC	/	3 ng cm^{-3} 5 ng cm^{-3}	urin plazma	81.
	30-500 ng cm^{-3}	3,5 ng cm^{-3}	krv	82.
	/	52 ng cm^{-3}	krv	83.
	10-200 ng cm^{-3}	/	plazma	84.
	10-200 nmol cm^{-3}	1,6 nmol cm^{-3}	urin	85.
	5-100 ng cm^{-3}	2 ng cm^{-3}	plazma	86.
	10-100 ng cm^{-3}	1 ng cm^{-3}	krv	87.
	0,5-50 ng cm^{-3}	0,5 ng cm^{-3}	plazma	88.
	0,5-3,0 μg cm^{-3}	/	farm. preparati	89.

GC	1-100 ng cm^{-3}	5 ng cm^{-3}	krv	87.
	0,25-25 ng cm^{-3}	0,1 ng cm^{-3}	plazma	90.
	50-200 ng cm^{-3}	5,4 ng cm^{-3}	farm. preparati	91.
Polarografija	$1 \cdot 10^{-7}$-$1 \cdot 10^{-5}$ M	$1,3 \cdot 10^{-8}$ M	farm. preparati	92.
Fluorimetrija	0,03-0,38 μg cm^{-3}	16,47 ng cm^{-3}	farm. preparati urin	80.
Potenciometrija	0,32-31,57 μg cm^{-3}	0,79 μg cm^{-3}	farm. preparati	93.

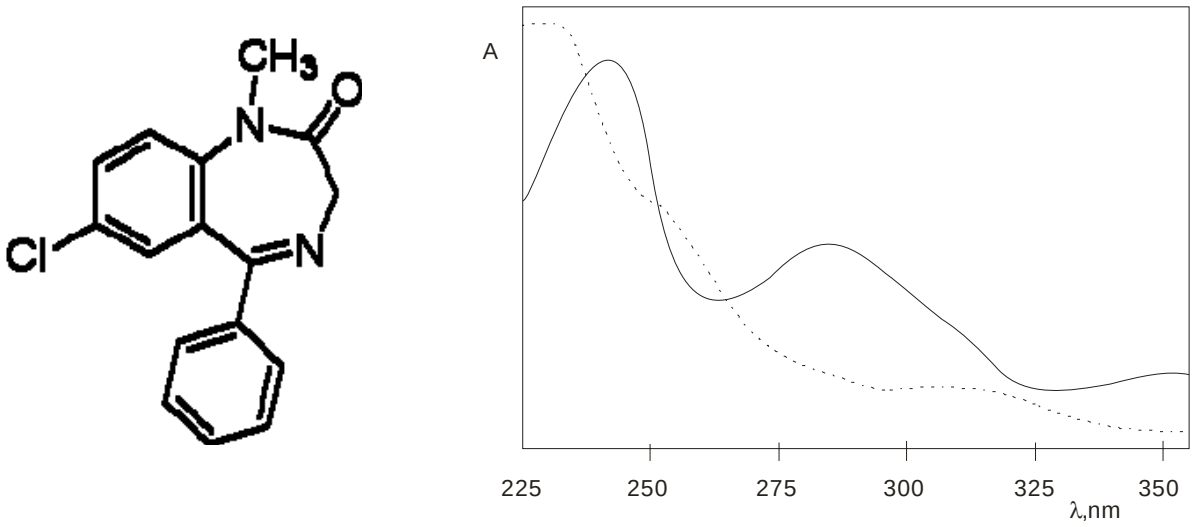
2.2.3. Diazepam

Diazepam (DZP) sadrži od 99,0% do 101,0% 7-hlor-1-metil-5-fenil-2,3-dihidro-1*H*-1,4-benzodiazepin-2-ona, izračunato u odnosu na osušenu supstancu (slika 7). Topi se na temperaturi od 131°C do 135°C. Derivat je benzodiazepina. To je beo do žućkasto beo kristalni prašak, bez mirisa, gorkog ukusa, gotovo nerastvorljiv u vodi, rastvorljiv u alkoholu.

Diazepam se dobro resorbuje u digestivnom traktu. Maksimalna koncentracija u plazmi se pojavljuje nakon 2-4 sata. U telu se dimetiluje i oksiduje, pa se izlučuje polagano, pretežno mokraćom. Diazepam je izraziti anksiolitik, koji odstranjuje osećaj straha. Od svih benzodiazepinskih anksiolitika najviše se koristi upravo diazepam. Posle 1-1,5 sata nakon primene brzo popušta napetost, a vraća se poverenje i emocionalna ravnoteža. Pored toga nastaje relaksacija mišića. Delotovoran je i kod somatskih tegoba, koje su u vezi sa psihičkim smetnjama, kao što su vegetativna distonija, psihosomatske smetnje, epigastične senzacije. U većim dozama deluje antikonvulzivno.

Primenjuje se kod psihičke napetosti, osećaja teskobe, kod spazma skeletne muskulature, kod noćnog straha i somnambulizma kod dece.

Najčešći neželjeni efekti su pospanost, umor, glavobolja, vrtoglavica, mučnina, smetnje vida, smetnje menstruacije, slabljenje pamćenja, kožni osipi. Sanjivost može biti poseban problem, posebno kod onih pacijenata koji prvi put uzimaju benzodiazepinski preparat. Registrovani su i kardiovaskularni neželjeni efekti, kao što su bradikardija, kolaps i hipotenzija. Diazepam ne treba primenjivati u toku graviditeta, posebno u prvom trimestru. S obzirom da se izlučuje u mleko, ne treba ga uzimati za vreme dojenja. Dugotrajna primena može prouzrokovati zavisnost, znakove apstinencije i eventualne konvulzije, što zahteva momentalno prekidanje terapije.



Slika 7. Hemijska struktura diazepama i UV spektar:
— u vodi (kisela sredina, 242, 284, 366 nm),···· u metanolu

2.2.3.1. Metode za određivanje diazepama

Za određivanje diazepama korišćene su različite metode kao što su spektrofotometrija, tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC), tankoslojna hromatografija (TLC), gasna hromatografija (GC), polarografija, fluorimetrija, IR spektroskopija, potenciometrija, "solid-phase" mikro ekstrakcija (SPME), kapilarno zonska elektroforeza (CZE). Pregled nekih metoda za određivanje diazepama dat je u tabeli 6.

Britanska[5] i Američka[6] farmakopeja iz 2005., odnosno 2004. godine, daju postupak određivanja diazepama volumetrijskom titracijom sa perhlornom kiselinom uz nilsko plavo kao indikator.

Tabela 6. Metode za određivanje diazepama

Metoda	Opseg linearnosti	Granica detekcije (LOD)	Uzorak	Ref.
Spektrofotometrija	2-16 μg cm^{-3}	/	farm. preparati	94.
	2,85-28,5 μg cm^{-3}	1,27 μg cm^{-3}	farm. preparati urin	95.
	10-140 μg cm^{-3}	/	farm. preparati	96.
	2-110 mg dm^{-3}	0,6 mg dm^{-3}	farm. preparati	97.
	10-200 ng cm^{-3}	2 ng cm^{-3}	urin	98.

HPLC	30-3000 ng cm^{-3}	/	serum	99.
	250-5000 ng cm^{-3}	2 ng cm^{-3}	serum	100.
	0,06-0,196 mg cm^{-3}	11 μg cm^{-3}	farm. preparati	101.
	10-200 ng cm^{-3}	5 ng cm^{-3}	plazma	102.
	1-500 nM	1 nM	plazma	103.
	10-200 nmol cm^{-3}	3,5 nmol cm^{-3}	urin	104.
	50-1600 ng cm^{-3}	5 ng cm^{-3}	plazma	105.
TLC	25-400 μg cm^{-3}	/	farm. preparati	106.
GC	10-500 ng cm^{-3}	2 μg kg^{-1}	svinjsko meso	107.
	50-200 ng cm^{-3}	5,4 ng cm^{-3}	oralne tečnosti	108.
	5-400 ng mg^{-1}	0,1 ng mg^{-1}	kosa	109.
Polarografija	$3,0 \cdot 10^{-7}$-$3,0 \cdot 10^{-4}$ M	/	serum	110.
	$1,0 \cdot 10^{-7}$-$1,0 \cdot 10^{-5}$ M	$1,0 \cdot 10^{-8}$ M	farm. preparati	111.
	$(5,6\text{-}8,8) \cdot 10^{-6}$ M $8,8 \cdot 10^{-6}$-$2,0 \cdot 10^{-4}$ M	$9,6 \cdot 10^{-9}$ mol dm^{-3}	/	112.
Fluorimetrija	0,03-0,34 μg cm^{-3}	7,13 ng cm^{-3}	farm. preparati urin	94.
	0,5-50 μg cm^{-3}	/	farm. preparati	113.
	0,01-0,125 mg cm^{-3}	0,005 mg cm^{-3}	farm. preparati	114.
IR	0,16-2,14 mg g^{-1}	0,04 mg g^{-1}	farm. preparati	115.
SPME	1-2000 ng cm^{-3} 5-2000 ng cm^{-3}	1,7 ng cm^{-3}	plazma krv	116.
CZE	$(5,6\text{-}8,3) \cdot 10^{-5}$ M	/	farm. preparati	117.
	40-120 μg cm^{-3}	4,24 μg cm^{-3}	farm. preparati	118.

2.3. Kinetičke metode analize

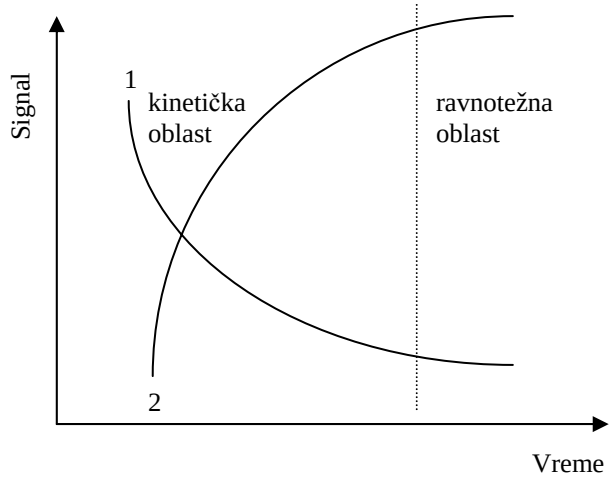
2.3.1. Hemijska kinetika–teorijske osnove

Moderna analitička hemija zasnovana je na primeni širokog spektra metoda koje uključuju fizičke, hemijske ili fizičko-hemijske promene supstanci koje učestvuju u hemijskoj reakciji.

Hemijska reakcija, kao što je poznato, predstavlja proces u kome iz jednih hemijskih vrsta, reaktanata, nastaju druge hemijske vrste, produkti. Naučnici su dosta dugo proučavali kakvim ravnotežama teži jedan hemijski sistem, koji faktori mogu da utiču na ovu ravnotežu i kakve se posledice dobijaju iz ovakvih ravnoteža. U tim istraživanjima oni jedva da su i dodirnuli pitanje, da li se uopšte hemijske ravnoteže i uspostavljaju, i kada to stvarno jeste slučaj, koliko je vremena za to potrebno. Razlog treba tražiti u tome, što su hemijske reakcije razmatrane termodinamičkim pristupom, odnosno praćenjem promene koncentracije, energije, strukture i hemijske veze između početnog i krajnjeg stanja reakcije. Na osnovu takvih merenja (posebno merenja toplote reakcije) dolazi se do podataka o entalpiji, entropiji i energiji sistema, ali se ne daje nikakav odgovor o putu, tj. međustanjima kroz koje proces prolazi i o brzini kojom se ovo dešava.

Zadatak, da se odgovori na ovakva pitanja, o brzini i reakcionom putu, pripada jednoj drugoj grani fizičke hemije–hemijskoj kinetici. Kao što je poznato, kinetika uvodi i vreme, pored termodinamičkih parametara, kojima se opisuje stanje nekog sistema, i definiše brzina neke promene, čime se u mnogim slučajevima rešava i pitanje mehanizma posmatranog procesa.

Svaki proces, bez obzira na njegovu prirodu, odvija se konačnom brzinom težeći ravnotežnom stanju, uključujući pri tome dve oblasti: kinetičku (dinamičku) u kojoj se sistem približava ravnoteži, ravnotežnu (statičku) kada sistem dolazi u stanje ravnoteže (slika 8). Obe oblasti su od velikog značaja u analitičkoj hemiji.[119]



Slika 8. Kinetička i ravnotežna oblast hemijske reakcije. Promena analitičkog signala sa vremenom za reaktante (1) i produkte (2)

Metode analize koje su zasnovane na merenju brzine reakcije nazivaju se kinetičke metode i mogu biti klasifikovane prema različitim kriterijumima. Verovatno najbolja podela je na katalitičke i nekatalitičke metode. Katalitičke metode se mogu dalje klasifikovati prema tipu reakcije, a nekatalitičke prema tome da li se određuje jedna komponenta ili više u smeši. Druge podele su u zavisnosti primenjene metodologije rada ili instrumentalne tehnike (tabela 7).

Tabela 7. Opšta podela kinetičkih metoda[120]

KATALITIČKE METODE

-NEENZIMSKE
- *VRSTE*
  - *REDOKS*
  - *HEMILUMINISCENCIJA*
  - *KOMPLEKSIRANJE*
- *REAKCIJA*
- *IZMENJENI UTICAJI*
  - *AKTIVACIJA*
  - *INHIBICIJA*
  - *KATALITICKE TITRACIJE*

- ENZIMSKE
- *HOMOGENE*
- *HETEROGENE*
- *IZMENJENI UTICAJI*
  - *AKTIVACIJA*
  - *INHIBICIJA*

- ELEKTROHEMIJSKE

NEKATALITIČKE METODE

- ODREĐIVANJE JEDNE VRSTE

- ODREĐIVANJE U SMEŠI (DIFERENCIJALNA KINETIKA)

2.3.2. Metode određivanja sadržaja analizirajućih supstanci u rastvoru na osnovu kinetičkih podataka

Za određivanje sadržaja analizirajuće supstance u rastvoru kinetičkim metodama, neophodno je izmeriti brzinu indikatorske reakcije ili, u nekim slučajevima, dužinu njenog indukcionog perioda. Koncentracija jedne od supstanci u procesu reakcije se menja, dok se koncentracije ostalih supstanci ili ne menjaju (katalizator) ili se neznatno menjaju.

Pregled metoda koje se zasnivaju na merenju brzine ili dužine indukcionog perioda indikatorske reakcije dat je u tabeli 8.

Tabela 8. Metode određivanja

Diferencijalna	
	• tangensna
	• fiksnog vremena
	• fiksne koncentracije
Integralna	
	• tangensna
	• fiksnog vremena
	• fiksne koncentracije
Metode zasnovane na merenju dužine indukcionog perioda	

Diferencijalna i integralna metoda su najčešće primenjivane metode prilikom kinetičkih određivanja.

Ako posmatramo reakciju:

$$A + B \overset{K}{\longleftrightarrow} P \qquad (1)$$

određivanje obuhvata dva granična slučaja.

Ako je u reakciji (1) koncentracija reaktanta B mnogo veća (preko 50 puta)[120] od koncentracije reaktanta A, u toku reakcije koncentracija reaktanta B smanjivaće se jako malo pa se te promene mogu zanemariti i smatrati da je koncentracija reaktanta B praktično konstantna. U tom slučaju izraz za brzinu reakcije ima oblik:

$$\nu = - \frac{\partial[A]}{\partial t} = \frac{\partial[P]}{\partial t} = \kappa[A][B]_{const} = \kappa'[A] \qquad (2)$$

gde je $\kappa' = \kappa[B]_{const}$

Iz izraza se može videti da je reakcija sa kinetikom drugog reda svedena na reakciju prvog reda. Takve reakcije nazivamo *reakcijama pseudo prvog reda*.

Ako je promena koncentracije supstance A linearna sa vremenom A=f(t) ili $\Delta[A]$ = f(t) za određivanje koncentracije te supstance primenjuje se *diferencijalna varijanta.*

Ako promena koncentracije sa vremenom varira (bilo da raste ili opada) ili je linerarna u uskom Δt intervalu, primenjuje se *integralna varijanta*.

U tom slučaju se jednačina (2) integrali u granicama $[A] = [A_1]$ do $[A] = [A_2]$, t = t_1 do t = t_2

$$\ln \frac{[A_1]}{[A_2]} = k\Delta t \qquad (3)$$

Jednačina (3) ilustruje promenu koncentracije analita sa vremenom.

Drugi granični slučaj određivanja je, ako je koncentracija reaktanta B u reakciji (1) jednaka ili manja od koncentracije reaktanta A (≤50 puta), pa brzina zavisi od koncentracije oba reaktanta. Ove reakcije nazivamo *reakcije drugog reda.*

U tom slučaju izraz za brzinu reakcije (1) ima oblik:

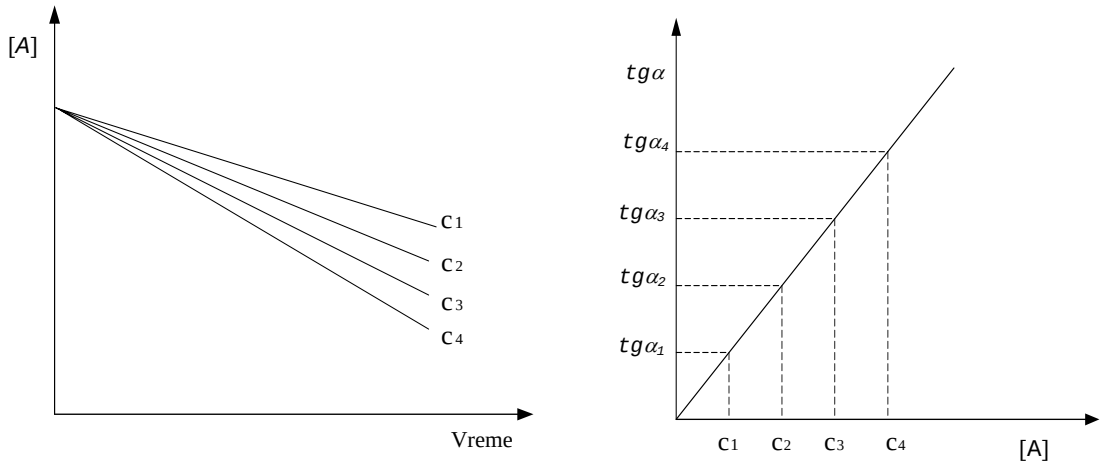
$$\nu = -\frac{\partial[\mathrm{A}]}{\partial \mathrm{t}} = -\frac{\partial[\mathrm{B}]}{\partial \mathrm{t}} = \frac{\partial[\mathrm{P}]}{\partial \mathrm{T}} = \kappa[\mathrm{A}][\mathrm{B}] \qquad (4)$$

ili

$$\nu = -\frac{\partial[\mathrm{P}]}{\partial \mathrm{t}} = \kappa([\mathrm{A}]_o - [\mathrm{P}])[\mathrm{B}_o] \qquad (5)$$

Postoje tri metode diferencijalne i integralne varijante.

Tangensna metoda koja prati promenu koncentracije indikatorske supstance ili promenu logaritma koncentracije sa vremenom (slika 9)



Slika 9. Tangensna metoda

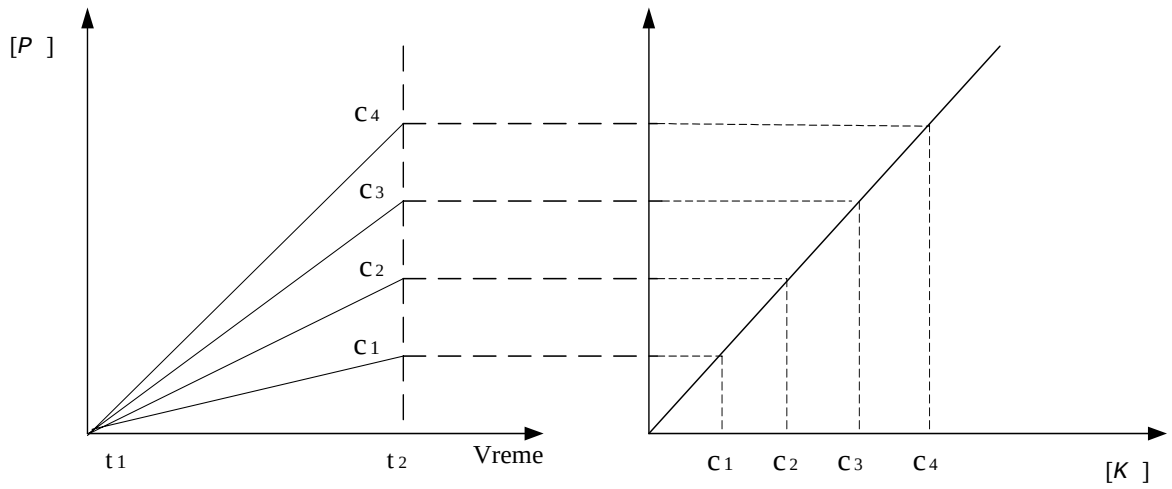
Umesto promene koncentracije moguće je pratiti promenu odgovarajuće fizičko-hemijske veličine koja je proporcionalna koncentraciji (apsorbanca, difuziona, struja, intenzitet fluorescencije, potencijal elektrode, provodljivost, indeks prelamanja itd.) sa vremenom.

Na osnovu dobijenih rezultata crtaju se dve krive (slika 9). Prva predstavlja zavisnost koncentracije (ili logaritma koncentracije) indikatorske supstance od vremena, a druga kalibracionu pravu $\mathrm{tg}\alpha = \mathrm{f}[A]$.

Grafik zavisnosti koncentracije (ili njoj proporcionalne veličine) od vremena dobija se automatski UV / VIS spektrofotometrom. U tom slučaju tangens ugla se može odrediti znatno tačnije.

Metoda tangensa se primenjuje kod različitih tipova reakcija. Takođe, ova metoda se sa uspehom primenjuje i kod reakcija sa indukcionim periodom gde druge metode ne mogu da daju tačne rezultate.

Metoda fiksnog vremena određuje koncentraciju jedne od supstanci koje reaguju u rastvoru nakon završetka zadatog vremenskog intervala. Ako je u zadatom vremenskom intervalu promena koncentracije sa vremenom linearna, koristi se diferencijalna varijanta; ako je pak u rastvoru došlo do bitne promene koncentracije, koristi se integralna varijanta. Kalibraciona kriva predstavlja zavisnost koncentracije produkta od koncentracije katalizatora (slika 10.)

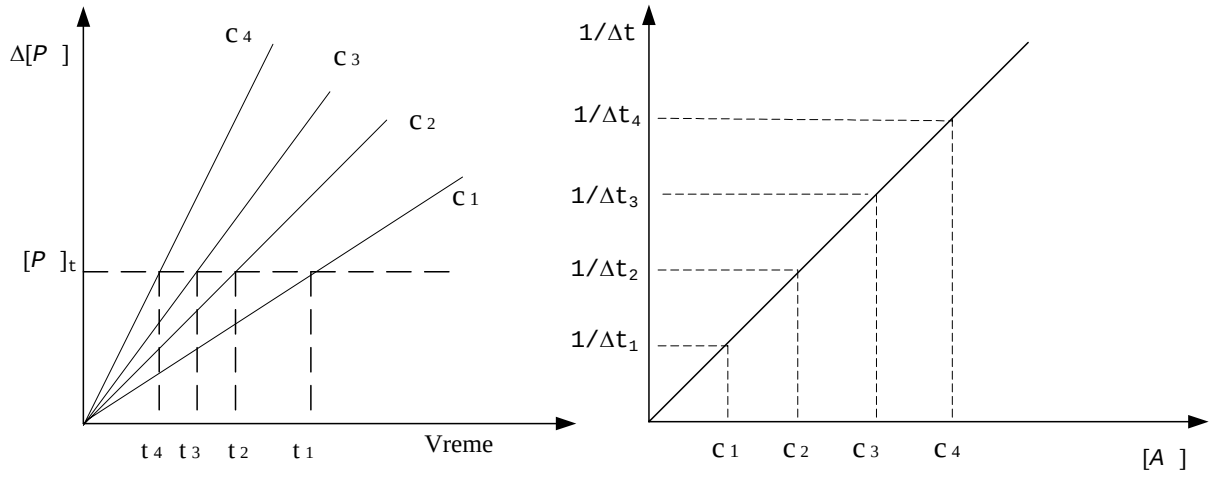


Slika 10. Metoda fiksnog vremena

Umesto koncentracije, posle isteka zadatog vremenskog intervala, može se meriti bilo koja veličina koja je proporcionalna koncentraciji (videti kod tangensne metode).

Metoda fiksnog vremena je jednostavnija za izvođenje u poređenju sa metodom tangensa. Rezultati koji se dobijaju ovom metodom su manje tačni, a i metoda nije univerzalna. Npr., u prisustvu jako izraženog dugotrajnog indukcionog perioda teško je dobiti pouzdane rezultate.

Metoda zadate koncentracije – ovom metodom se meri vreme koje je potrebno da se postigne unapred zadata koncentracija ili njoj proporcionalna veličina. Recipročna vrednost vremena ($1/\Delta t$) linearna je funkcija koncentracije ispitivane supstance ili njoj proporcionalne veličine (slika 11.).



Slika 11. Metoda zadate koncentracije

Kalibraciona kriva kod ove metode ima jedne te iste koordinate nezavisno od izabrane varijante kinetičke metode (diferencijalne ili integralne).

Opisana metoda se primenjuje u uslovima odsustva paralelnog odvijanja nekatalitičke reakcije. Ako se u rastvoru takva reakcija stvarno odvija, onda se reakcija prati do fiksirane vrednosti razlike koncentracije ispitivane supstance ili njoj proporcionalne veličine. Vrednosti razlike mogu se naći automatski ako se na primer u jednu kivetu spektrofotometra stavi rastvor koji sadrži supstancu koja se ispituje, a u drugu rastvor bez te supstance.

Ako ispitivanu reakciju karakteriše prisustvo indukcionog perioda, onda u tom slučaju ne postoji linearna zavisnost između 1/t i koncentracije ispitivane supstance ili njoj proporcionalne veličine.

Metoda fiksirane koncentracije je jednostavnija za primenu nego tangensna metoda, ali su dobijeni rezultati manje tačni i metoda je manje univerzalna.

Izborom odgovarajućih reakcionih uslova (koncentracije reaktanata, pH-sredine, temperature, jonske sile rastvora) može se postići jednostavna, u najboljem slučaju linearna zavisnost između koncentracije ispitivane supstance ili njoj proporcionalne veličine i vremena odigravanja reakcije. U analitičkoj praksi primenjuju se uglavnom indikatorske reakcije koje su tako modifikovane da predstavljaju reakcije prvog ili pseudo prvog reda.

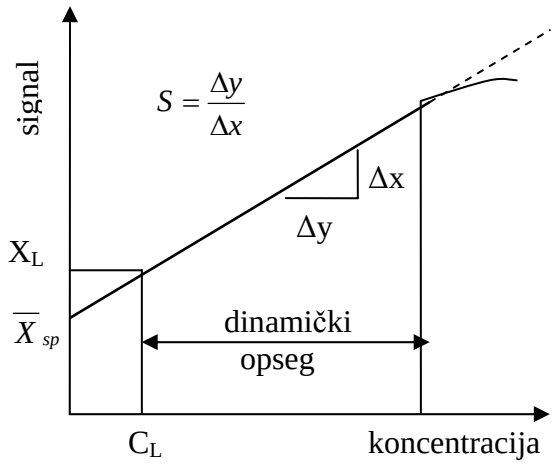
Hemijske metode se mogu primeniti samo kod metode fiksnog vremena, na taj način što se nakon prekidanja reakcije nakon zadatog vremena, određuje količina nastalog proizvoda ili neutrošeni deo indikatorske supstance, najčešće volumetrijskom analizom.

Kod fizičko-hemijskih metoda meri se promena neke fizičko-hemijske veličine koja je proporcionalna promeni koncentracije indikatorske supstance. Te veličine mogu biti: zapremina oslobođenog gasa, apsorbanca rastvora, indeks prelamanja, elektroprovodljivost, jačina difuzione struje, potencijal indikatorske elektrode, intenzitet fluorescencije, intenzitet luminiscencije itd. Prednost ovih metoda je u znatnoj brzini određivanja i mogućnosti merenja odgovarajuće veličine bez narušavanja ravnoteže u sistemu.

2.3.3. Karakteristike kinetičkih metoda analize

Osetljivost

Koristeći kalibracionu krivu definišu se neke veličine koje služe za poređenje različitih metoda (slika 12).



Slika 12. Kalibraciona kriva i veličine koje se definišu preko nje. $\overline{X}_{sp}$ *- 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):

$$S = \frac{\Delta y}{\Delta x} \qquad (6)$$

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

Pojam osetljivosti i dalje 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 trenutno 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 preciznost.

Prema IUPAC-ovoj definiciji, *limit detekcije* je broj, izražen u jedinicama koncentracije ili količine za datu analitičku metodu. To je najmanja koncentracija ili količina analita za koju se može tvrditi da se statistički razlikuje od slepe probe. Detekcioni limit, C_L se može izraziti jednačinom:

$$C_L = \frac{X_L - \overline{X}_{sp}}{m} \tag{7}$$

gde je X_L granični analitički signal koji odgovara koncentraciji C_L. $\overline{X}_{sp}$ je srednja vrednost slepe probe za *n* ispitivanja (obično n ≥ 20), a *m* je analitička osetljivost. Detekcioni limit se može izraziti preko standardne devijacije slepe probe, standardne devijacije fitovanja kalibracione prave ili standardne devijacije odsečka, *S*:

$$C_L = \frac{k \cdot S}{m} \tag{8}$$

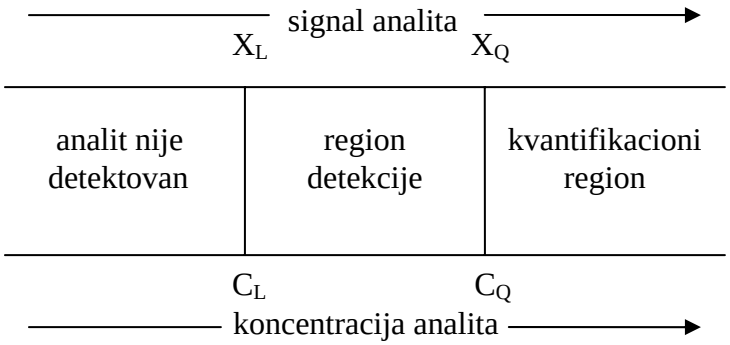
k je numerički faktor izabran prema željenom nivou pouzdanosti. Obično se uzima da je k = 3,3 što bi trebalo da odgovara verovatnoći od 99,86% (tj. verovatnoći da će se 99,86% X_L nalaziti u datom intervalu pouzdanosti). Međutim, u većini slučajeva k = 3,3 odgovara verovatnoći od 95%, jer se striktno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

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 računa se prema jednačini:

$$C_Q = \frac{10 \cdot S}{m} \tag{9}$$

Prema tome, postoje tri glavna analitička regiona (slika 13) povezana sa određivanjem supstance:

a) region u kome se analit ne može pouzdano odrediti, koncentracije manje od C_L,
b) detekcioni region, između C_L i C_Q i
c) kvantifikacioni region, za koncentracije ≥ C_Q .



Slika 13. Regioni analitičkog određivanja

Osetljivost i detekcioni limit u kinetičkim metodama

Poznato je da su visoka osetljivost i nizak limit detekcije koji se pripisuju kinetičkim metodama rezultat katalitičkih reakcija. On je ograničen na merenje inicijalne brzine u reakciji A + B $\rightarrow$ P, koja je katalizovana katalizatorom K:

$$\frac{d[P]}{dt} = k \cdot \pi_K \cdot [K]_o = k' \cdot [K]_o \qquad (10)$$

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

$$[K]_o = (d[P]/dt)/k\pi_K = (\Delta[P]/\Delta t)/k\pi_K \qquad (11)$$

Iz jednačine (11) 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 $v = v_c + v_o$, ili

$$\frac{d[P]}{dt} = k \cdot \pi_K [K]_o + k'\pi_K \qquad (12)$$

Što je manja brzina nekatalizovane reakcije, niža će biti $[K]_{o,min}$. 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:

$$[K]_{o,\min} = \frac{\Delta[P]_{\min}}{\Delta t_{\max} k \cdot \pi_K} + \frac{\alpha \cdot \nu_o}{k \cdot \pi_K} \tag{13}$$

Ako je $\nu_o = k' \pi_K$, tada je:

$$[K]_{o,\min} = \frac{\Delta[P]_{\min}}{\Delta t_{\max} k \cdot \pi_K} + \alpha \frac{k'}{k} \tag{14}$$

$$\frac{k'}{k} = \exp[-(E_o - E_{kat})/RT] \tag{15}$$

E_o i E_{kat} su energije aktivacije nekatalitičke i katalitičke reakcije. Prema ovoj reakciji, najniži detekcioni limet se javlja kada se k'/k zanemari.

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

$$-\frac{\Delta[A]}{\Delta t} = [A]_o (k' + k[K]_o) \tag{16}$$

Detekcioni limit se identifikuje sa odsečkom $[A]_o \cdot k'$ krive $-\Delta[A]/\Delta t$ = f($[K]_0$).

Zbog jednostavnosti, izrazi ne uključuju doprinos nekatalitičke reakcije. Ako je njen doprinos značajan, izraz za detekcioni limit se modifikuje delom koji je proporcionalan odnosu konstanti brzine nekatalizovane i katalizovane reakcije, dok izraz za osetljivost ne treba menjati. Može se zaključiti da:

a) osetljivost raste, a detekcioni limit opada sa povećanjem konstante brzine i koncentracije reaktanata,
b) u metodi fiksnog vremena Δt utiče na isti način na ove parametre, pa je poželjno koristiti integralni oblik,
c) u metodi varijabilnog vremena Δ[P] treba biti što manje, pa je preporučljivo koristiti diferencijalni oblik.

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. Dalje, 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 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 reaktanta, jonska jačina, dielektrična konstanta rastvarača), primenom separacionih tehnika i pre svega upotrebom aktivatora. Pored povećanja osetljivosti i smanjenja detekcionog limita, primena aktivatora povećava selektivnost kinetičke analitičke metode.

Selektivnost

Prema IUPAC-u, selektivnost je svojstvo koje pokazuje u kom stepenu druge supstance interferiraju pri određivanju analita datom metodom. Krajnji stepen selektivnosti je odsustvo interferencija. 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.

Tačnost i preciznost

Tačnost nekog rezultata označava blizinu tog rezulatata njegovoj pravoj vrednosti. Opisuje se kao apsolutna ili relativna greška. Tačnost se može odrediti poznavajući pravu vrednost merene veličine ili srednju vrednost velikog broja merenja. 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.

Preciznost se koristi za opisivanje reproduktivnosti rezultata, i može se definisati kao slaganje između numeričkih vrednosti dva ili više merenja izvedenih na identičan način. Za izražavanje preciznosti najčešće se koriste *devijacija (odstupanje) od srednje*

vrednosti ili od *mediane*, zatim *područje variranja*, *standardna devijacija* i *varijansa*. Definišu se tri nivoa:

a) ponovljivost – preciznost procenjena od strane jednog analitičara, na istim uzorcima, istoj aparaturi u kratkom vremenskom intervalu.
b) srednja preciznost - preciznost procenjena od strane više analitičara, na istoj aparaturi i u istoj laboratoriji u toku više dana,
c) reproduktivnost – preciznost procenjena od strane više analitičara, na različitim aparaturama i u različitim laboratorijama.

Razvoj instrumentalne i kompjuterske tehnologije približava kinetičke metode ravnotežnim u pogledu brzine, preciznosti i jednostavnosti. Međutim, kinetičke metode u velikoj meri zavise i od konstantnosti eksperimentalnih uslova. Metode zasnovane na reakcijama prvog reda su preciznije, pa se preciznost metode može znatno povećati podešavanjem eksperimentalnih podataka modelu prvog reda pomoću linearne regresije. Preciznost merenja brzine reakcije zavisi od tri faktora:

a) šume praćenog signala,
b) reproduktivnosti eksperimentalnih uslova i
c) veličine greške uzrokovane sistemima za prikupljanje podataka u vremenu merenja.

Ovaj poslednji izvor greške se može zanemariti zahvaljujući dobroj instrumentaciji.

2.3.4. Reakcije izmene liganda i obrazovanja kompleksa, "ligand-exchange reactions"

Kinetičke metode analize zasnovane na reakciji izmene liganda su malo proučavane u literaturi. Ovim metodama najviše su određivani alkalni i zemnoalkalni metali, elementi prve prelazne serije, lantanoidi, jodidi, fluoridi, karbonati, sulfati. Reakcije izmene liganda se mogu podeliti na:

- *Reakcije izmene liganda između dva metalna jona*

$ML + Me \Leftrightarrow MeL + M$

$$K = \frac{[MeL]\cdot[M]}{[ML]\cdot[Me]} = \frac{\beta_{MeL}}{\beta_{ML}}$$

Ako se posmatra sistem:

$NiY^{2-} + Zn^{2+} \leftrightarrow ZnY^{2-} + Ni^{2+}$

ravnoteža se pomera u desnu stranu i pri tome je praćena brzina nestajanja kompleksa NiY^{2-} na 380 nm. Dodavanjem male količine Cu^{2+} jona u sistem, dolazi do sledećih reakcija:

$NiY^{2-} + Cu^{2+} \rightarrow CuY^{2-} + Ni^{2+}$

$CuY^{2-} + Zn^{2+} \rightarrow ZnY^{2-} + Cu^{2+}$

Brzina reakcije dodatkom jona bakra se povećava oko 6000 puta, što govori o tome da bakarni joni deluju kao katalizator. Brzina nestajanja kompleksa NiY^{2-} je proporcionalna dodatoj količini bakra, pri čemu je dobijena kalibraciona kriva za određivanje bakra.[121]

- *Reakcije izmene metala između dva liganda*

$ML + X \Leftrightarrow MX + L$

Konstanta ravnoteže ove reakcije jednaka je odnosu konstanti stabilnosti odgovarajućih kompleksa:

$$K = \frac{[MX]\cdot[L]}{[ML]\cdot[X]} = \frac{\beta_{MX}}{\beta_{ML}}$$

Reakcija između jona bakra i liganada etilenglikol(2-aminoetiletar)tetra-sirćetne kiseline (EGTA) i 4-(2-piridilazo)rezorcinola (PAR)

Cu-EGTA + PAR → Cu-PAR + EGTA

katalizovana je jonima Ca^{2+}. Praćenjem brzine nastajanja kompleksa Cu-PAR na 515 nm, dobijena je kalibraciona kriva za određivanje kalcijuma u intervalu koncentracije 0,4-40,0 μg cm^{-3}.[122]

Ovaj tip reakcije izmene takođe može biti katalizovan monodentatnim ligandom, umesto metalnim jonom. Reakcija:

Hg-CPC + DCTA → Hg(II)-DCTA + CPC

katalizovana je amonijakom koji ima ulogu ligand-transfera:

Hg-CPC + NH_3 → Hg-NH_3 + CPC

Hg-NH_3 + DCTA → Hg-DCTA + NH_3

CPC – 3,3-bis- N,N-di(karboksimetil)aminoetil-o-krezoftalein

DCTA – diaminocikloheksantetra-sirćetna kiselina

Reakcija je praćena spektrofotometrijski na 580 nm. Brzina nestajanja kompleksa Hg-CPC srazmerna je koncentraciji amonijaka, pri čemu je granica detekcije amonijaka pomenutom reakcijom 1 μg cm^{-3}.[123]

- *Reakcije dvostruke izmene*

$ML + MeX \Leftrightarrow MX + MeL$

$$K = \frac{\beta_{MeL} \cdot \beta_{MX}}{\beta_{ML} \cdot \beta_{MeX}}$$

Reakcija između Ni-trietilentetraamina i Cu-EDTA

$NiT^{2+} + CuY^{2-} \rightarrow CuT^{2+} + NiY^{2-}$

odvija se veoma sporo. Dodatkom EDTA (Y^{4-}) u malom višku, formira se Ni-EDTA kompleks i i oslobađa se trietilenamin (T), koji koji zamenjuje EDTA u kompleksu sa bakrom.

$Y^{4-} + NiT^{2+} \rightarrow NiY^{2-} + T$

$T + CuY^{2-} \rightarrow CuT^{2+} + Y^{4-}$

Brzina reakcije praćena je spektrofotometrijski, merenjem apsorbance na 550 nm, što odgovara CuT kompleksu, i proporcionalna je dodatoj konentraciji EDTA ili T. Ovo omogućava određivanje koncentracije jednog ili drugog liganda, kao i indirektno određivanje metalnog jona.[124]

Odgovarajuće ravnoteže mogu se iskoristiti za kinetička određivanja ako su ispunjeni i dodatni uslovi.

Termodinamički uslov. Ravnotežna reakcija izmene mora biti u znatnoj meri pomerena udesno (β_{MX}, $\beta_{MeL} >> \beta_{ML}$, β_{MeX}), u protivnom doći će do neznatne izmene liganda, odnosno metalnog centralnog jona, ili je neophodan veliki višak reagensa.

Kinetički uslov. Reakcija izmene mora proticati sporo, a to znači da je neophodno koristiti manje reaktivne komplekse. Pored toga, reakcija disocijacije polaznih reagenasa mora proticati sporije u odnosu na reakciju izmene.

Pregled nekih kinetičkih metoda koje se zasnivaju na reakciji izmene liganda dat je u tabeli 9.

Tabela 9. Kinetičke metode za određivanje nekih katjona i anjona zasnovane na reakciji izmene liganda

Vrsta	Indikatorska reakcija	Detekcija	Granica detekcije ili opseg linearnosti	Ref.
Živa	$[Fe(CN)_6]^{4-}$ + dipiridil / 1,10-fenantrolin	A (λ = 522 nm)	10^{-5} M	125.
	$[Fe(CN)_6]^{4-}$ + p-nitrozodifenilamin	A (λ = 640 nm)	$2x10^{-8}$ M	126.
	$[Fe(CN)_5NH_3]^{3-}$ + dipiridil / 1,10-fenantrolin	A	0-0,3 μg cm^{-3}	127.
	$[Fe(CN)_5NH_3]^{3-}$ + ferozin	A (λ = 562 nm)	0,01-0,4 μg cm^{-3}	128.
Srebro	$[Fe(CN)_6]^{4-}$ + dipiridil	A (λ = 520 nm)	1,67 μM–0,3 mM	129,130.
	$[Fe(CN)_5NH_3]^{3-}$ + ferozin	A (λ = 562 nm)	0,02-0,5 μg cm^{-3}	
Zlato	$[Fe(CN)_6]^{4-}$ + dipiridil	A (λ = 520 nm)	16,5 μM–0,15 mM	128.
	$[Fe(CN)_5NH_3]^{3-}$ + ferozin	A (λ = 562 nm)	0,1-3,0 μg cm^{-3}	130.
Jodidi	Hg-PAR + DCTA	A (λ = 500 nm)	0-10^{-7} M	131,132.

PAR: 4-(2-piridilazo)rezorcinol; DCTA: 1,2-diaminocikloheksantetra-sirćetna kiselina

U literaturi je prisutno malo primera korišćenja reakcija izmene u kompleksnim jedinjenjima u analitičke svrhe. Reakcijama izmene u kompleksnim jedinjenjima mogu se odrediti mikrogramske količine supstanci (10^{-6}–10^{-5} mol dm^{-3}).

2.4. Regresiona i korelaciona analiza

Regresiona i korelaciona analiza su statističke metodologije koje ispitiju vezu između dve ili više statističkih promenljivih.

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. Najednostavniji postupak regresione analize naziva se *metoda najmanjih kvadrata*. Regresiona analiza najčešće obuhvata dve promenljive, a ako je u pitanju više promenljivih ta tehnika se naziva multiplom regresijom.

Korelaciona analiza pokazuje stepen zavisnosti između promenljivih, pa se njome najčešće određuje da li ima smisla izračunavati jednu promenljivu na osnovu druge.

2.4.1. Regresiona analiza

Regresiona analiza se izvodi putem regresione jednačine:

$$y = mx + b$$

gde je *b* odsečak na ordinati (vrednost y kada je x jednako nuli), a *m* je nagib regresione linije. *y* je 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 minimizira 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}:

$$S_{xx} = \sum \left(x_i - \bar{x}\right)^2 = \sum x_i^2 - \frac{\left(\sum x_i\right)^2}{N} \tag{17}$$

$$S_{yy} = \sum \left(y_i - \bar{y}\right)^2 = \sum y_i^2 - \frac{\left(\sum y_i\right)^2}{N} \tag{18}$$

$$S_{xy} = \sum \left(x_i - \bar{x}, y_i - \bar{y}\right)^2 = \sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{N} \tag{19}$$

gde su x_i, y_i pojedinačni parovi vrednosti za x i y, N je broj parova koji se upotrebljavaju za izradu regresione linije, a $\bar{x}$ i $\bar{y}$ su srednje vrednosti promenljivih x i y, odnosno

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

Iz veličina S_{xx}, S_{yy} *i* S_{xy} može se izvesti šest upotrebljivih veličina:

1. Nafib pravca, *m*:

$$m = S_{xy} / S_{xx} \tag{20}$$

2. Odsečak na ordinati, *b*:

$$b = \bar{y} - m\bar{x} \tag{21}$$

3. Standardna greška odstupanja od regresione linije, s_r:

$$s_r = \sqrt{\frac{S_{yy} - m^2 S_{xx}}{N-2}} \tag{22}$$

4. Standardna greška nagiba, s_m:

$$s_m = \sqrt{s_r^2 / s_{xx}} \tag{23}$$

5. Standardna greška odsečka na ordinati, s_b:

$$s_b = s_r \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{N\sum x_i^2 - \left(\sum x_i\right)^2}} = s_r \sqrt{\frac{1}{N - \left(\sum x_i\right)^2 / \sum x_i^2}} \tag{24}$$

6. Standardna greška odstupanja rezultata dobijenih iz regresione linije, s_c:

$$s_c = \frac{s_r}{m}\sqrt{\frac{1}{M} + \frac{1}{N} + \frac{\left(\bar{y_c} - \bar{y}\right)^2}{m^2 S_{xx}}} \tag{25}$$

Jednačina (25) 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 (jed. 22) je standardno odstupanje od y kada se odstupanja ne mere od aritmetičke sredine y (kao što je to uobičajno), nego od izvedenog pravca:

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N}\left[y_i - \left(b + mx_i\right)\right]^2}{N-2}} \tag{26}$$

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

Još tačnija vrednost promenljive može se izračunati *kompjuterskim programima za linearnu regresiju* kao što su *MS Excel i Micro Cal Origin*.

2.4.2. 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 ove 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*. Izračunava se iz izraza:

$$r = \frac{N\sum xy - \sum x \sum y}{\sqrt{\left[N\sum x^2 - \left(\sum x\right)^2\right]} \cdot \sqrt{\left[N\sum y^2 - \left(\sum y\right)^2\right]}} \tag{27}$$

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, odnosno 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. Koje numeričke vrednosti odgovaraju ovakvom gradiranju o tome ne postoje jedinstvena gledišta. Po nekima se korelacija smatra:

- 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 $0,0 < | r | \leq 0,2$

Razume se da gornja skala ima, uglavnom, karakter preporuke.

2.5. Hromatografija

2.5.1. HPLC hromatografija

Pod hromatografijom se podrazumeva skup analitičkih metoda koje služe za razdvajanje sastojaka smeša na osnovu različitih raspodela između dve faze - pokretne i nepokretne. Sam pojam hromatografija datira još od početka 20 veka (1903.), kada je ruski naučnik Cvet razdvojio hlorofil na dve komponente poznate kao hlorofil A i B na taj način što je u staklenoj cevi (koloni) napunjenoj čvrstim nosačem na vrh kolone stavio alkoholni ekstrakt hlorofila, a zatim laganim nakapavanjem čistog alkohola započeo spiranje hlorofila. Pokazalo se da je apsorpcija dva hlorofila različita u odnosu na čvrst nosač tako da su se izdvojila dva sloja, odnosno dva hlorofila A i B. Pošto su razdvojene komponente bile obojene Cvet je ovu metodu razdvajanja nazvao *hromatografijom* od grčke reči *hromos* – boja. Od tada se hromatografija razvila u više pravaca. Krajem tridesetih godina prošlog veka pojavila se tankoslojna hromatografija, a 1941. Martin i Synge su dobili Nobelovu nagradu za radove iz oblasti hromatografije. Taj njihov fundamentalni rad je i postavio osnove za razvoj tečne, gasne i papirne hromatografije. Prvi rad iz gasne hromatografije publikovan je 1952. (Martin i James), da bi se posle toga gasna hromatografija razvila u vrlo moćnu analitičku tehniku. Razvoj tečne hromatografije išao je sporije i tek šezdesetih godina prošlog veka počelo je njeno usavršavanje. Danas se po značaju tečna hromatografija praktično potpuno izjednačila sa gasnom hromatografijom.

Princip hromatografskog razdvajanja smeše zasniva se na razlikama u raspodeli pojedinih komponenti smeše između pokretne i nepokretne faze. Sama raspodela je posledica raznih fizičko-hemijskih procesa kao što su adsorpcija, desorpcija, apsorpcija, podela između dva rastvarača i jonska izmena.

Danas se, prema agregatnom stanju pokretne faze, hromatografija u osnovi deli na tečnu i gasnu hromatografiju.

Tečna hromatografija obuhvata:

- hromatografiju na hartiji,
- hromatografiju na tankom sloju,
- tečnu hromatografiju na koloni,
- tečnu hromatografiju pod visokim pritiskom.

Hromatografski sistemi i tehnike kao i fizičko-hemijski procesi na kojima se zasniva razdvajanje dati su u tabeli 10.

Tabela 10. Hromatografski sistemi i tehnike

Pokretna faza	Nepokretna faza	Tehnike	Fizičko-hemijski procesi
Gasna	Čvrsta	Hromatografija gasne faze u koloni i kapilarnoj koloni	Adsorpcija
Gasna	Tečna	Hromatografija gasne faze u koloni i kapilarnoj koloni	Podela, reverzno-fazna podela
Tečna	Čvrsta	Kolona, hromatografija na tankom sloju i na hartiji	Adsorpcija, jonska izmena, gel filtracija
Tečna	Tečna	Kolona, hromatografija na tankom sloju i na hartiji	Podela, referzno-fazna podela

U zavisnosti od prirode supstance i zavisi i koji će se sistem primeniti za razdvajanje smeše. Veoma je teško tačno odrediti koji sistem treba primeniti. Orjentaciono se može koristiti tabela 11.

Tabela 11. Vrsta hromatografije za razdvajanje smeše

Razdvajanje supstanci	Vrsta hromatografije
Gasovi i isparljive supstance	Hromatografija u gasnoj fazi
Supstance sličnog hemijskog sastava	Podeona hromatografija i reversno-fazna podeona hromatografija
Supstance različitog hemijskog sastava	Adsorpciona hromatografija
Neorganske i jonske supstance	Jonska izmena, hromatografija u tankom sloju i na hartiji
Jonske od nejonskih supstanci	Jonska izmena i gel hromatografija
Biološki materijali i jedinjenja velike molekulske mase	Gel hromatografija

HPLC skraćenica obuhvata dva tumačenja: tečna hromatografija pod visokim pritiskom (**H**igh **P**ressure **L**iquid **C**hromatography), kao i tečna hromatografija visokih mogućnosti (**H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography).

Kod HPLC hromatografije mobilna, tečna faza funkcioniše pod visokim pritiskom, što je razlikuje od ostalih tečnih hromatografija. Visok pritisak omogućava kontinuiran protok mobilne faze i uspostavljenje dinamičke ravnoteže sa stacionarnom fazom, što je uslov dobre selektivne raspodele komponenti datog uzorka.

HPLC hromatografija koristi izabranu strukturnu osobinu supstanci i tokom analize ne menja njihovu hemijsku prirodu. Ovom tehnikom se mogu analizirati i smeše onih supstanci koje se ne mogu razdvojiti hemijskim metodama ili raznim drugim fizičkim metodama. Pri tome se, ukoliko se hromatografski postupak obavlja korektno, ukupna količina uzorka neznatno menja, i ukoliko je to potrebno, moguća je i kvantitativna kolekcija razdvojenih komponenti (tzv. preparativna hromatografija). Kod ove tehnike "prag" kvalitativne osetljivosti je vrlo nizak, moguće je razdvojiti i analizirati vrlo male količine ispitivanih supsatnci 10^{-9} g, pa i manje.

HPLC hromatografija je doživela nagli razvoj u zadnje dve-tri dekade, i može se sa sigurnošću reći da danas predstavlja vodeću istraživačku tehniku, i to ne samo među podeonim hromatografijama, nego i u svim hromatografijama uopšte. Takođe, ova tehnika se koristi i u standardne industrijske svrhe, kao što je slučaj sa kontrolom kvaliteta sirovina i proizvoda, ali to je daleko ispd njenih realnih mogućnosti. Ona je uostalom i nastala kao potreba jednog trenutka, a to je da se pronađe jedna moćna metoda koja će uspešno razdvajati, i kvalitativno i kvantitativno, biološki važne molekule, u odnosu na šta je upotreba drugih hromatografija pokazala puno nedostataka. Opšte osobine bioloških molekula, bez obzira kojoj klasi pripadaju su: visoka polarnost, velika molekulska masa, prisustvo jonskih grupa i termalna nestabilnost. One unose mnogo ograničenja. Recimo termalna nestabilnost, u kombinaciji sa malom isparljivošću, praktično isključuje upotrebu gasne hromatografije. HPLC hromatografija uglavnom rešava većinu problema vezanih za razdvajanje velikih bioloških materijala.

Kod ove metode koristi se tehnika eluiranja, prilikom koje pokretna faza konstantnom brzinom protiče kroz cev - kolonu, noseći smešu koja se razdvaja i dovodeći je u dodir sa nepokretnom fazom koja se nalazi u koloni. U zavisnosti od svoje hemijske strukture, sastojci smeše pokazuju veću ili manju sklonost da se zadržavaju na nepokretnoj fazi, tako da provode različito vreme u koloni. Posle toga sledi njihova detekcija u obliku električnog signala (pomoću odgovarajućeg detektora), pri čemu se dobija *hromatogram* - kriva zavisnosti jačine signala od vremena. Površina zavisnosti direktno je zavisna od koncentracije jedinjenja, a njegov položaj na hromatogramu - vreme zadržavanja, određen je fizičko-hemijskim svojstvima jedinjenja. Prema tome hromatogram može da pruži odgovore na sledeća pitanja:

- koliko komponenata sadrži analizirana smeša (na osnovu broja signala),

- kolike su koncentracije pojedinih sastojaka (kvantitativna analiza na osnovu relativnih površina signala),

- koja su jedinjenja prisutna (kvalitativna analiza na osnovu vremena zadržavanja, t_R).

Karakteristike hromatografske analize su:

- kratko trajanje (od nekoliko minuta do nekoliko desetina minuta),

- velika osetljivost detektora (10^{-9} - 10^{-14} g),

- jednostavnost rukovanja i jednostavna interpretacija hromatograma.

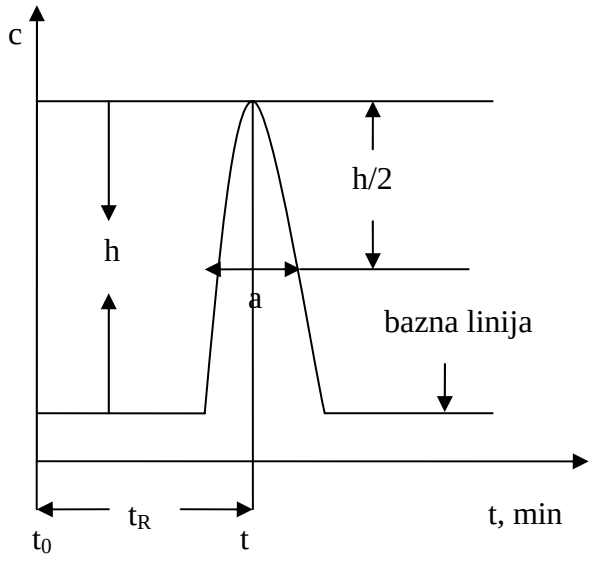
Kvalitativna HPLC analiza

Dobijen hromatogram sa pikovima koji predstavljaju izdvojene komponente ukazuje samo na broj komponenti u nekom uzorku, odnosno smeši, ali ništa ne kazuje o vrsti supstance. Kod kvalitativne analize identifikacija se vrši poređenjem standarda sa nepoznatom komponentom ispitivanog uzorka. Upoređuju se vreme zadržavanja standarda i izdvojene komponente u hromatografskoj koloni. To jedino i ima fizički smisao jer se vrši merenje vremena od ulaska uzorka u kolonu do dostizanja maksimuma pika izdvojene komponente. Vreme zadržavanja ili kako se u literaturi naziva *retenciono vreme* (lat. *retentio* – zadržavanje) meri se od trenutka kada se uzorak ubaci u kolonu do izlaska, jedne ili više komponenti iz kolone.

Kada se identifikuje komponenta tada se metodom standardnog dodatka, odnosno dodatkom određene količine standarda u ispitivanom uzorku, sa apsolutnom sigurnošću identifikuje određena komponenta pod uslovom da se standardni dodatak i izdvojena komponenta po retencionom vremenu potpuno poklapaju. To se utvrđuje na osnovu povećanja visine pika izdvojene komponente.

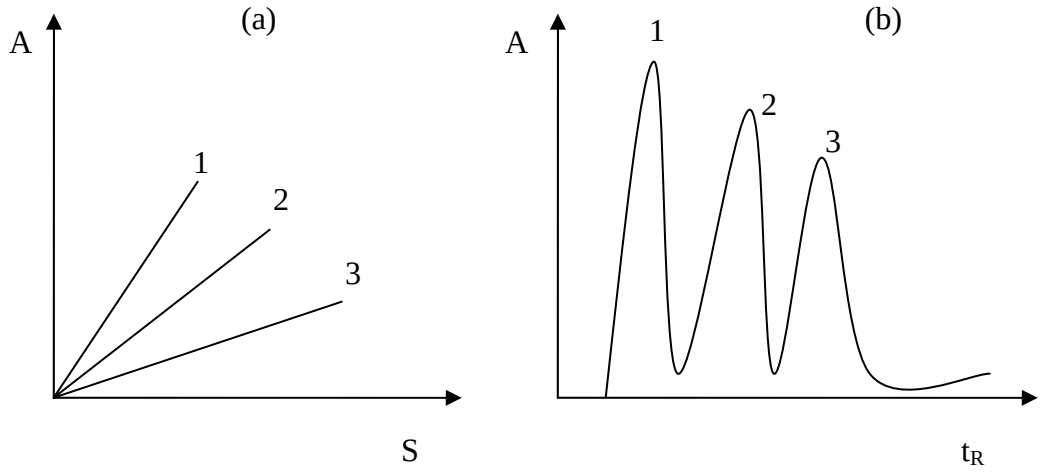
Kvantitativna HPLC analiza

Visina pika, ili tačnije površina ispod pika, izdvojene komponente direktno je proporcionalna koncentraciji (slika 14.). 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 predstavlja 94% površine ispod pika. Ako se ista metoda koristi i za standard i za uzorak greška od 6% se poništava, a dobijeni rezultati potpuno zadovoljavaju.



Slika 14. Kvantitativna HPLC analiza

Treba voditi računa da izračunate površine pikova predstavljaju meru relativnih koncentracija komponenti u smeši. Ukoliko se žele apsolutne koncentracije komponenata potrebno je napraviti kalibracioni dijagram koji će povezati površine pikova sa apsorbancijama odgovarajućih komponenti. Osnov za povezivanje je kalibracioni dijagram *A = f(S)*, prikazan na slici 15, gde je *A* – apsorbancija, a *S* – integrisana površina pikova. Apsorbance *A* su određene za niz standardnih koncentracija rastvora supstanci, koje se analiziraju HPLC-om. Kada se nakon izvršene HPLC analize odredi integrisana površina za dati pik, sa kalibracionog dijagrama pročita se odgovarajuća vrednost apsorbancije *A* na ordinati, a odatle se preko Beer-ovog zakona (*A = abc*) izračuna i tačna koncentracija.



Slika 15. Kalibracioni dijagram (a) i hromatogram (b) za tri komponente date smeše, gde je A – apsorbancija, S – površina pika, t_R – retenciono vreme

Nekada je potrebno da pored određivanja tačne koncentracije komponenti u uzorku i njihova kvantitativna kolekcija (skupljanje). Tada se koriste preparativne kolone, znatno šireg prečnika (i do 1cm) posebno konstruisane za visoki pritisak. Kolekcije se vrši prostim skupljanjem odgovarajućih frakcija mobilne faze koje sadrže datu komponentu. Početak i kraj kolekcije se vezuje za momente pojavljivanja i nestajanja odgovarajućeg pika na hromatogramu.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Program i metodika rada

Predmet doktorske disertacije je razrada metoda za određivanje mikro količina analgetika: derivata salicilne, propionske, aminofenilacetatne kiseline (acetilsalicilna kiselina, ibuprofen, dikolofenak) i sedativa: derivata etanolamina i benzodiazepina (dimenhidrinat, klonazepam, diazepam) u rastvoru, koje se zasnivaju na tzv. "ligand-exchange" reakciji.

Za praćenje brzine reakcije primenjen je spektrofotometrijski postupak, odnosno praćena je promena apsorbancije rastvora u funkciji vremena odigravanja reakcije na odgovarajućoj talasnoj dužini.

Za obradu kinetičkih parametara primenjena je tangensna metoda, zbog linearne zavisnosti apsorbance rastvora u toku prvih 5-6 minuta od početka odigravanja reakcije.

U cilju razrade što osetljivije metode za određivanje mikrokoličina pomenutih analgetika i sedativa bilo je potrebno:

- naći optimalne eksperimentalne uslove, tj. odrediti zavisnost brzine reakcije od koncentracije svakog reaktanta, kao i red reakcije u odnosu na svaki reaktant pojedinačno;

- postaviti kinetičke jednačine za ispitivane procese;

- ispitati zavisnost brzine reakcije od temperature i odrediti energiju aktivacije i ostale termodinamičke parametre reakcije građenja aktiviranog kompleksa;

- naći minimalnu koncentraciju aktivne supstance koja se može odrediti datom metodom, tj. izračunati granicu detekcije ($3{,}3S$ kriterijum);

- ispitati uticaj stranih jona, aminokiselina i ostalih supstanci koje se mogu sresti kao punioci u farmaceutskim preparatima na tačnost i reproduktivnost određivanja aktivne supstance kinetičkom metodom;

- ispitati mogućnost primene kinetičke metode za određivanje aktivne supstance u farmaceutskim preparatima i humanom kontrolnom serumu.

3.2. Eksperimentalni postupak

3.2.1. Aparati

Prilikom razrade kinetičkih metoda za određivanje nekih analgetika i sedativa korišćena je sledeća oprema:

1. Perkin-Elmer Lambda 15 UV/VIS spektrofotometar sa protočnim kivetama dužine optičkog puta 10 cm;

2. HPLC sistem 1200 Agilent Technologies; analitička kolona C_{18} (Zorbax, 5μm, 250 x 4,6 mm);

3. Za termostatiranje rastvora u mernoj kiveti spektrofotometra korišćen je univerzalni termostat - tip 10;

4. Analitička vaga Mettler Toledo korišćena je za odmeravanje čvrste supstance;

5. Za dobijanje demineralizovane vode, korišćen je MicroMed high purity water system, TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH;

6. Za pipetiranje rastvora korišćene su varijabilne automatske pipete Lab Mate^{+};

7. Vreme je mereno hronometrom.

3.2.2. Reagensi

Za pripremanje rastvora korišćena je dejonizovana voda specifične provodljivosti od 0,05 μS cm^{-1}. Rastvori su pravljeni neposredno pre početka rada. Sudovi koji su korišćeni pri radu prani su rastvorom HCl (1:1), a nakon toga ispirani običnom, destilovanom i dejonizovanom vodom. Prilikom razrade kinetičkih metoda korišćeni su sledeći reagensi:

1. 1–nitrozo-2-naftol, $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3}

Radni rastvor je pripreman odmeravanjem odgovarajuće mase 1–nitrozo-2-naftola, p.a., “Merck” i rastvaranjem u apsolutnom etanolu.

2. Natrijum-hidroksid, 1 mol dm^{-3}

Radni rastvor je pripreman odmeravanjem tačne mase natrijum-hidroksida, p.a., “Merck” i rastvaranjem u dejonizovanoj vodi.

3. Sirćetna kiselina, 10 mol dm^{-3}

Radni rastvor je pripreman odmeravanjem odgovarajuće zapremine CH_3COOH (ρ = 1,051 g cm^{-3}), p.a., “Merck” i rastvaranjem u dejonizovanoj vodi.

4. Kobalt(II)-hlorid-heksahidrat, $1 \cdot 10^{-4}$ g cm^{-3} Co(II)

Radni rastvor je pripreman rastvaranjem tačno odmerene mase $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ čistoće p.a., "Merck".

5. Bakar(II)-hlorid-dihidrat, $1 \cdot 10^{-4}$ g cm^{-3} Cu(II)

Radni rastvor je pripreman rastvaranjem tačno odmerene mase $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ čistoće p.a., "Merck".

6. Kadmijum(II)-hlorid-monohidrat, $1 \cdot 10^{-4}$ g cm^{-3} Cd(II)

Radni rastvor je pripreman rastvaranjem tačno odmerene mase $CdCl_2 \cdot H_2O$ čistoće p.a., "Merck".

7. Dikofenak, Acetilsalicilna kiselina, Ibuprofen, Dimenhidrinat, Klonazepam, Diazepam, $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3}

Radni rastvori pomenutih supstanci u etanolu pripremani su rastvaranjem tačno odmerene mase čiste supstance (čistoće 99,8%), dobijene u laboratoriji farmaceutske kuće Galenika a. d., Beograd. Rastvori su čuvani u frižideru ($4^{\circ}C$), zaštićeni Al-folijom.

8. Natrijum-hlorid, 1 mol dm^{-3}

Radni rastvor je pripreman rastvaranjem tačno odmerene mase NaCl čistoće p.a., "Merck".

3.2.3. Spektrofotometrijski postupak za praćenje brzine indikatorske reakcije

Za praćenje brzine reakcije primenjen je spektrofotometrijski postupak, odnosno praćena je promena apsorbancije rastvora u funkciji vremena odigravanja reakcije na odgovarajućoj talasnoj dužini.

Pri tome je primenjen sledeći postupak: određene zapremine radnih rastvora reaktanata odmeravane su u četvorokraki sud sledećim redosledom: u prvi krak 1-nitrozo-2-naftol, u drugi natrijum-hidroksid/sirćetna kiselina, u treći odgovarajući analgetik/sedativ i u četvrti rastvor kobalta(II)/bakra(II)/kadmijuma(II), elektrolit natrijum-hlorid i etanol do zapremine 10,00 cm^3. Zatim su reaktanti pomešani uz istovremeno uključivanje štoperice. Tim rastvorom je punjena radna kiveta i aparat je uključivan 1 min od trenutka mešanja. Izborom metode "time drive" aparat je beležio vrednosti apsorbance svakih 30 s, u toku prvih 5 minuta, odnosno crtao je kinetičku krivu A = f(t). Na ovaj način je umesto veličine $\partial c / \partial t$ određivana njoj proporcionalna veličina $\partial A / \partial t$ koja je proporcionalna brzini reakcije:

$$\frac{\partial A}{\partial t} = \varepsilon \cdot l \cdot \frac{\partial c}{\partial t} = \text{tg}\,\alpha$$

∂c - promena koncentracije indikatorske supstance
ε - molarni koeficijent apsorpcije ($dm^3\ mol^{-1}\ cm^{-1}$)
l - debljina apsorpcionog sloja (cm)
$tg\alpha$ - nagib linearnog dela kinetičke krive u koordinatnom sistemu A = f(t) .

Za obradu kinetičkih parametara primenjena je tangensna metoda, zbog linearne zavisnosti apsorbance rastvora u toku prvih 5-6 minuta od početka odigravanja reakcije.

Sva merenja su vršena na temperaturi od 22,0 ± 0,1°C.

3.2.4. Priprema uzoraka za analizu

Diklofenak

Diklofen Retard, tablete, 100 mg, Galenika a.d., Beograd
Diklofen, ampule, 3 cm^3/75 mg, Galenika a.d., Beograd
Diklofen Retard, tablete, 100 mg, Panfarma d.o.o., Beograd

Deset tableta je dobro usitnjeno u avanu i odmereno 100 mg, što odgovara sadržaju diklofenaka u jednoj tableti. Sadržaj je prenet u kivetu za centrifugiranje, dodato je 25,00 cm^3 apsolutnog etanola i diklofenak je rastvaran u ultrazvučnom kupatilu 10 minuta. Zatim je sadržaj centrifugiran 10 minuta pri 1800 o/min. Nakon centrifugiranja, rastvor iznad taloga je odekantovan u normalni sud od 100,00 cm^3, a ispiranje taloga je vršeno mućkanjem sa novom količinom etanola (25,00 cm^3) i ponovnim centrifugiranjem. Rastvor iznad taloga je ponovo odekantovan, talogu je dodato novih 25,00 cm^3 apsolutnog etanola i sve je preneto u levak za kvantitativno ceđenje (plava traka, Whatman No.42). Talog je ispran sa 25,00 cm^3 apsolutnog etanola (ukupna zapremina rastvora je bila 100,00 cm^3). Od tako dobijenih rastvora opipetirano je 5,00 cm^3, u normalne sudove od 100,00 cm^3 i dopunjeno apsolutnim etanolom do crte, pri čemu je očekivana koncentracija diklofenaka u oba rastvora bila 500,0 μg cm^{-3}. Za kinetička određivanja, od ovih rastvora otpipetirane su odgovarajuće zapremine diklofenaka da bi se dobile koncentracije navedene u tabeli 18.

Sadržaj 3 ampule, što odgovara količini diklofenaka od 225 mg, kvantitativno je prenet u normalni sud od 250,00 cm^3 i dopunjen etanolom do crte. Od ovog rastvora otpipetirano je 5,00 cm^3 i preneto u normalni sud od 50,00 cm^3, pri čemu je dobijen rastvor čija je očekivana koncentracija diklofenaka bila 90,0 μg cm^{-3}. Za kinetička određivanja, od ovog rastvora otpipetirana je odgovarajuća zapremina diklofenaka da bi se dobila koncentracija navedena u tabeli 18.

Humani kontrolni serum "Lytorol N", bioMérieux® sa, Francuska

Otpipetirano je 0,50 cm^3 seruma i dodata je određena zapremina standardnog rastvora diklofenaka koncentracije 10 mg cm^{-3} i 25 cm^3 etanola. Sadržaj je nakon mešanja, centrifugiran 5 minuta pri 3000 o/min. Nakon taloženja proteinskog dela seruma, rastvor je prenet u normalni sud od 50,00 cm^3 i dopunjen do crte etanolom. Koncentracija diklofenaka bila je 200,0 μg cm^{-3}. Za kinetička određivanja, od ovog rastvora otpipetirane su odgovarajuće zapremine da bi se dobile koncentracije diklofenaka u serumu navedene u tabeli 19. S obzirom na to da joni gvožđa ometaju određivanje diklofenaka u serumu, oni su maskirani dodavanjem određene zapremine rastvora fluorida koncentracije $1{,}0 \cdot 10^{-4}$ g cm^{-3}. S druge strane, odnos koncentracije D i F^- bio je približno 1:10 (w/w), tako da fluorid kao strani jon pri tom odnosu nije imao primetnog uticaja na brzinu reakcije (tabela 17).

Za HPLC određivanja, određene zapremine radnih rastvora D (500,0; 90,0; 200,0 μg cm^{-3}) prenete su u normalne sudove od 10,00 cm^3, sadržaj je uparen do suva i rastvoren u mobilnoj fazi (metanol-fosfatni pufer (pH 2,5±0,2; 0,01 M H_3PO_4 + 0,01 M NaH_2PO_4), 700:300 V/V). Zapremina injektovanog uzorka bila je 20 μL, a brzina proticanja mobilne faze 1 cm^3 min^{-1}. Detekcija je vršena na 254 nm.

Acetilsalicilna kiselina

Aspirin®, tablete, 100 mg, Bayer d.o.o., Beograd
Cardiopirin®, tablete, 100 mg, Pharmaswiss d.o.o., Beograd
Andol®, tablete, 100 mg, Pliva Hrvatska d.o.o., Zagreb, Hrvatska

Dvadeset tableta je dobro usitnjeno u avanu i odmereno 50 mg, što odgovara sadržaju acetilsalicilne kiseline u jednoj tableti. Sadržaj je prenet u kivetu za centrifugiranje i dodato je 25,00 cm^3 apsolutnog etanola. Sadržaj je prvo mešan intenzivno 15 minuta, a zatim centrifugiran 10 minuta pri 1800 o/min. Nakon centrifugiranja, rastvor iznad taloga je odekantovan u normalni sud od 100,00 cm^3, a ispiranje taloga je vršeno mućkanjem sa novom količinom etanola (25,00 cm^3) i ponovnim centrifugiranjem. Rastvor iznad taloga je ponovo odekantovan, talogu je dodato novih 25,00 cm^3 apsolutnog etanola i sve je preneto u levak za kvantitativno ceđenje (plava traka, Whatman No.42). Talog je ispran sa 25,00 cm^3 apsolutnog etanola (ukupna zapremina rastvora je bila 100,00 cm^3). Od tako dobijenih rastvora opipetirano je 4,00 cm^3, u normalne sudove od 50,00 cm^3 i dopunjeno apsolutnim etanolom do crte, pri čemu je očekivana koncentracija acetilsalicilne kiseline u oba rastvora bila 40,0 μg cm^{-3}. Od ovih rastvora otpipetirane su odgovarajuće zapremine acetilsalicilne kiseline da bi se dobile koncentracije navedene u tabeli 28.

Humani kontrolni serum "Lytorol N", bioMérieux® sa, Francuska

Otpipetirano je 0,50 cm^3 seruma i dodata je određena zapremina standardnog rastvora acetilsalicilne kiseline koncentracije 10 mg cm^{-3} i 25 cm^3 etanola. Sadržaj je nakon mešanja, centrifugiran 5 minuta pri 3000 o/min. Nakon taloženja proteinskog dela seruma, rastvor je prenet u normalni sud od 50,00 cm^3 i dopunjen do crte etanolom. Očekivana koncentracija acetilsalicilne kiseline bila je 200,0 μg cm^{-3}. Od ovog rastvora otpipetirane su odgovarajuće zapremine da bi se dobile koncentracije acetilsalicilne kiseline u serumu

navedene u tabeli 29. S obzirom na to da joni gvožđa ometaju određivanje acetilsalicilne kiseline u serumu, oni su maskirani dodavanjem određene zapremine rastvora fluorida koncentracije $1{,}0\cdot10^{-4}$ g cm^{-3}. S druge strane, odnos koncentracije ASA i F^- bio je približno 1:15 (w/w), tako da fluorid kao strani jon pri tom odnosu nije imao primetnog uticaja na brzinu reakcije (tabela 27).

Za HPLC određivanja, određene zapremine radnih rastvora ASA(40,0; 200,0 μg cm^{-3}) prenete su u normalne sudove od 10,00 cm^3, sadržaj je uparen do suva i rastvoren u mobilnoj fazi (fosforna kiselina-acetonitril-voda, 2:400:600 V/V/V). Zapremina injektovanog uzorka bila je 10 μL, a brzina proticanja mobilne faze 1 cm^3 min^{-1}. Detekcija je vršena na 237 nm.

Ibuprofen

Ibuprofen, tablete, 400 mg, Galenika a.d., Beograd
Ibuprofen, tablete, 200 mg, Panfarma, Beograd
Ibuprofen, krema, 20g, 1g/100mg, Galenika a.d., Beograd

Dvadeset tableta je dobro usitnjeno u avanu i odmereno je 400 mg, što odgovara sadržaju ibuprofena u jednoj tableti. Sadržaj je prenet u kivetu za centrifugiranje i dodato je 25,00 cm^3 apsolutnog etanola. Sadržaj je prvo mešan intenzivno 15 minuta, a zatim centrifugiran 10 minuta pri 1800 o/min. Nakon centrifugiranja, rastvor iznad taloga je odekantovan u normalni sud od 100,00 cm^3, a ispiranje taloga je vršeno mućkanjem sa novom količinom etanola (25,00 cm^3) i ponovnim centrifugiranjem. Rastvor iznad taloga je ponovo odekantovan, talogu je dodato novih 25,00 cm^3 apsolutnog etanola i sve je preneto u levak za kvantitativno ceđenje (plava traka, Whatman No.42). Talog je ispran sa 25,00 cm^3 apsolutnog etanola (ukupna zapremina rastvora je bila 100,00 cm^3). Od tako dobijenih rastvora opipetirano je 2,50 cm^3, u normalne sudove od 100,00 cm^3 i dopunjeno apsolutnim etanolom do crte, pri čemu je očekivana koncentracija ibuprofena u oba rastvora bila 100,0 μg cm^{-3}. Od ovih rastvora otpipetirane su odgovarajuće zapremine ibuprofena da bi se dobile koncentracije navedene u tabeli 38.

4,000 g kreme, koja sadrži 400 mg ibuprofena, izmereno je i pomešano sa 25,00 cm^3 etanola. Sadržaj je intenzivno mešan 30 minuta, a zatim centrifugiran 10 minuta pri 1800 o/min i prenet u u levak za kvantitativno ceđenje (plava traka, Whatman No.42). Dalje tretiranje uzorka bilo je kao u slučaju tableta.

Humani kontrolni serum "Lytorol N", bioMérieux® sa, Francuska

Otpipetirano je 0,50 cm^3 seruma i dodata je određena zapremina standardnog rastvora ibuprofena koncentracije 10 mg cm^{-3} i 25 cm^3 etanola. Sadržaj je nakon mešanja, centrifugiran 5 minuta pri 3000 o/min. Nakon taloženja proteinskog dela seruma, rastvor je prenet u normalni sud od 50,00 cm^3 i dopunjen do crte etanolom. Očekivana koncentracija ibuprofena bila je 200,0 μg cm^{-3}. Od ovog rastvora otpipetirane su odgovarajuće zapremine da bi se dobile koncentracije ibuprofena u serumu navedene u tabeli 39. S obzirom na to da joni gvožđa ometaju određivanje ibuprofena u serumu, oni su maskirani dodavanjem određene zapremine rastvora fluorida koncentracije $1{,}0\cdot10^{-4}$ g cm^{-3}. S druge strane, odnos

koncentracije IB i F^- bio je približno 1:10 (w/w), tako da fluorid kao strani jon pri tom odnosu nije imao primetnog uticaja na brzinu reakcije (tabela 37).

Za HPLC određivanja, određene zapremine radnih rastvora IB (100,0; 200,0 μg cm^{-3}) prenete su u normalne sudove od 10,00 cm^3, sadržaj je uparen do suva i rastvoren u mobilnoj fazi (fosforna kiselina-acetonitril-voda, 0.5:340:600 V/V/V). Zapremina injektovanog uzorka bila je 20 μL, a brzina proticanja mobilne faze 2 cm^3 min^{-1}. Detekcija je vršena na 214 nm.

Dimenhidrinat

Dramina, tablete, 50 mg, Jadran, Galenska Laboratorija, Rijeka, Hrvatska

Sadržaj pomoćnih supstanci: mikrokristalna celuloza, laktoza-monohidrat, magnezijum-stearat

Dimigal®, tablete, 50 mg, Galenika, a. d., Beograd

Sadržaj pomoćnih supstanci: kukuruzni skrob, preželatinizirani skrob, magnezijum-stearat, laktoza monohidrat, boja citron rumena (E 102)

Dvadeset tableta je dobro usitnjeno u avanu i odmereno je 50 mg, što odgovara sadržaju dimenhidrinata u jednoj tableti. Sadržaj je prenet u kivetu za centrifugiranje i dodato je 25,00 cm^3 apsolutnog etanola. Sadržaj je prvo mešan intenzivno 15 minuta, a zatim centrifugiran 10 minuta pri 1800 o/min. Nakon centrifugiranja, rastvor iznad taloga je odekantovan u normalni sud od 100,00 cm^3, a ispiranje taloga je vršeno mućkanjem sa novom količinom etanola (25,00 cm^3) i ponovnim centrifugiranjem. Rastvor iznad taloga je ponovo odekantovan, talogu je dodato novih 25,00 cm^3 absolutnog etanola i sve je preneto u levak za kvantitativno ceđenje (plava traka, Whatman No.42). Talog je ispran sa 25,00 cm^3 apsolutnog etanola (ukupna zapremina rastvora je bila 100,00 cm^3). Od tako dobijenih rastvora opipetirano je 4,00 cm^3, u normalne sudove od 50,00 cm^3 i dopunjeno apsolutnim etanolom do crte, pri čemu je očekivana koncentracija dimenhidrinata u oba rastvora bila 40,0 μg cm^{-3}. Od ovih rastvora otpipetirane su odgovarajuće zapremine dimenhidrinata da bi se dobile koncentracije navedene u tabeli 48.

Humani kontrolni serum "Lytorol N", bioMérieux® sa, Francuska

Otpipetirano je 0,50 cm^3 seruma i dodata je određena zapremina standardnog rastvora dimenhidrinata koncentracije 10 mg cm^{-3} i 25 cm^3 etanola. Sadržaj je nakon mešanja, centrifugiran 5 minuta pri 3000 o/min. Nakon taloženja proteinskog dela seruma, rastvor je prenet u normalni sud od 50,00 cm^3 i dopunjen do crte etanolom. Očekivana koncentracija dimenhidrinata bila je 200,0 μg cm^{-3}. Od ovog rastvora otpipetirana je odgovarajuća zapremina da bi se dobila koncentracija dimenhidrinata u serumu navedena u tabeli 49. S obzirom na to da joni gvožđa ometaju određivanje dimenhidrinata u serumu, oni su maskirani dodavanjem određene zapremine rastvora fluorida koncentracije $1{,}0 \cdot 10^{-4}$ g cm^{-3}. S druge strane, odnos koncentracije DMH i F^- bio je približno 1:15 (w/w), tako da fluorid kao strani jon pri tom odnosu nije imao primetnog uticaja na brzinu reakcije (tabela 47).

Za HPLC određivanja, određene zapremine radnih rastvora dimenhidrinata (40,0; 200,0 μg cm^{-3}) prenete su u normalne sudove od 10,00 cm^3, sadržaj je uparen do suva i rastvoren u mobilnoj fazi (0,05 M fosfatni pufer (pH 3,0±0,1; 0,05 M Na_2HPO_4 + H_3PO_4 do pH 3,0±0,1)-acetonitril, 80:20 V/V). Zapremina injektovanog uzorka bila je 15 μL, a brzina proticanja mobilne faze 1,0 cm^3 min^{-1}. Detekcija je vršena na 285 nm.

Klonazepam

Rivotril, tablete, 2 mg, Galenika a. d., Beograd
Rivotril, tablete, 2 mg, La Roche, Švajcarska
Sadržaj pomoćnih supstanci: kukuruzni skrob, laktoza monohidrat, talk, magnezijum-stearat

Dvadeset tableta je dobro usitnjeno u avanu i odmereno je 20 mg klonazepama. Sadržaj je prenet u kivetu za centrifugiranje i dodato je 25,00 cm^3 apsolutnog etanola. Sadržaj je prvo mešan intenzivno 15 minuta, a zatim centrifugiran 10 minuta pri 1800 o/min. Nakon centrifugiranja, rastvor iznad taloga je odekantovan u normalni sud od 100,00 cm^3, a ispiranje taloga je vršeno mućkanjem sa novom količinom etanola (25,00 cm^3) i ponovnim centrifugiranjem. Rastvor iznad taloga je ponovo odekantovan, talogu je dodato novih 25,00 cm^3 apsolutnog etanola i sve je preneto u levak za kvantitativno ceđenje (plava traka, Whatman No.42). Talog je ispran sa 25,0 cm^3 apsolutnog etanola (ukupna zapremina rastvora je bila 100,00 cm^3). Od tako dobijenih rastvora opipetirano je 5,00 cm^3, u normalne sudove od 50,00 cm^3 i dopunjeno apsolutnim etanolom do crte, pri čemu je očekivana koncentracija klonazepama u oba rastvora bila 20,0 μg cm^{-3}. Od ovih rastvora otpipetirane su odgovarajuće zapremine klonazepama da bi se dobile koncentracije navedene u tabeli 58.

Humani kontrolni serum "Lytorol N", bioMérieux® sa, Francuska

Otpipetirano je 0,50 cm^3 seruma i dodata je određena zapremina standardnog rastvora klonazepama koncentracije 10 mg cm^{-3} i 25 cm^3 etanola. Sadržaj je nakon mešanja, centrifugiran 5 minuta pri 3000 o/min. Nakon taloženja proteinskog dela seruma, rastvor je prenet u normalni sud od 50,00 cm^3 i dopunjen do crte etanolom. Očekivana koncentracija klonazepama bila je 200,0 μg cm^{-3}. Od ovog rastvora otpipetirane su odgovarajuće zapremine da bi se dobile koncentracije klonazepama u serumu navedene u tabeli 59. S obzirom na to da joni gvožđa ometaju određivanje klonazepama u serumu, oni su maskirani dodavanjem određene zapremine rastvora fluorida koncentracije $1{,}0 \cdot 10^{-4}$ g cm^{-3}. S druge strane, odnos koncentracije KL i F^- bio je približno 1:10 (w/w), tako da fluorid kao strani jon pri tom odnosu nije imao primetnog uticaja na brzinu reakcije (tabela 57).

Za HPLC određivanja, određene zapremine radnih rastvora KZP (20,0;200,0 μg cm^{-3}) prenete su u normalne sudove od 10,00 cm^3, sadržaj je uparen do suva i rastvoren u mobilnoj fazi (tetrahidrofuran-metanol-amonijum fosfat (pH 8,0±0,1), 10:42:48 V/V/V). Zapremina injektovanog uzorka bila je 10 μL, a brzina proticanja mobilne faze 1 cm^3 min^{-1}. Detekcija je vršena na 254 nm.

Diazepam

Bensedin®, tablete, 2 mg, Galenika a. d., Beograd
Diazepam, tablete, 2 mg, Panfarma d.o.o., Beograd
Diazepam, mikroklizme, 2,5 cm^3/5 mg, Apoteka Beograd

Dvadeset tableta je dobro usitnjeno u avanu i odmereno je 20 mg diazepama. Sadržaj je prenet u kivetu za centrifugiranje i dodato je 25,00 cm^3 apsolutnog etanola. Sadržaj je prvo mešan intenzivno 15 minuta, a zatim centrifugiran 10 minuta pri 1800 o/min. Nakon centrifugiranja, rastvor iznad taloga je odekantovan u normalni sud od 100,00 cm^3, a ispiranje taloga je vršeno mućkanjem sa novom količinom etanola (25,00 cm^3) i ponovnim centrifugiranjem. Rastvor iznad taloga je ponovo odekantovan, talogu je dodato novih 25,00 cm^3 apsolutnog etanola i sve je preneto u levak za kvantitativno ceđenje (plava traka, Whatman No.42). Talog je ispran sa 25,00 cm^3 apsolutnog etanola (ukupna zapremina rastvora je bila 100,00 cm^3). Od tako dobijenih rastvora opipetirano je 5,00 cm^3, u normalne sudove od 50,00 cm^3 i dopunjeno apsolutnim etanolom do crte, pri čemu je očekivana koncentracija diazepama u oba rastvora bila 20,0 μg cm^{-3}. Od ovih rastvora otpipetirane su odgovarajuće zapremine diazepama da bi se dobile koncentracije navedene u tabeli 68.

Rastvor 4 mikroklizme, ukupne mase diazepama 20 mg, kvantitativno je prenet u normalni sud od 50,00 cm^3 i dopunjen etanolom do crte. Od ovog rastvora otpipetirano je 2,50 cm^3 i preneto u normalni sud od 25,00 cm^3, pri čemu je dobijen rastvor čija je očekivana koncentracija diazepama bila 40,0 μg cm^{-3}. Od ovog rastvora otpipetirana je odgovarajuća zapremina diazepama da bi se dobila koncentracija navedena u tabeli 68.

Humani kontrolni serum "Lytorol N", bioMérieux® sa, Francuska

Otpipetirano je 0,50 cm^3 seruma i dodata je određena zapremina standardnog rastvora diazepama koncentracije 10 mg cm^{-3} i 25 cm^3 etanola. Sadržaj je nakon mešanja, centrifugiran 5 minuta pri 3000 o/min. Nakon taloženja proteinskog dela seruma, rastvor je prenet u normalni sud od 50,00 cm^3 i dopunjen do crte etanolom. Koncentracija diazepama bila je 200,0 μg cm^{-3}. Od ovog rastvora otpipetirana je odgovarajuća zapremina da bi se dobila koncentracija diazepama u serumu navedena u tabeli 69. S obzirom na to da joni gvožđa ometaju određivanje diazepama u serumu, oni su maskirani dodavanjem određene zapremine rastvora fluorida koncentracije $1{,}0 \cdot 10^{-4}$ g cm^{-3}. S druge strane, odnos koncentracije DZP i F^- bio je približno 1:10 (w/w), tako da fluorid kao strani jon pri tom odnosu nije imao primetnog uticaja na brzinu reakcije (tabela 67).

Za HPLC određivanja, određene zapremine radnih rastvora DZP (20,0;200,0 μg cm^{-3}) prenete su u normalne sudove od 10,00 cm^3, sadržaj je uparen do suva i rastvoren u mobilnoj fazi (acetonitril-voda, 30:70 V/V). Zapremina injektovanog uzorka bila je 20 μL, a brzina proticanja mobilne faze 1 cm^3 min^{-1}. Detekcija je vršena na 254 nm.

3.3. Izbor indikatorske reakcije

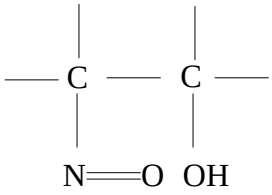
Metode za određivanje pomenutih analgetika i sedativa zasnivaju se formiranju organometalnih kompleksa, odnosno na izmeni metalnog jona između dva liganda. 1-nitrozo-2-naftol, kao ligand, formira komplekse sa metalnim jonima kao što su bakar, kobalt i kadmijum. Uvođenjem odgovarajućeg analgetika ili sedativa u reakciju, dolazi do istiskivanja 1-nitrozo-2-naftola iz kompleksa sa metalnim jonom, jer ispitivani analgetici i sedativi grade stabilnije organometalne komplekse. Reakcija je u literaturi poznata kao "ligand-exchange reaction".

$$M[R(NO)O] + A/S \rightarrow M[A/S] + R(NO)OH$$

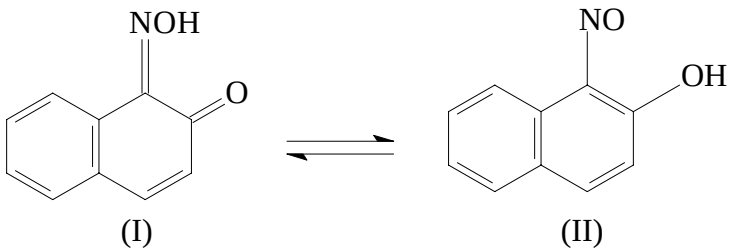
gde je:

M - metalni jon (Cu, Co, Cd)
R(NO)OH - 1-nitrozo-2-naftol
A/S - analgetik/sedativ

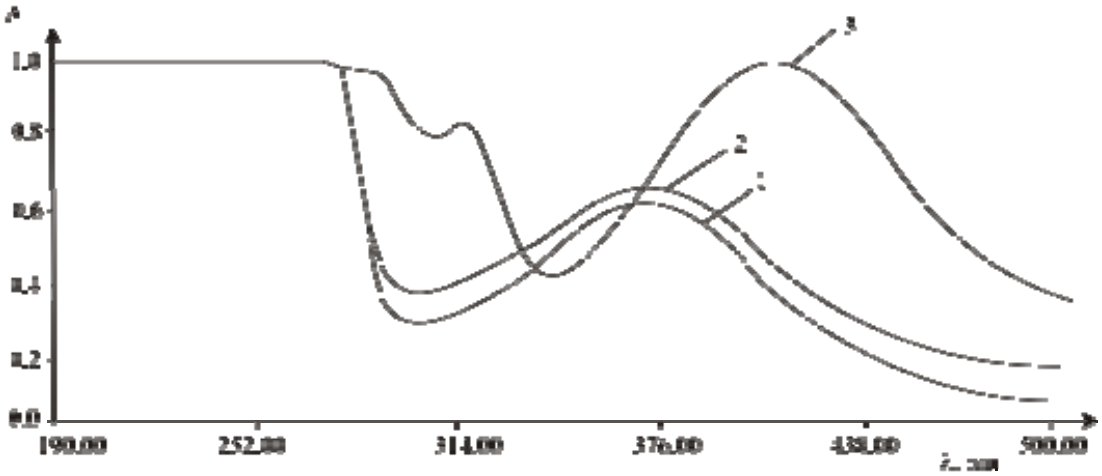
1-nitrozo-2-naftol (R(NO)OH) je prvi organski reagens koji je korišćen za analitičko određivanje metalnih jona, naročito kobalta, kao i za razdvajanje kobalta i nikla. Kao elektron donor on formira obojene komplekse sa jonima prelaznih metala kao što su gvožđe, kobalt, bakar, vanadijum.[133] Poseduje reaktivnu grupu:



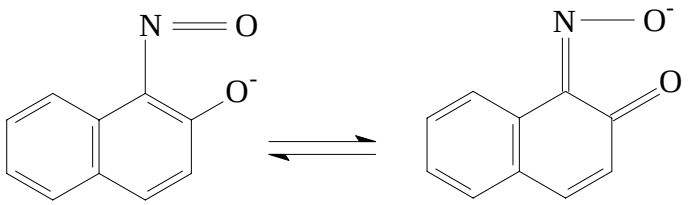
1-nitroso-2-naftol može da se predstavi rezonancionim formulama koje odgovaraju: hinoidnoj (I) i benzenoidnoj strukturi (II) (slika 16). Ova dva oblika imaju potpuno različite apsorpcione spektre. Kao što se može videti sa slike 17, apsorpcioni spektar 1-nitrozo-2-naftola u etanolu pokazuje karakterističan maksimum na 370 nm i više odgovara hinoidnoj (I) nego benzenoidnoj (II) strukturi.[134] U baznoj sredini dolazi do batohromnog pomeranja (425 nm) i dominira struktura I, sto je i Feigel pokazao.[135] Apsorpciona traka na toj talasnoj dužini je posledica rezonancije (slika 18, strukture III i IV). U kiseloj sredini takođe dolazi do neznatnog batohromnog pomeranja (375 nm) i dominira struktura (II).



Slika 16. Tautomerni oblici 1-nitrozo-2-naftola



Slika 17. Apsorpcioni spektar 1-nitrozo-2-naftola u etanolu (1), u etanolno kiseloj (2) i u etanolno baznoj sredini (3). Koncentracije u rastvoru: $c_{R(NO)OH} = 1{,}0 \cdot 10^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{CH_3COOH} = 0{,}1$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{NaOH} = 1{,}0 \cdot 10^{-2}$ *mol dm*$^{-3}$



III IV

Slika 18. Rezonantne strukture 1-nitrozo-2-naftola

Zbog promene boje reakcionog sistema moguće je primeniti spektrofotometrijski postupak praćenja brzine nestajanja ili građenja kompleksa, odnosno moguće je pratiti promene apsorbancije rastvora u funkciji vremena odigravanja reakcije na odgovarajućoj talasnoj dužini.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Kinetičko određivanje mikrokoličina diklofenaka

4.1.1. Određivanje optimalnih koncentracija

Prilikom razrade metode za određivanje diklofenaka korišćena je reakcija izmene metalnog jona između dva liganda. Reakcija se zasniva na istiskivanju 1-nitrozo-2-naftola iz kompleksa sa kobaltom nakon dodatka diklofenaka.

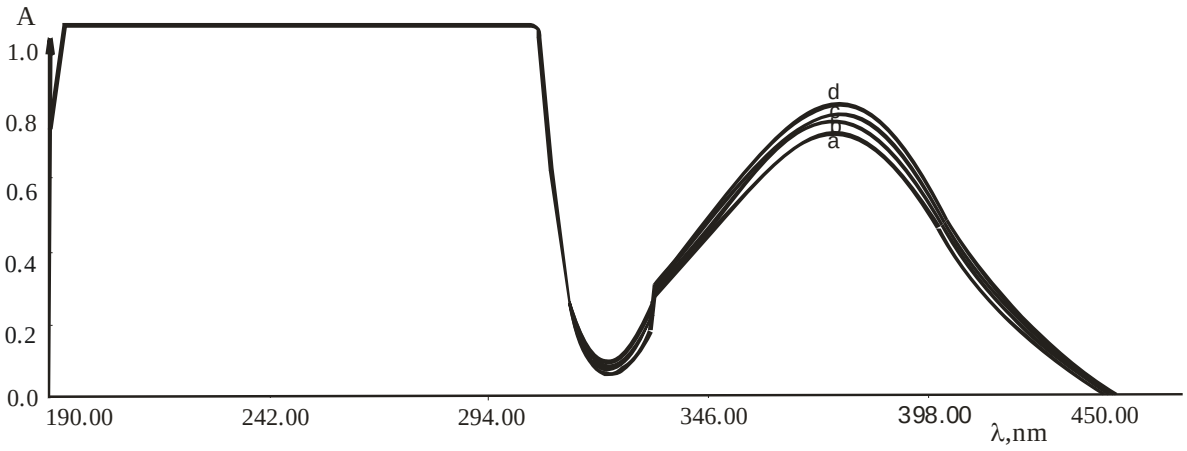
Prema Callahan-u i ostalima[136] dvovalentan kobalt gradi kompleks sa 1-nitrozo-2-naftolom, oslobađajući dva vodonična jona na jedan jon kobalta:

$$Co^{2+} + 2R(NO)OH \rightarrow Co\left[RO(NO)O\right]_2 + 2H^+$$

Takođe je zapaženo da je ovaj kompleks stabilan u kiseloj sredini. Nizak potencijal oksidacije dvovalentnog kobalta, $Co^{2+} \rightarrow Co^{3+} + e^-$, $E^\circ = -1{,}84V$, ide u prilog ovoj konstantaciji.

Spektroskopskom analizom bis(1-nitrozo-2-naftolato)Co(II) kompleksa utvrđena je njegova oktaedarska struktura i određena empirijska formula $Co[RO(NO)O]_2 \cdot 2H_2O$.

S druge strane, dikofenak takođe gradi kompleks sa Co(II). Empirijska formula kompleksa je $CoD_2 \cdot H_2O$. Spektroskopskom analizom kompleksa utvrđena je oktaedarska koordinacija metalnog jona preko karboksilnih grupa liganda, tj. diklofenaka.[137,138] Kompleks kobata sa diklofenakom je stabilniji od kompleksa sa 1-nitrozo-2-naftolom, što je iskorišćeno za kinetičko određivanje diklofenaka.

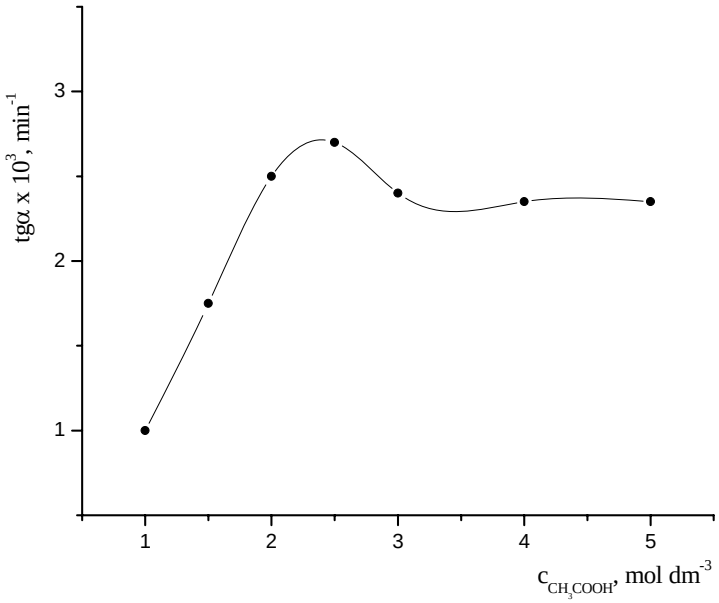


Slika 19. Promena apsorpcionog spektra 1-nitrozo-2-naftola u sirćetno kiseloj sredini sa vremenom nakon dodatka diklofenaka; a) 1; b) 3; c) 5; d) 7 min. Koncentracije u rastvoru: $c_{R(NO)OH} = 1{,}0 \cdot 10^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{CH_3COOH} = 0{,}5$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{Co^{2+}} = 5{,}1 \cdot 10^{-6}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_D = 1{,}0 \cdot 10^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$

Ravnoteža reakcije $Co\left[RO(NO)O\right]_2 + 2D \rightarrow CoD_2 \cdot H_2O + 2R(NO)OH$ se pomera u desnu stranu, i dikolfenak je određen na osnovu merenje brzine nastajanja 1-nitrozo-2-naftola u kiseloj sredini na 375 nm (slika 19).

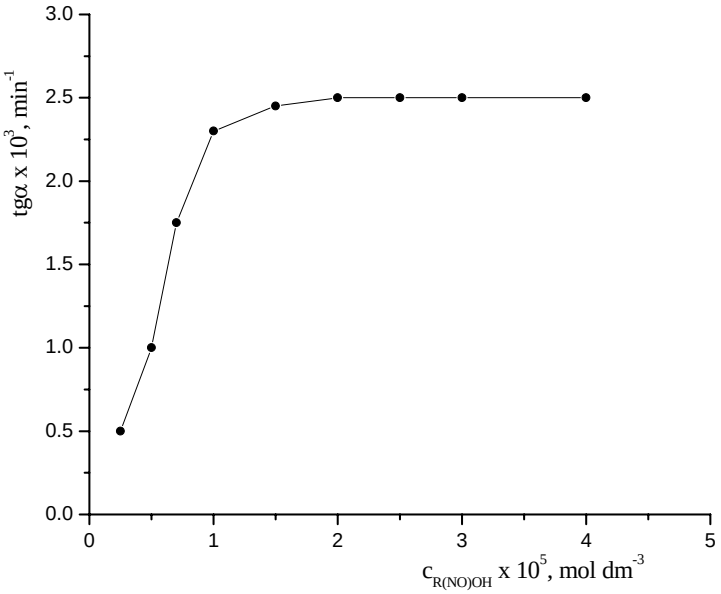
U cilju razrade što osetljivije metode za određivanje diklofenaka, trebalo je najpre odrediti optimalne uslove odigravanja reakcije. U tu svrhu praćena je zavisnost brzine reakcije (tgα) od koncentracije svakog reaktanta pojedinačno (R(NO)OH, CH_3COOH, Co^{2+}, D).

Uticaj koncentracije sirćetne kiseline na brzinu reakcije (slika 20) praćen je u intervalu koncentracije 1,0-5,0 mol dm^{-3}. Kao što se sa slike može videti, brzina reakcije raste sa povećanjem koncentracije sirćetne kiseline, dostiže maksimum i pri koncentracijama većim od 3,0 mol dm^{-3} ostaje konstantna. Dalja merenja su vršena pri koncentraciji sirćetne kiseline od 4,0 mol dm^{-3}.

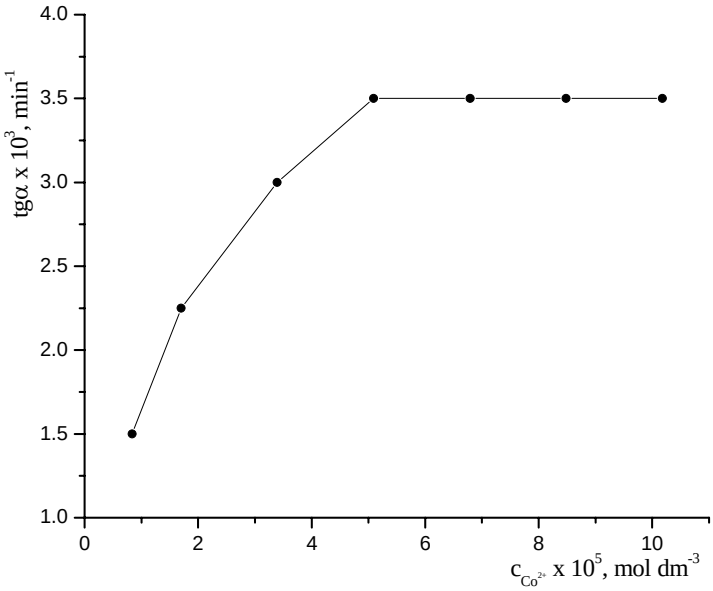


Slika 20. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije sirćetne kiseline. Koncentracije u rastvoru: $c_{R(NO)OH} = 1{,}0 \cdot 10^{-5}$ *mol* dm^{-3}, $c_{Co^{2+}} = 1{,}7 \cdot 10^{-5}$ *mol* dm^{-3}, $c_D = 1{,}0 \cdot 10^{-4}$ *mol* dm^{-3}, $c_{NaCl} = 0{,}1$ *mol* dm^{-3}, $t = 22{,}0 \pm 0{,}1°C$

Zavisnost brzine reakcije od koncentracije 1-nitrozo-2-naftola prikazana je na slici 21. Brzina reakcije raste sa povećanjem koncentracije u intervalu od $2{,}5 \cdot 10^{-6}$-$2{,}0 \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3}. Pri koncentracijama većim od $2{,}0 \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3}, brzina reakcije se ne menja. Koncentracija 1-nitrozo-2-naftola od $2{,}5 \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3} uzeta je kao optimalna koncentracija za dalja merenja.



Slika 21. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije 1-nitrozo-2-naftola. Koncentracije u rastvoru: c_{CH_3COOH} *= 4,0 mol dm*$^{-3}$, $c_{Co^{2+}}$ *= 1,7·10*$^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, c_D *= 1,0·10*$^{-4}$ *mol dm*$^{-3}$, c_{NaCl} *= 0,1 mol dm*$^{-3}$, *t = 22,0 ± 0,1°C*

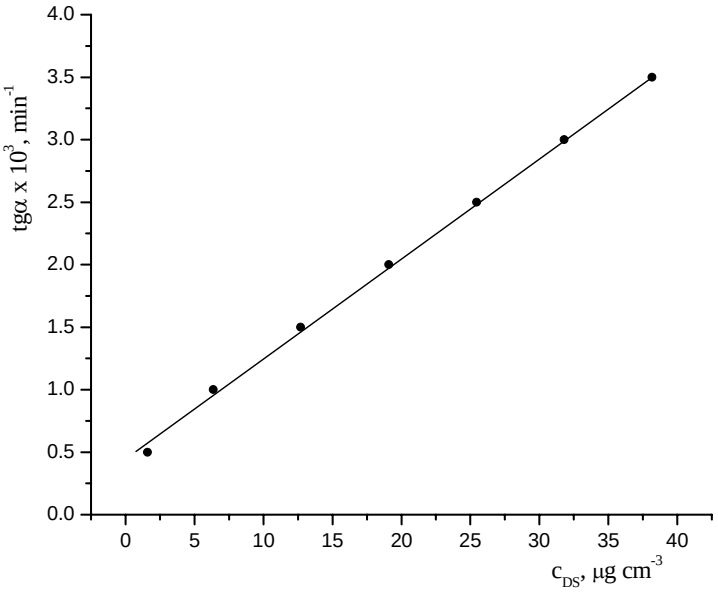


Slika 22. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije Co(II). Koncentracije u rastvoru: c_{CH_3COOH} *= 4,0 mol dm*$^{-3}$, $c_{R(NO)OH}$ *= 2,5·10*$^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, c_D *= 1,0·10*$^{-4}$ *mol dm*$^{-3}$, c_{NaCl} *= 0,1 mol dm*$^{-3}$, *t = 22,0 ± 0,1°C*

Zavisnost brzine reakcije od koncentracije kobalt(II) data je na slici 22. Sa slike se može videti da brzina reakcije raste sa povećanjem koncentracije i postaje konstantna pri koncentraciji Co(II) od $5{,}1\cdot10^{-5}$ mol dm^{-3}. U daljem radu koncentracija Co(II) od $6{,}8\cdot10^{-5}$ mol dm^{-3} uzeta je kao optimalna koncentracija.

Pri optimalnim uslovima odigravanja reakcije: c_{CH_3COOH} *= 4,0 mol* dm^{-3}, $c_{R(NO)OH}$ *=* $2{,}5\cdot10^{-5}$ *mol* dm^{-3}, $c_{Co^{2+}}$ *=* $6{,}8\cdot10^{-5}$ *mol* dm^{-3}, c_{NaCl} *= 0,1 mol* dm^{-3}, *t = 22,0 ± 0,1*$^{\circ}C$, praćen je uticaj diklofenaka na brzinu reakcije.

Dobijena kalibraciona prava je linearna u intervalu koncentracije diklofenaka 1,59-38,18 µg cm^{-3} i može poslužiti za određivanje diklofenaka u rastvoru (slika 23).



Slika 23. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije diklofenaka. Koncentracije u rastvoru: c_{CH_3COOH} *= 4,0 mol* dm^{-3}, $c_{R(NO)OH}$ *=* $2{,}5\cdot10^{-5}$ *mol* dm^{-3}, $c_{Co^{2+}}$ *=* $6{,}8\cdot10^{-5}$ *mol* dm^{-3}, c_{NaCl} *= 0,1 mol* dm^{-3}, *t = 22,0 ± 0,1°C*

Kalibraciona prava za određivanje diklofenaka na 22°C može se prikazati sledećom jednačinom:

$$tg\alpha \cdot 10^3 = 0{,}08063 \cdot c_D + 0{,}44301 \qquad r = 0{,}9985$$

gde je:

c_D – koncentracija diklofenaka izražena u µg cm^{-3}

$tg\alpha$ - nagib linearnog dela kinetičke krive u koordinatnom sistemu A = f(t)

Na osnovu prikazanih zavisnosti između brzine reakcije i koncentracije svakog reaktanta pojedinačno, kao i određenog reda reakcije u odnosu na svaki reaktant pojedinačno (tabela 12), može se postaviti kinetička jednačina za ispitivani proces:

$$brzina = k \cdot c_D$$

gde je k - konstanta brzine reakcije.

Kinetička jednačina važi za sledeći opseg koncentracija: R(NO)OH (2,0-4,0)·10^{-5} mol dm^{-3}, CH_3COOH 3,0-5,0 mol dm^{-3}, Co(II) (5,1-10,2)·10^{-5} mol dm^{-3}, D 1,59-38,18 μg cm^{-3}, 0,5·10^{-6}-1,2·10^{-5} mol dm^{-3}.

Tabela 12. Pregled reda reakcije u odnosu na svaki reaktant pojedinačno

Reaktant i opseg koncentracije, mol dm^{-3}	Red reakcije
$1,0 < c_{CH_3COOH} \leq 2,5$ $2,5 \leq c_{CH_3COOH} < 3,0$ $3,0 \leq c_{CH_3COOH} < 5,0$	1 -1 0
$2,5\cdot10^{-6} < c_{R(NO)OH} \leq 2,0\cdot10^{-5}$ $2,0\cdot10^{-5} \leq c_{R(NO)OH} < 4,0\cdot10^{-5}$	1 0
$0,8\cdot10^{-5} < c_{Co^{2+}} \leq 5,1\cdot10^{-5}$ $5,1\cdot10^{-5} \leq c_{Co^{2+}} < 10,2\cdot10^{-5}$	1 0

Analitički i statistički podaci za kalibracionu pravu (tabela 13) dobijeni su metodom linearne regresije u kompjuterskom programu Origin 6.1.

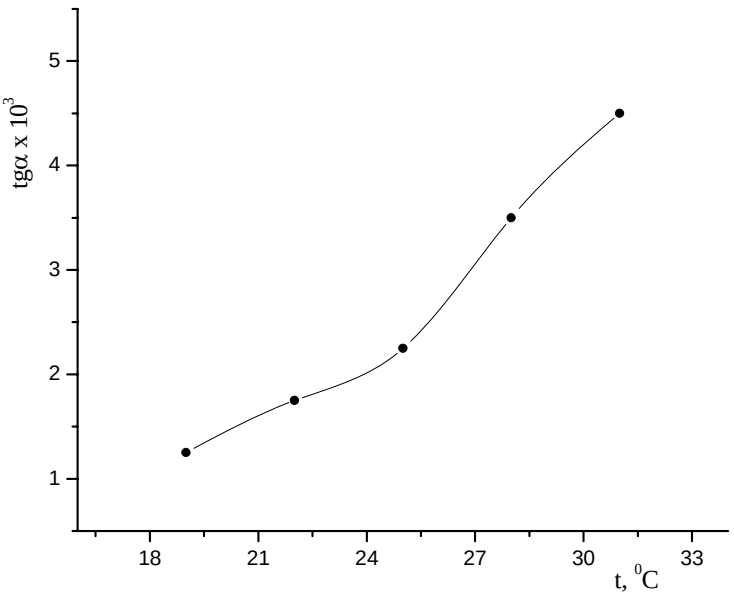
Tabela 13. Analitičke i statističke karakteristike kalibracione prave za određivanje diklofenaka

Parametri	
opseg linearnosti, μg cm^{-3}	1,59 - 38,18, n = 7
jednačina kalibracione parave	$tg\alpha \cdot 10^3 = 0{,}08063 \cdot c_D + 0{,}44301$
(nagib ± SD)·10^3	0,08063 ± 0,00129
(odsečak ± SD)·10^3	0,44301 ± 0,02964
koeficijent korelacije, r	$r = 0{,}9985$
standardna devijacija fitovanja, SD·10^3	0,04236
varijansa, $(SD \cdot 10^3)^{2*}$, $(\mu g\ cm^{-3})^2$	$1{,}8 \cdot 10^{-3}$
granica detekcije, μg cm^{-3}	1,29

*U statistici se za opisivanje preciznosti vrlo široko koristi i kvadrat standardne devijacije, (SD^2), poznat kao varijansa. U eksperimentalnim radovima se, međutim, više koristi standardna devijacija *SD* nego SD^2, jer su jedinice standardne devijacije iste kao i kod merene veličine.

4.1.2. Termodinamičke karakteristike sistema

Brzina ispitivane reakcije praćenja je na 19, 22, 25, 28 i 31°C. Na osnovu dobijenih rezultata merenja dobijen je grafik zavisnosti tgα od temperature (slika 24). S obzirom na to da pri temperaturama višim od 25°C dolazi do odstupanja od linearnosti, dalja ispitivanja su vršena na 22°C.



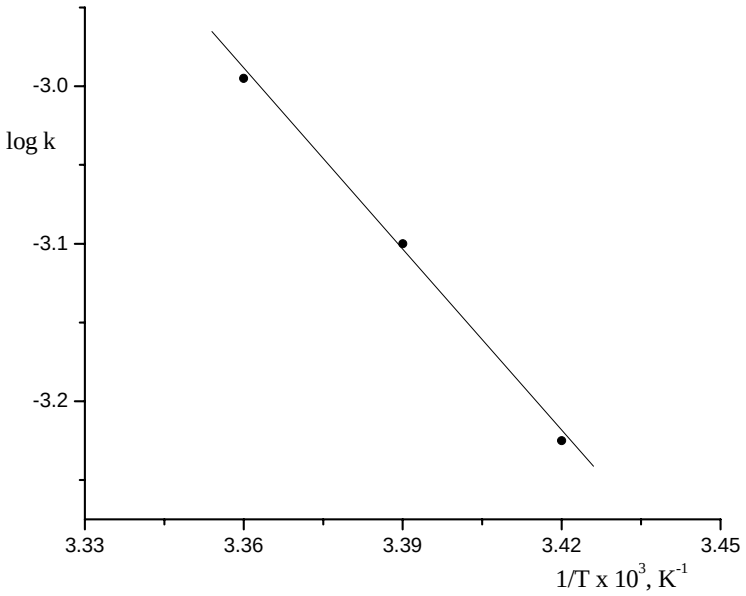
Slika 24. Zavisnost brzine reakcije od temperature. Koncentracije raktanata u rastvoru: c_{CH_3COOH} *= 4,0 mol dm*$^{-3}$, $c_{R(NO)OH}$ *= 2,0·10*$^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{Co^{2+}}$ *= 6,8·10*$^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, c_D *= 6,0 ·10*$^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, c_{NaCl} *= 0,1 mol dm*$^{-3}$

Na osnovu kinetičke jednačine $brzina = k \cdot c_D$, izračunate su konstante brzine reakcije na tri različite temperature (tabela 14).

Tabela 14. Konstante brzine reakcije na različitim temperaturama

$k \cdot 10^3$ (mol dm^{-3})$^{1-n}$s^{-1}	T (K)
0,58	292
0,81	295
1,04	298

n – red reakcije



Slika 25. Zavisnost logk od 1/T

Termodinamički parametri reakcije građenja aktiviranog kompleksa određeni su pomoću prave prikazane na slici 25. Iz nagiba ove prave izračunata je energija aktivacije primenom jednačine:

$$tg\alpha = \frac{d(\log k)}{dT} = -\frac{Ea^*}{19{,}14} \tag{28}$$

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

$$\Delta H^* = E_a^* - nRT \tag{29}$$

gde je n - molekularnost,

odnosno,

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

$$\Delta S^* = 19{,}12\ (\ logk - log\ T - 10{,}3178 + \Delta H^*/19{,}12\ T\ ) \tag{30}$$

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T\ \Delta S^* \tag{31}$$

$$pK^* = \Delta G^*/19{,}14T \tag{32}$$

Vrednosti izračunatih termodinamičkih parametara reakcije građenja aktiviranog kompleksa, primenom gore navedenih jednačina, date su u tabeli 15.

Tabela 15. Termodinamičke karakteristike građenja aktiviranog kompleksa na 295K

Sistem	**Ea* (kJmol^{-1})**	**ΔH* (kJmol^{-1})**	**ΔS* (JK^{-1}mol^{-1})**	**ΔG* (kJmol^{-1})**	**pK***
R(NO)OH+CH_3COOH+Co(II)+D	73,31	70,86	-63,71	89,65	15,88

Prema Hammond-u[139] i Smith-u[140], većina reakcija koje se odvijaju na sobnoj temperaturi imaju energiju aktivacije između 15-30 kcal mol^{-1} (62,76-125,52 kJ mol^{-1}). Vrednost izračunate energije aktivacije za ispitivani sistem je u skladu sa navedenim postulatom.

Takođe, pri relativno niskim temperaturama (sobna i niže temperature) proizvod temperature i entropije je manji od entalpije, $|T\Delta S| << |\Delta H|$.[141,1142]

S obzirom da Gibsova slobodna energija zavisi od temperature, to će i konstanta ravnoteže i položaj ravnoteže zavisiti od temperature. Polazeći od Vant Hofove reakcione izobare za reakcije u rastvoru ($d \ln K_c / dT = \Delta H / RT^2$) može se prodiskutovati uticaj temperature na položaj ravnoteže. Za endotermnu reakciju gde je $\Delta H > 0$ i $dK/dT > 0$, porast temperature povećava konstantu ravnoteže, odnosno pomera je u smeru građenja produkata.

Teorijski najmanja koncentracija koja se može odrediti ovom metodom može se izračunati prema *3,3S* kriterijumu, primenom jednačine (8),[143,144] i iznosi 1,29 μg cm^{-3}.

4.1.3. Tačnost i reproduktivnost određivanja diklofenaka

Tačnost i reproduktivnost metode određeni su za tri koncentracije sa kalibracione prave, pri čemu je izvedeno pet merenja za svaku koncentraciju. Statističkom obradom podataka dobijeni su rezultati koji su sumirani u tabeli 16. Kao što se može videti, relativna greška se kreće od 4,95 do 0,90% za interval koncentracije diklofenaka od 1,59 do 38,18 μg cm^{-3}.

Tabela 16. Tačnost i reproduktivnost određivanja diklofenaka

Koncentracija diklofenaka (μg cm^{-3})		**RSD (%)**	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ **(%)**	**Recovery (%)**
odmereno	**nađeno** $\bar{x} \pm \overline{SD}$			
1,59	1,55 ± 0,08	4,95	-2,52	97,48
19,09	18,73 ± 0,67	3,59	-1,89	98,11
38,18	38,11 ± 0,34	0,90	-0,18	99,82

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

$\overline{SD}$ - standardna devijacija srednje vrednosti, $\overline{SD} = \frac{SD}{\sqrt{n}}$

SD - standardna devijacija pojedinačnog merenja, $SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\left(x_i - \bar{x}\right)^2}{n-1}}$, za n > 25-30,

$SD \to \sigma$, $\bar{x} \to \mu$

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

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

μ – tačna vrednost

Recovery = (nađeno/odmereno)·100

4.1.4. Selektivnost određivanja diklofenaka

Za ocenu selektivnosti određivanja diklofenaka predloženom metodom ispitivan je uticaj većeg broja stranih jona, aminokiselina i punioca farmaceutskih preparata na brzinu reakcije. Reakcionoj smeši pojedinačno su dodavani rastvori ispitivanih supstanci. Pri tome je menjana njihova koncentracija u odnosu na koncentraciju diklofenaka, sve dok nije nađena ona koncentracija koja ometa njegovo određivanje u rastvoru (tabela 17).

Tabela 17. Selektivnost određivanja diklofenaka pri koncentraciji 19,09 μg cm^{-3}

Jonska, molekulska vrsta	I, %	q
Li^+, K^+	5-10	10^3
fruktoza, glukoza, laktoza, Ser, Phe, Met, Tyr, Trp,	10-15	10^2
B_1, B_6, B_{12}, manitol, sorbitol, stearinska kiselina, nikotinska kiselina, Si^{4+}, $C_2O_4^{2-}$, F^-	5-10	
Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}	5-10	10
His, Arg, Lys, Ala, Asp, Gly	usporavaju	1
Fe^{3+}, Cu^{2+}	ubrzavaju	1

q – odnos koncentracije jona/aminokiseline/punioca i D
I - interferencioni koeficijent, $I = (c^{\circ}_D - c_D) / c^{\circ}_D$
c°_D i c_D – koncentracija diklofenaka bez i u prisustvu interferirajuće supstance (dobijena iz jednačine kalibracione prave)

Aminokiseline His, Arg, Lys, Ala, Asp, Gly ometaju određivanje diklofenaka pri odnosu 1:1 jer se kompleksiraju kobaltom, dok Fe^{3+} i Cu^{2+} joni grade komplekse sa 1-nitrozo-2-naftolom tako da i oni smetaju pri određivanju diklofenaka predloženom metodom.

4.1.5. Primena kinetičke metode za određivanje diklofenaka u farmaceutskim preparatima i humanom kontrolnom serumu

Razrađena kinetička metoda za određivanje diklofenaka primenjena je za njegovo određivanje u farmaceutskim preparatima i humanom kontrolnom serumu. Kod određivanja diklofenaka u humanom kontrolnom serumu dodata je ona količina diklofenaka koja odgovara njegovom sadržaju u humanom serumu, kada se on koristi u terapeutske svrhe.[145] Uzorci su pripremani prema postupku koji je opisan u "Eksperimentalnom delu". Kao referentna metoda korišćena je HPLC. [5,6] Rezultati su sumirani u tabelama 18 i 19. HPLC hromatogrami određivanja diklofenaka u tabletama i humanom kontrolnom serumu dati su na slici 26. Dobijeni hromatogrami standarda i uzorka pokazuju poklapanje retencionog vremena za analiziranu aktivnu komponentu - diklofenak. U cilju kvantitativne analize, određena je integrisana površina za dati pik i sa kalibracionog dijagrama za date vrednosti apsorbancije izračunate su koncentracije diklofenaka u ispitivanim uzorcima.

Tabela 18. Tačnost i reproduktivnost određivanja diklofenaka u farmaceutskim preparatima

Metoda kalibracione prave ($\mu g\ cm^{-3}$)		**Referentna metoda (HPLC) ($\mu g\ cm^{-3}$)**	**n**	**RSD (%)**	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ **(%)**	**Recovery (%)**
odmereno	**nađeno** $\bar{x} \pm \overline{SD}$					
20,68*	20,55 ± 0,44	20,90 ± 0,49	5	2,13	-0,63	99,37
25,45**	25,36 ± 0,49	25,08 ± 0,35	5	1,94	-0,35	99,65
30,22***	30,40 ± 0,50	30,33 ± 0,76	5	1,65	0,60	100,60

**Diklofen Retard*, tablete, 100 mg, Galenika a.d., Beograd
***Diklofen*, ampule, 3 cm^3/75 mg, Galenika a.d., Beograd
****Diklofen Retard*, tablete, 100 mg, Panfarma d.o.o., Beograd

Tabela 19. Tačnost i reproduktivnost određivanja diklofenaka u humanom kontrolnom serumu[*]

Metoda kalibracione prave ($\mu g\ cm^{-3}$)		**Referentna metoda (HPLC) ($\mu g\ cm^{-3}$)**	**n**	**RSD (%)**	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ **(%)**	**Recovery (%)**
dodato	**nađeno** $\bar{x} \pm \overline{SD}$					
2,00	1,96 ± 0,07	1,89 ± 0,06	5	3,77	- 2,00	98,00
3,18	3,20 ± 0,1	3,14 ± 0,08	5	3,19	0,63	100,63

[*]Humani kontrolni serum, *"Lytorol N"*, bioMérieux® sa, Francuska

Količina diklofenaka koja je određena kinetičkom metodom u skladu je sa referentnom metodom i deklarisanim vrednostima u farmaceutskim preparatima.

Poređenje standardnih devijacija - F-test, i srednjih vrednosti - t-test[146,147], pri 95%-tnom nivou poverenja i za dati broj stepena slobode, pokazalo je da između dve metode (kinetičke i referentne) ne postoji značajna razlika u preciznosti, $t_{eksp.} < t_{tab.}$ i $F_{eksp.} < F_{tab.}$ (tabele 20 i 21).

Tabela 20. t- i F-vrednosti dobijene primenom dve različite metode za određivanje diklofenaka u farmaceutskim preparatima

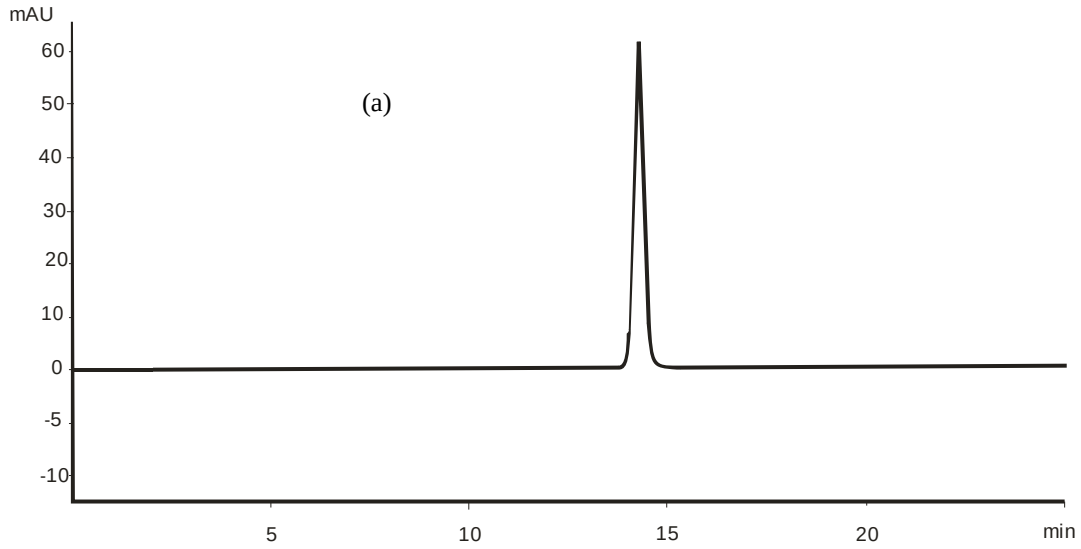
Metoda kalibracione prave ($\mu g\ cm^{-3}$)		**Referentna metoda (HPLC) ($\mu g\ cm^{-3}$)**	**t-test**[*]	**F-test**[*]
odmereno	**nađeno** $\bar{x} \pm \overline{SD}$			
20,68	20,55 ± 0,44	20,90 ± 0,49	1,188	1,24
25,45	25,36 ± 0,49	25,08 ± 0,35	1,039	1,96
30,22	30,40 ± 0,50	30,33 ± 0,76	0,123	2,31

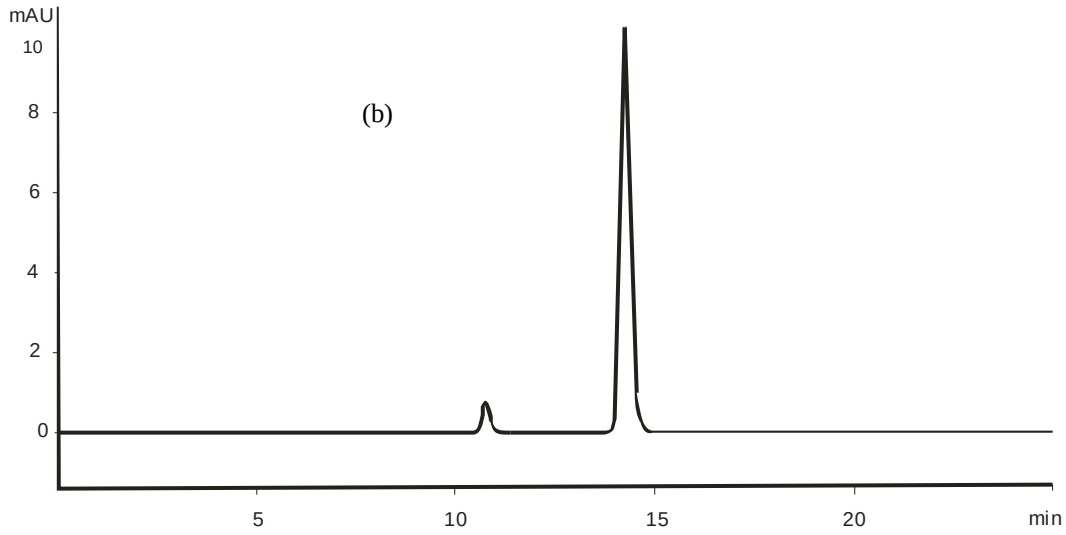
[*]Tablične F- ($\nu_1 = 4$, $\nu_2 = 4$) i t-vrednosti ($\nu = 8$) pri 95%-tnom nivou poverenja su 6,39 i 2,306

Tabela 21. t- i F-vrednosti dobijene primenom dve različite metode za određivanje diklofenaka u kontrolnom serumu

Metoda kalibracione prave (μg cm^{-3})		**Referentna metoda (HPLC) (μg cm^{-3})**	**t-test***	**F-test***
dodato	**nađeno** $\overline{x} \pm \overline{SD}$			
2,00	1,96 ± 0,07	1,89 ± 0,06	1,703	1,36
3,18	3,20 ± 0,10	3,14 ± 0,08	1,043	1,56

*Tablične F- ($\nu_1 = 4$, $\nu_2 = 4$) i t-vrednosti ($\nu = 8$) pri 95%-tnom nivou poverenja su 6,39 i 2,306





Slika 26. HPLC hromatogrami: (a) D tablete (25,45 μg cm^{-3}), (b) spajkovan serum (2,0 μg cm^{-3} D). Kolona: C_{18} (Zorbax, 5μm, 250 x 4,6 mm). Mobilna faza: metanol-fosfatni pufer pH 2,5±0,2 (0,01 M H_3PO_4 + 0,01 M NaH_2PO_4), 700:300 (V/V). Detekcija: UV 254 nm.

4.2. Kinetičko određivanje mikrokoličina acetilsalicilne kiseline

4.2.1. Određivanje optimalnih koncentracija

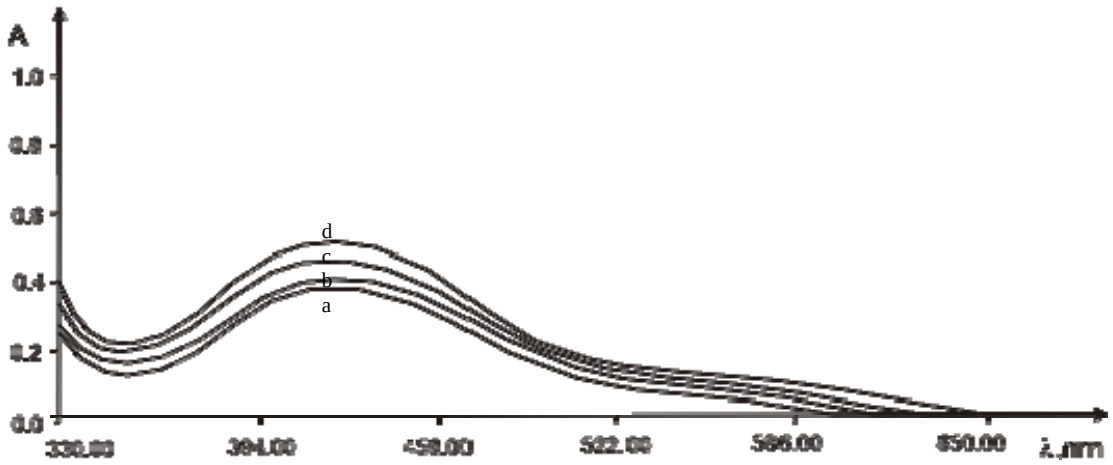
Prilikom razrade metode za određivanje acetilsalicilne kiseline korišćena je reakcija izmene metalnog jona između dva liganda. Reakcija se zasniva na istiskivanju 1-nitrozo-2-naftola iz kompleksa sa kobaltom nakon dodatka acetilsalicilne kiseline. Acetilsalicilna kiselina nije određena direktno, već je prvo u baznoj sredini došlo do njene kvantitativne hidrolize ($C_9H_8O_4 + 2OH^- \rightarrow C_7H_5O_3^- + CH_3COO^- + H_2O$), pri čemi je nastala salicilna kiselina nagradila kompleks sa kobaltom.

Prema Callahan-u i ostalima[136] dvovalentan kobalt gradi kompleks sa 1-nitrozo-2-naftolom, oslobađajući dva vodonična jona na jedan jon kobalta:

$$Co^{2+} + 2R(NO)OH \rightarrow Co\left[RO(NO)O\right]_2 + 2H^+$$

Spektroskopskom analizom bis(1-nitrozo-2-naftolato)Co(II) kompleksa utvrđena je njegova oktaedarska struktura i određena empirijska formula $Co[RO(NO)O]_2 \cdot 2H_2O$.

S druge strane, salicilna kiselina (SA) takođe gradi kompleks sa Co(II). Empirijska formula kompleksa je $[Co(SA)(H_2O)_2]Cl_2$. IR analiza kompleksa pokazala koordinaciju metalnog jona preko kiseonika karboksilne (-COOH) i fenolne (-OH) grupe liganda, tj. salicilne kiseline, pri čemu je došlo do zamene vodonikovih jona iz obe grupe jonima kobalta.[148] Kompleks kobalta sa salicilnom kiselinom je stabilniji od kompleksa sa 1-nitrozo-2-naftolom, što je iskorišćeno za kinetičko određivanje acetilsalicilne kiseline.

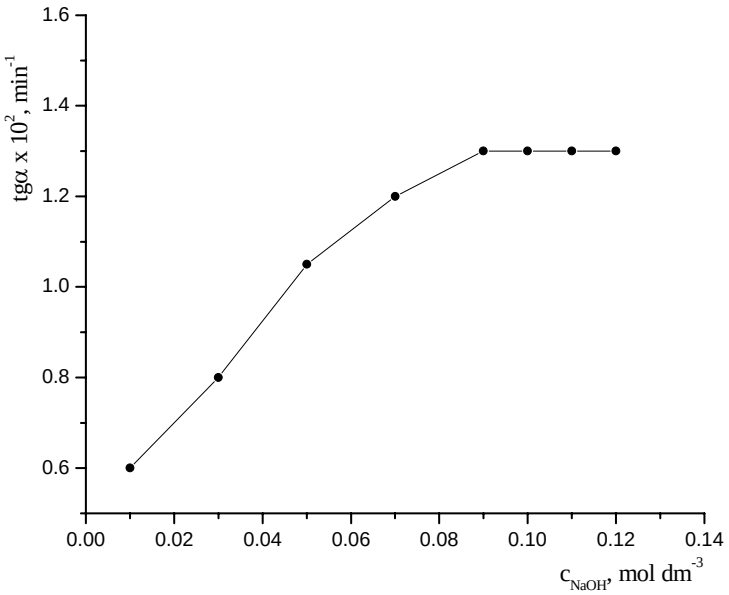


Slika 27. Nestajanje bis(1-nitrozo-2-naftolato)Co(II) kompleksa u etanolno baznoj sredini u prisustvu ASA 5,1·10^{-5} mol dm^{-3}; a) 1; b) 3; c) 5; d) 7 min. Koncentracije u rastvoru: $c_{R(NO)OH}$ = 1,0·10^{-5} mol dm^{-3}, c_{NaOH} = 1,0·10^{-2} mol dm^{-3}, $c_{Co^{2+}}$ = 1,7·10^{-5} mol dm^{-3}, c_{NaCl} = 0,1 mol dm^{-3}, t = 22,0 ± 0,1 °C

Ravnoteža reakcije $Co[R(NO)O]_2 \cdot 2H_2O + SA \rightarrow [Co(SA)(H_2O)_2]Cl_2 + 2R(NO)OH$ pomera se u desnu stranu, i acetilsalicilna kiselina je određena na osnovu merenja brzine nestajanja bis(1-nitrozo-2-naftolato)Co(II) kompleksa na 410 nm (slika 27).

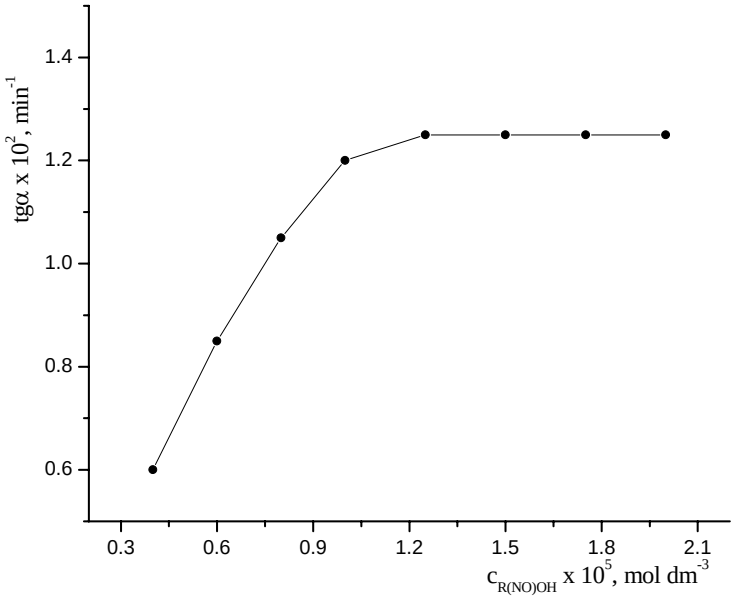
U cilju razrade što osetljivije metode za određivanje acetilsalicilne kiseline, trebalo je najpre odrediti optimalne uslove odigravanja reakcije. U tu svrhu praćena je zavisnost brzine reakcije (tgα) od koncentracije svakog reaktanta pojedinačno (R(NO)OH, NaOH, Co^{2+}, ASA).

Uticaj koncentracije natrijum-hidroksida na brzinu reakcije (slika 28) praćen je u intervalu 0,01-0,12 mol dm^{-3}. Kao što se sa slike može videti, brzina reakcije raste sa povećanjem koncentracije natrijum-hidroksida i pri koncentracijama većim od 0,09 mol dm^{-3} ostaje konstantna. Dalja merenja su vršena pri koncentraciji natrijum-hidroksida od 0,10 mol dm^{-3}.

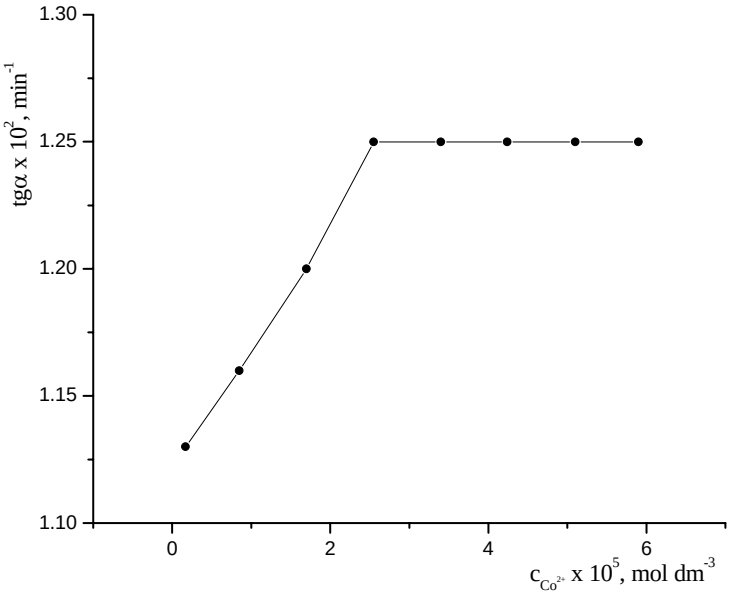


Slika 28. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije natrijum-hidroksida. Koncentracije u rastvoru: $c_{R(NO)OH}$ *= 1,0·10⁻⁵ mol dm⁻³,* $c_{Co^{2+}}$ *= 1,7·10⁻⁵ mol dm⁻³,* c_{ASA} *= 1,0·10⁻⁵ mol dm⁻³,* c_{NaCl} *= 0,1 mol dm⁻³, t = 22,0 ± 0,1 ℃*

Zavisnost brzine reakcije od koncentracije 1-nitrozo-2-naftola prikazana je na slici 29. Brzina reakcije raste sa povećanjem koncentracije u intervalu od (0,40-1,25)·10^{-5} mol dm^{-3}. Pri koncentracijama većim od 1,25·10^{-5} mol dm^{-3}, brzina reakcije se ne menja. Koncentracija 1-nitrozo-2-naftola od 1,50·10^{-5} mol dm^{-3} uzeta je kao optimalna koncentracija za dalja merenja.



Slika 29. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije 1-nitrozo-2-naftola. Koncentracije u rastvoru: c_{NaOH} *= 0,1 mol dm*$^{-3}$, $c_{Co^{2+}}$ *= 1,7·10*$^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, c_{ASA} *= 1,0·10*$^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, c_{NaCl} *= 0,1 mol dm*$^{-3}$, *t = 22,0 ± 0,1 ℃*

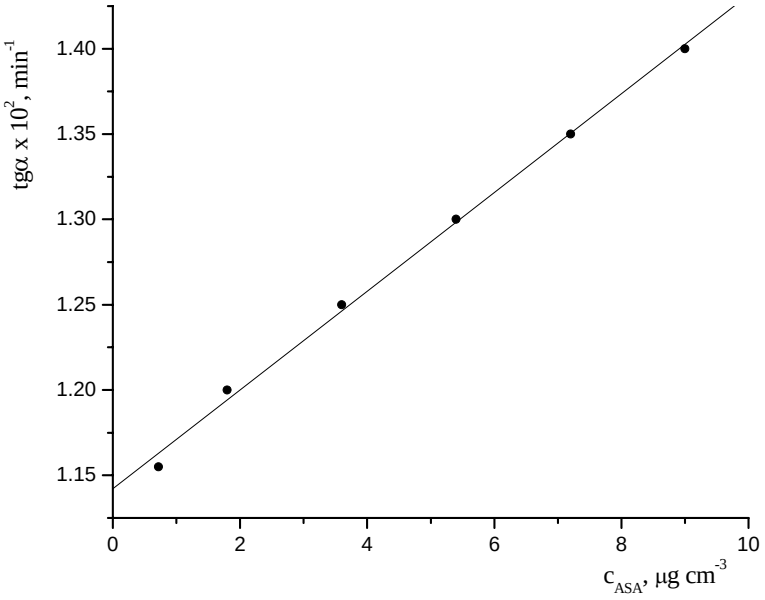


Slika 30. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije Co(II). Koncentracije u rastvoru: c_{NaOH} *= 0,1 mol dm*$^{-3}$, $c_{R(NO)OH}$ *= 1,5·10*$^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, c_{ASA} *= 1,0·10*$^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, c_{NaCl} *= 0,1 mol dm*$^{-3}$, *t = 22,0 ± 0,1 ℃*

Uticaj koncentracije kobalt(II) na brzinu reakcije dat je na slici 30. Sa slike se može videti da brzina reakcije raste sa povećanjem koncentracije i postaje konstantna pri koncentraciji Co(II) od $2{,}6\cdot10^{-5}$ mol dm^{-3}. U dalje radu koncentracija Co(II) od $3{,}4\cdot10^{-5}$ mol dm^{-3} uzeta je kao optimalna koncentracija.

Pri optimalnim uslovima odigravanja reakcije: c_{NaOH} = *0,1 mol* dm^{-3}, $c_{R(NO)OH}$ = $1{,}5\cdot10^{-5}$ *mol* dm^{-3}, $c_{Co^{2+}}$ = $3{,}4\cdot10^{-5}$ *mol* dm^{-3}, c_{NaCl} = *0,1 mol* dm^{-3}, *t = 22,0 ± 0,1 °C,* praćen je uticaj acetilsalicilne kiseline na brzinu reakcije.

Dobijena kalibraciona prava je linearna u intervalu koncentracije acetilsalicilne kiseline 0,72-9,00 μg cm^{-3} i može poslužiti za određivanje ASA u rastvoru (slika 31).



Slika 31. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije acetilsalicilne kiseline. Koncentracije u rastvoru: c_{NaOH} = *0,1 mol* dm^{-3}, $c_{R(NO)OH}$ = $1{,}5\cdot10^{-5}$ *mol* dm^{-3}, $c_{Co^{2+}}$ = $3{,}4\cdot10^{-5}$ *mol* dm^{-3}, c_{NaCl} = *0,1 mol* dm^{-3}, *t = 22,0 ± 0,1°C*

Kalibraciona prava za određivanje acetilsalicilne kiseline na 22°C može se prikazati sledećom jednačinom:

$$tg\alpha \cdot 10^2 = 0{,}05208 \cdot c_{ASA} + 1{,}14216 \qquad r = 0{,}9986$$

gde je:

c_{ASA} – koncentracija acetilsalicilne kiseline izražena u μg cm^{-3}

$tg\alpha$ - nagib linearnog dela kinetičke krive u koordinatnom sistemu A = f(t)

Na osnovu prikazanih zavisnosti između brzine reakcije i koncentracije svakog reaktanta pojedinačno, kao i određenog reda reakcije u odnosu na svaki reaktant pojedinačno (tabela 22), može se postaviti kinetička jednačina za ispitivani proces:

$$brzina = k \cdot c_{ASA}$$

gde je k - konstanta brzine reakcije

Kinetička jednačina važi za sledeći opseg koncentracija: R(NO)OH (1,25-2,00)·10^{-5} mol dm^{-3},NaOH 0,09-0,12 mol dm^{-3},Co(II) (2,6-5,9)·10^{-5} mol dm^{-3},ASA 0,72-9,00 μg cm^{-3}, (0,4-5,0)·10^{-5} mol dm^{-3}.

Tabela 22. Pregled reda reakcije u odnosu na svaki reaktant pojedinačno

Reaktant i opseg koncentracije, mol dm^{-3}	Red reakcije
$0{,}01 < c_{NaOH} \leq 0{,}09$ $0{,}09 \leq c_{NaOH} < 0{,}12$	1 0
$0{,}40\cdot10^{-5} < c_{R(NO)OH} \leq 1{,}25\cdot10^{-5}$ $1{,}25\cdot10^{-5} \leq c_{R(NO)OH} < 2{,}00\cdot10^{-5}$	1 0
$0{,}2\cdot10^{-5} < c_{Co^{2+}} \leq 2{,}6\cdot10^{-5}$ $2{,}6\cdot10^{-5} \leq c_{Co^{2+}} < 5{,}9\cdot10^{-5}$	1 0

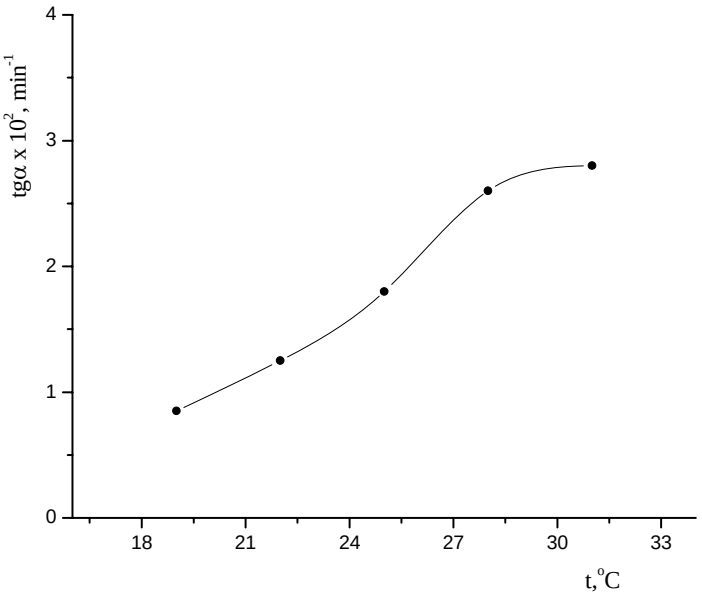
Analitički i statistički podaci za kalibracionu pravu (tabela 23) dobijeni su metodom linearne regresije u kompjuterskom programu Origin 6.1.

Tabela 23. Analitičke i statističke karakteristike kalibracione prave za određivanje acetilsalicilne kiseline

Parametri	
opseg linearnosti, μg cm^{-3}	0,72 - 9,00, n = 6
jednačina kalibracione parave	$tg\alpha \cdot 10^2 = 0{,}05208 \cdot c_{ASA} + 1{,}14216$
(nagib ± SD)·10^2	0,02893 ± 0,0014
(odsečak ± SD)·10^2	1,14216 ± 0,0042
koeficijenat korelacije, r	$r = 0{,}9986$
standardna devijacija fitovanja, SD·10^2	0,00548
varijansa, $(SD \cdot 10^2)^2$, $(\mu g\ cm^{-3})^2$	$3{,}0 \cdot 10^{-5}$
granica detekcije, μg cm^{-3}	0,35

4.2.2. Termodinamičke karakteristike sistema

Brzina ispitivane reakcije praćenja je na 19, 22, 25, 28 i 31°C. Na osnovu dobijenih rezultata merenja dobijen je grafik zavisnosti tgα od temperature (slika 32). S obzirom na to da pri temperaturama višim od 25°C dolazi do odstupanja od linearnosti, dalja ispitivanja su vršena na 22°C.



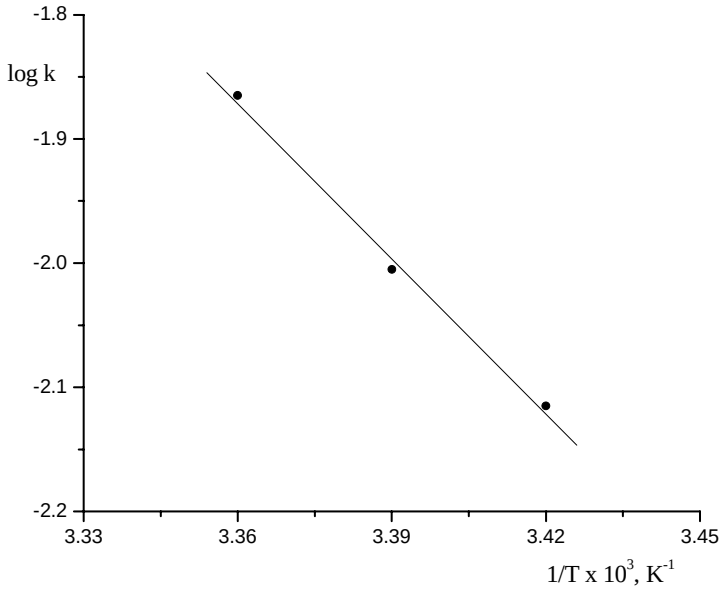
Slika 32. Zavisnost brzine reakcije od temperature. Koncentracije u rastvoru: c_{NaOH} *= 0,1 mol dm*$^{-3}$, $c_{R(NO)OH}$ *= 1,5·10*$^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{Co^{2+}}$ *=3,4·10*$^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, c_{ASA} *= 3,0·10*$^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, c_{NaCl} *= 0,1 mol dm*$^{-3}$

Na osnovu kinetičke jednačine $brzina = k \cdot c_{ASA}$, izračunate su konstante brzine reakcije na tri različite temperature (tabela 24).

Tabela 24. Konstante brzine reakcije na različitim temperaturama

$k \cdot 10^2$ (mol dm^{-3})$^{1-n}$s^{-1}	T (K)
0,73	292
1,00	295
1,37	298

n – red reakcije



Slika 33. Zavisnost logk od 1/T

Termodinamički parametri reakcije građenja aktiviranog kompleksa određeni su pomoću prave prikazane na slici 33. Iz nagiba ove prave izračunata je energija aktivacije primenom jednačine (28).

Ostali termodinamički parametri, promena entalpije (ΔH^*), promena entropije (ΔS^*), promena slobodne energije (ΔG^*) i pK* vrednost građenja aktiviranog kompleksa, izračunati su primenom jednačina (29)-(32).

Vrednosti izračunatih termodinamičkih parametara reakcije građenja aktiviranog kompleksa, primenom gore navedenih jednačina, date su u tabeli 25.

Tabela 25. Termodinamičke karakteristike građenja aktiviranog kompleksa na 295K

Sistem	**Ea* ($kJmol^{-1}$)**	**ΔH^* ($kJmol^{-1}$)**	**ΔS^* ($JK^{-1}mol^{-1}$)**	**ΔG^* ($kJmol^{-1}$)**	**pK***
R(NO)OH+NaOH+Co(II)+ASA	79,81	77,36	-20,84	83,51	14,79

Prema Hammond-u[139] i Smith-u[140], većina reakcija koje se odvijaju na sobnoj temperaturi imaju energiju aktivacije između 15-30 kcal mol^{-1} (62,76-125,52 kJ mol^{-1}). Vrednost izračunate energije aktivacije za ispitivani sistem je u skladu sa navedenim postulatom.

Takođe, pri relativno niskim temperaturama (sobna i niže temperature) proizvod temperature i entropije je manji od entalpije, $|T\Delta S| << |\Delta H|$.[141,142]

S obzirom da Gibsova slobodna energija zavisi od temperature to će i konstanta ravnoteže i položaj ravnoteže zavisiti od temperature. Polazeći od Van't Hofove reakcione izobare za reakcije u rastvoru ($d \ln K_c / dT = \Delta H / RT^2$) može se prodiskutovati uticaj temperature na položaj ravnoteže. Za endotermnu reakciju gde je $\Delta H > 0$ i $dK/dT > 0$, porast temperature povećava konstantu ravnoteže, odnosno pomera je u smeru građenja produkata.

Teorijski najmanja koncentracija koja se može odrediti ovom metodom može se izračunati prema *3,3S* kriterijumu, primenom jednačine (8),[143,144] i iznosi 0,35 μg cm^{-3}.

4.2.3. Tačnost i reproduktivnost određivanja acetilsalicilne kiseline

Tačnost i reproduktivnost metode određeni su za tri koncentracije sa kalibracione prave, pri čemu je izvedeno pet merenja za svaku koncentraciju. Statističkom obradom podataka dobijeni su rezultati koji su sumirani u tabeli 26. Kao što se može videti, relativna greška se kreće od 3,63 do 1,14% za interval koncentracije acetilsalicilne kiseline od 0,72 do 9,00 μg cm^{-3}.

*Tabela 26. Tačnost i reproduktivnost određivanja acetilsalicilne kiseline**

Koncentracija acetilsalicilne kiseline (μg cm^{-3})		**RSD (%)**	$\frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \cdot 100$ **(%)**	**Recovery (%)**
odmereno	**nađeno** $\bar{x} \pm \overline{SD}$			
0,72	0,74 ± 0,03	3,63	2,78	102,78
5,40	5,27 ± 0,11	2,08	-2,41	97,59
9,00	9,11 ± 0,10	1,14	1,22	101,22

*Objašnjenje veličina i odgovarajući izrazi dati su u poglavlju 4.1.3.

4.2.4. Selektivnost određivanja acetilsalicilne kiseline

Za ocenu selektivnosti određivanja acetilsalicilne kiseline predloženom metodom ispitivan je uticaj većeg broja stranih jona, aminokiselina i punioca farmaceutskih preparata na brzinu reakcije. Reakcionoj smeši pojedinačno su dodavani rastvori ispitivanih supstanci. Pri tome je menjana njihova koncentracija u odnosu na koncentraciju acetilsalicilne kiseline, sve dok nije nađena ona koncentracija koja ometa njeno određivanje u rastvoru (tabela 27).

Tabela 27. Selektivnost određivanja acetilsalicilne kiseline pri koncentraciji 5,4 µg cm^{-3}

Jonska, molekulska vrsta	I, %	q
fruktoza, glukoza, laktoza	5-10	10^3
Li^+, K^+, manitol, sorbitol, F^-, $C_2O_4^{2-}$	< 5	
Si^{4+}, B_1, B_6, B_{12}	5-10	10^2
Ala, Phe, Asp, Met, Tyr, Trp, stearinska kiselina, nikotinska kiselina, limunska kiselina, Cd^{2+}	< 5	
His, Arg, Lys, Ser, Gly, Ca^{2+}, Zn^{2+}, Mg^{2+}	5-10	10
Fe^{3+}, Cu^{2+}	ubrzavaju	1

q – odnos koncentracije jona/aminokiseline/punioca i ASA
I - interferencioni koeficijent, $I = (c^{\circ}_{ASA} - c_{ASA}) / c^{\circ}_{ASA}$
c°_{ASA} i c_{ASA} – koncentracija acetilsalicilne kiseline bez i u prisustvu interferirajuće supstance (dobijena iz jednačine kalibracione prave)

Aminokiseline His, Arg, Lys, Ser, Gly ometaju određivanje acetilsalicilne kiseline pri odnosu 1:10 jer se kompleksiraju kobaltom, kao i Fe^{3+} i Cu^{2+} joni, koji grade komplekse sa 1-nitrozo-2-naftolom.

4.2.5. Primena kinetičke metode za određivanje acetilsalicilne kiseline u farmaceutskim preparatima i humanom kontrolnom serumu

Razrađena kinetička metoda za određivanje acetilsalicilne kiseline primenjena je za njeno određivanje u farmaceutskim preparatima i humanom kontrolnom serumu. Kod određivanja acetilsalicilne kiseline u humanom kontrolnom serumu dodata je ona količina acetilsalicilne kiseline koja odgovara njenom sadržaju u humanom serumu, kada se ona koristi u terapeutske svrhe.[145] Uzorci su pripremani prema postupku koji je opisan u "Eksperimentalnom delu". Kao referentna metoda korišćena je HPLC.[5,6] Rezultati su sumirani u tabelama 28 i 29. HPLC hromatogrami određivanja acetilsalicilne kiseline u tabletama i humanom kontrolnom serumu dati su na slici 34. Dobijeni hromatogrami standarda i uzorka pokazuju poklapanje retencionog vremena za analiziranu aktivnu komponentu – acetilsalicilnu kiselinu. U cilju kvantitativne analize, određena je integrisana površina za dati pik i sa kalibracionog dijagrama za date vrednosti apsorbancije izračunate su koncentracije acetilsalicilne kiseline u ispitivanim uzorcima.

Tabela 28. Tačnost i reproduktivnost određivanja acetilsalicilne kiseline u farmaceutskim preparatima

Metoda kalibracione prave (μg cm^{-3})		**Referentna metoda (HPLC) (μg cm^{-3})**	**n**	**RSD (%)**	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ **(%)**	**Recovery (%)**
odmereno	**nađeno** $\bar{x} \pm \overline{SD}$					
1,80[*]	1,76 ± 0,09	1,72 ± 0,07	5	4,87	-2,22	97,78
4,50[**]	4,58 ± 0,11	4,54 ± 0,09	5	2,41	1,77	101,77
6,31[***]	6,27 ± 0,16	6,23 ± 0,14	5	2,62	-0,63	99,37

[*] *Aspirin*®, tablete, 100 mg, Bayer d.o.o., Beograd
[**] *Cardiopirin*®, tablete, 100 mg, Pharmaswiss d.o.o., Beograd
[***] *Andol*®, tablete, 100 mg, Pliva Hrvatska d.o.o., Zagreb, Hrvatska

Tabela 29. Tačnost i reproduktivnost određivanja acetilsalicilne kiseline u humanom kontrolnom serumu[*]

Metoda kalibracione prave ($\mu g\ cm^{-3}$)		**Referentna metoda (HPLC) ($\mu g\ cm^{-3}$)**	**n**	**RSD (%)**	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ **(%)**	**Recovery (%)**
dodato	**nađeno** $\bar{x} \pm \overline{SD}$					
7,20	7,08 ± 0,24	7,11 ± 0,35	5	3,38	-1,67	98,33
9,00	8,93 ± 0,29	8,90 ± 0,40	5	3,23	0,78	99,22

[*]Humani kontrolni serum, *"Lytorol N"*, bioMérieux® sa, Francuska

Količina acetilsalicilne kiseline koja je određena kinetičkom metodom u skladu je sa referentnom metodom i deklarisanim vrednostima u farmaceutskim preparatima.

Poređenje standardnih devijacija - F-test, i srednjih vrednosti - t-test[146,147], pri 95%-tnom nivou poverenja i za dati broj stepena slobode, pokazalo je da između dve metode (kinetičke i referentne HPLC) ne postoji značajna razlika u preciznosti, $t_{eksp.} < t_{tab.}$ i $F_{eksp.} < F_{tab.}$ (tabele 30 i 31).

Tabela 30. t- i F-vrednosti dobijene primenom dve različite metode za određivanje acetilsalicilne kiseline u farmaceutskim preparatima

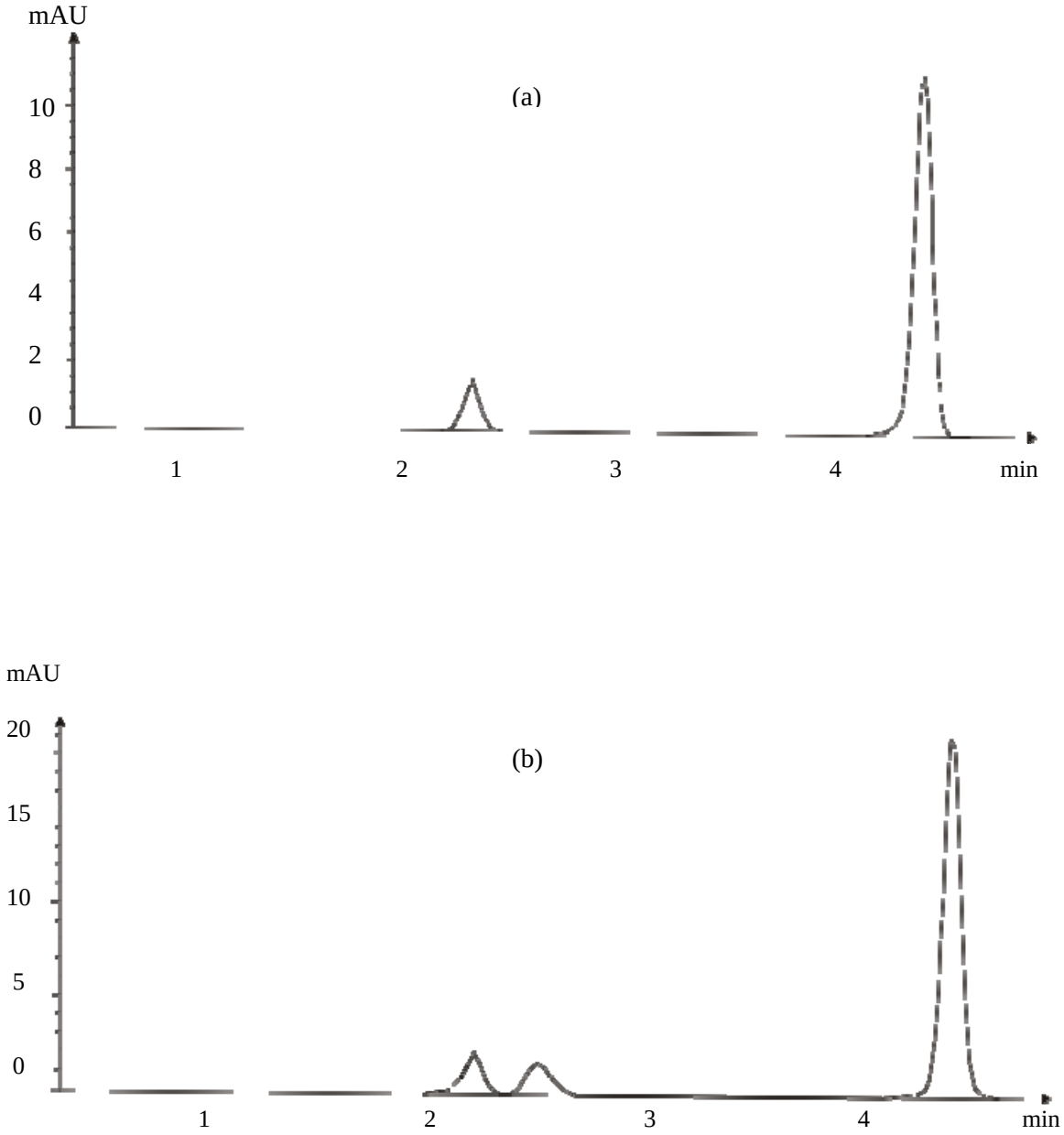
Metoda kalibracione prave ($\mu g\ cm^{-3}$)		**Referentna metoda (HPLC) ($\mu g\ cm^{-3}$)**	**t-test**[*]	**F-test**[*]
odmereno	**nađeno** $\bar{x} \pm \overline{SD}$			
1,80	1,76 ± 0,09	1,72 ± 0,07	0,781	1,65
4,50	4,58 ± 0,11	4,54 ± 0,09	0,632	1,49
6,31	6,27 ± 0,16	6,23 ± 0,14	0,422	1,31

[*]Tablične F- ($\nu_1 = 4$, $\nu_2 = 4$) i t-vrednosti ($\nu = 8$) pri 95%-tnom nivou poverenja su 6,39 i 2,306

Tabela 31. t- i F-vrednosti dobijene primenom dve različite metode za određivanje acetilsalicilne kiseline u kontrolnom serumu

Metoda kalibracione prave ($\mu g\ cm^{-3}$)		**Referentna metoda (HPLC) ($\mu g\ cm^{-3}$)**	**t-test***	**F-test***
dodato	**nađeno** $\bar{x} \pm \overline{SD}$			
7,20	7,08 ± 0,24	7,11 ± 0,35	0,158	2,13
9,00	8,93 ± 0,29	8,90 ± 0,40	0,136	1,90

*Tablične F- ($\nu_1 = 4$, $\nu_2 = 4$) i t-vrednosti ($\nu = 8$) pri 95%-tnom nivou poverenja su 6,39 i 2,306



Slika 34. HPLC hromatogrami: (a) ASA tablete (4,50 μg cm^{-3}), (b) spajkovan serum (7,2 μg cm^{-3} ASA). Kolona: C_{18} (Zorbax, 5μm, 250 x 4,6 mm). Mobilna faza: fosforna kiselina-acetonitril-voda, 2:400:600 (V/V/V). Detekcija: UV 237 nm.

4.3. Kinetičko određivanje mikrokoličina ibuprofena

4.3.1. Određivanje optimalnih koncentracija

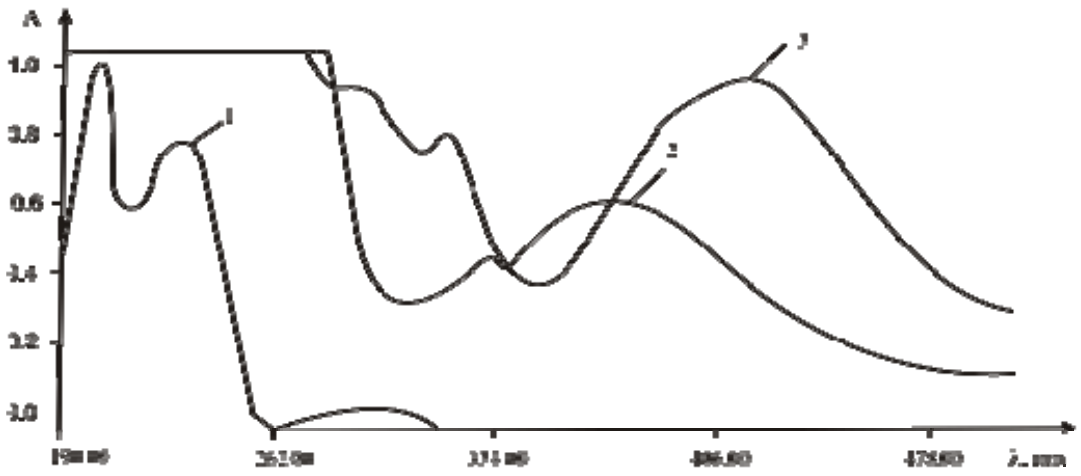
Kao indikatorska reakcija za određivanje mikrokoličina ibuprofena u rastvoru poslužila je reakcija građenja kompleksa Co^{3+} sa ibuprofenom u sirćetno-kiseloj sredini. Co^{2+} je oksidovan do Co^{3+} kalijum-bromatom koji je inače jak oksidans u kiseloj sredini:

$$BrO_3^- + 6H^+ + 5e^- \leftrightarrow \tfrac{1}{2}Br_2 + 3H_2O \qquad E^o = 1{,}52\ V$$

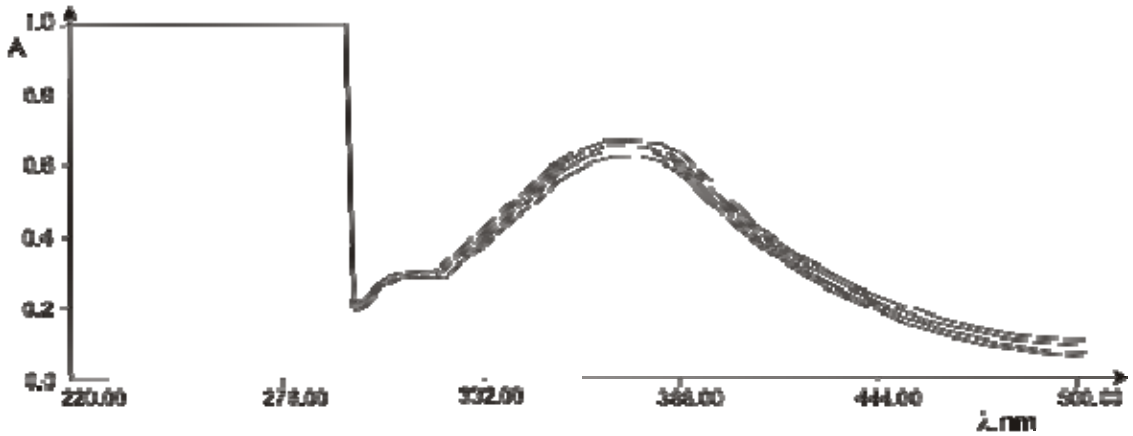
Uvođenjem ibuprofena u rastvor nestaje traka na 410 nm koja potiče od apsorpcije kompleksa $Co(C_{10}H_6NO_2)_3$ i pojavljuje se traka na 375 nm koja odgovara apsorpcionom spektru 1-nitrozo-2-naftola u kiseloj sredini (slika 35). Ibuprofen je kao ligand zamenio 1-nitrozo-2-naftol i nagradio kompleks sa kobaltom(III).

Ravnoteža reakcije $2Co\left[RO(NO)O\right]_3 + 4IB \rightarrow Co_2IB_4 + 6R(NO)OH$ se pomera u desnu stranu i ibuprofen je određen na osnovu merenje brzine nastajanja 1-nitrozo-2-naftola u kiseloj sredini na 375 nm (slika 36).

Za obradu kinetičkih podataka primenjena je tangensna metoda, s obzirom na to da postoji linearna zavisnost između promene apsorbancije rastvora i vremena odigravanja reakcije u toku prvih 5-6 minuta.



Slika 35. Apsorpcioni spektar ibuprofena (1), 1-nitrozo-2-naftola (2) i njegovog kompleksa sa kobaltom (3) u sirćetno kiseloj sredini. $c_{IB} = 1{,}0\cdot10^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{R(NO)OH} = 1{,}0\cdot10^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{Co^{2+}} = 1{,}7\cdot10^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{CH_3COOH} = 0{,}1$ *mol dm*$^{-3}$

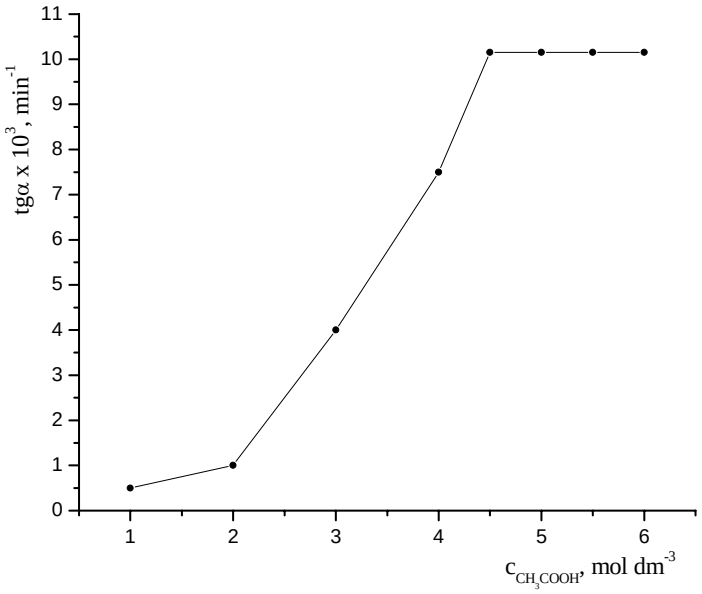


Slika 36. Promena apsorpcionog spektra 1-nitrozo-2-naftola u sirćetno kiseloj sredini sa vremenom nakon dodatka ibuprofena; a) 1; b) 3; c) 5; d) 7 min. Koncentracije u rastvoru: $c_{R(NO)OH} = 1{,}0 \cdot 10^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{CH_3COOH} = 0{,}1$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{KBrO_3} = 1{,}0 \cdot 10^{3}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{Co^{2+}} = 5{,}1 \cdot 10^{-6}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{IB} = 1{,}0 \cdot 10^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$

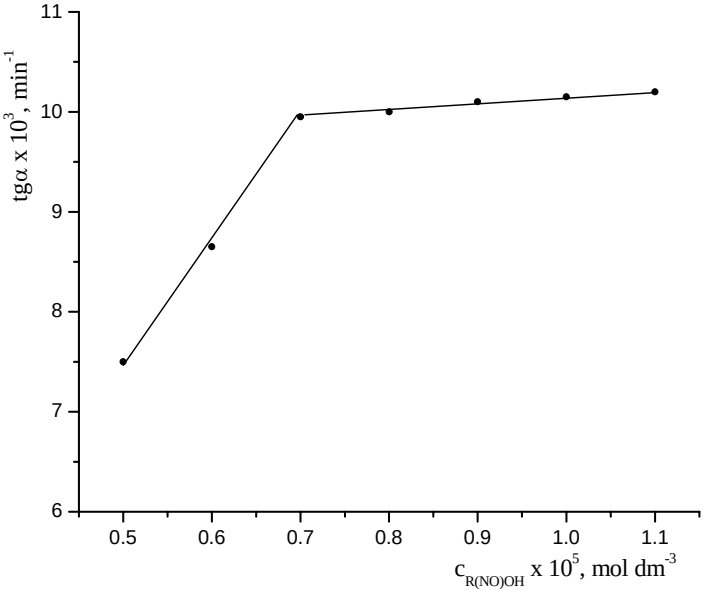
U cilju razrade što osetljivije metode za određivanje ibuprofena, trebalo je najpre odrediti optimalne uslove odigravanja reakcije. U tu svrhu praćena je zavisnost brzine reakcije (tgα) od koncentracije svakog reaktanta pojedinačno (R(NO)OH, CH_3COOH, $KBrO_3$, Co^{2+}, IB).

Ispitivanjem zavisnosti brzine reakcije od koncentracije sirćetne kiseline dobijena je kriva prikazana na slici 37. Sa slike se može videti da povećanjem koncentracije sirćetne kiseline do 4,5 mol dm^{-3}, brzina reakcije raste, dok pri većim koncentracijama od ove vrednosti brzina reakcije ostaje konstantna. Za optimalnu koncentraciju sirćetne kiseline izabrana je koncentracija od 5,0 mol dm^{-3}.

Zavisnost brzine reakcije od koncentracije 1-nitrozo-2-naftola ispitivana je u intervalu koncentracije od $(0{,}5\text{-}1{,}1) \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3}. Nađeno je da veće koncentracije 1-nitrozo-2-naftola od $0{,}7 \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3} uzrokuju manje promene brzine reakcije (slika 38). Za optimalnu koncentraciju 1-nitrozo-2-naftola, koja je u daljem ispitivanju održavana konstantnom, izabrana je koncentracija od $1{,}0 \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3}, jer se nalazi na delu krive koji pokazuje zasićenje, što omogućava merenje sa manjom greškom.

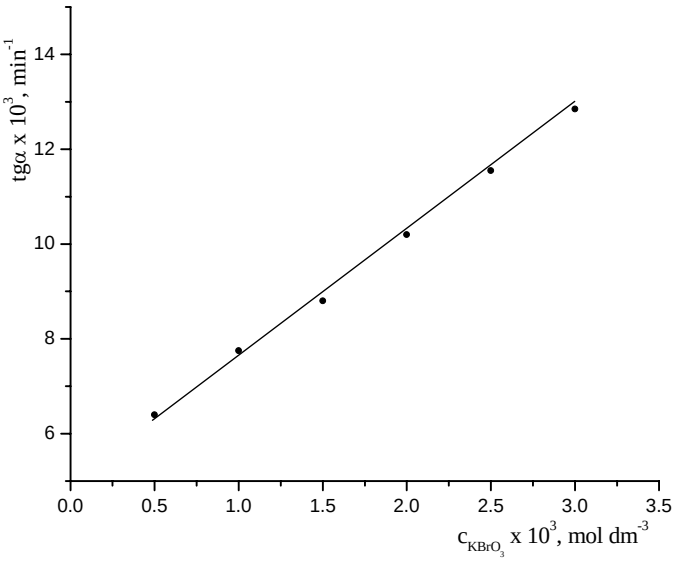


Slika 37. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije sirćetne kiseline. Koncentracije u rastvoru: $c_{R(NO)OH} = 1{,}0 \cdot 10^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{IB} = 1{,}0 \cdot 10^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{KBrO_3} = 2{,}0 \cdot 10^{-3}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{Co^{2+}} = 1{,}7 \cdot 10^{-6}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{NaCl} = 0{,}1$ *mol dm*$^{-3}$, $t = 22{,}0 \pm 0{,}1°C$

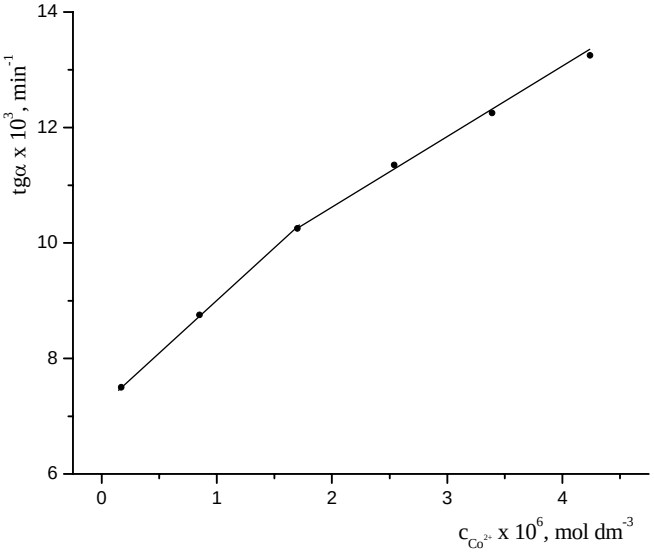


Slika 38. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije 1-nitrozo-2-naftola. Koncentracije u rastvoru: $c_{CH_3COOH} = 5{,}0$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{KBrO_3} = 2{,}0 \cdot 10^{-3}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{Co^{2+}} = 1{,}7 \cdot 10^{-6}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{IB} = 1{,}0 \cdot 10^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{NaCl} = 0{,}1$ *mol dm*$^{-3}$, $t = 22{,}0 \pm 0{,}1°C$

Zavisnost brzine indikatorske reakcije od koncentracije oksidansa $KBrO_3$ prikazana je na slici 39. Sa grafika se vidi da se brzina reakcije povećava linearno sa povećanjem koncentracije kalijum-bromata. Koncentracija kalijum-bromata od $2{,}5\cdot10^{-3}$ mol dm^{-3} u daljem radu održavana je konstantnom, jer pri većim koncentracijama dolazi do zakrivljenja samih kinetičkih krivih.



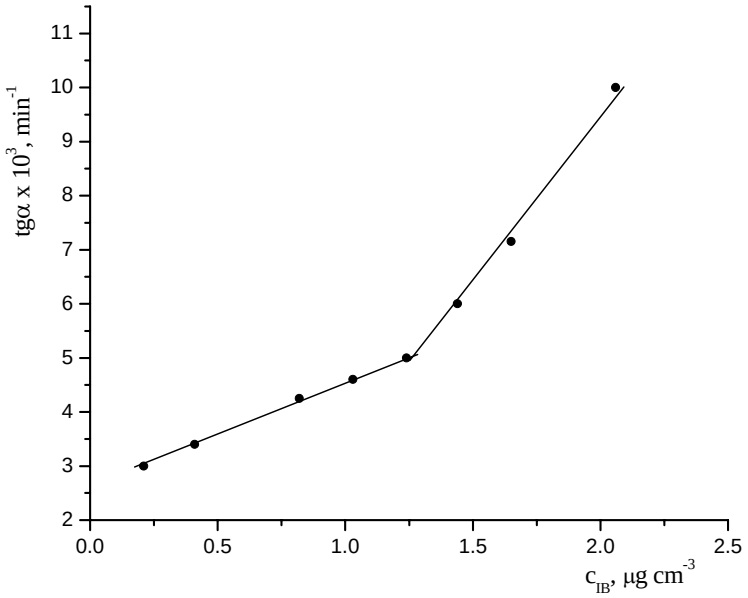
Slika 39. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije kalijum-bromata. Koncentracije u rastvoru: $c_{R(NO)OH}$ = $1{,}0\cdot10^{-5}$ mol dm^{-3}, c_{CH_3COOH} = 5,0 mol dm^{-3}, $c_{Co^{2+}}$ = $1{,}7\cdot10^{-6}$ mol dm^{-3}, c_{IB} = $1{,}0\cdot10^{-5}$ mol dm^{-3}, c_{NaCl} = 0,1 mol dm^{-3}, t = 22,0 ± 0,1°C



Slika 40. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije kobalta(II). Koncentracije u rastvoru: $c_{R(NO)OH}$ = $1{,}0\cdot10^{-5}$ *mol* dm^{-3}, c_{CH_3COOH} = 5,0 *mol* dm^{-3}, c_{KBrO_3} = $2{,}5\cdot10^{-3}$ *mol* dm^{-3}, c_{IB} = $1{,}0\cdot10^{-5}$ *mol* dm^{-3}, c_{NaCl} = 0,1 *mol* dm^{-3}, *t = 22,0 ± 0,1°C*

Zavisnost brzine reakcije od koncentracije Co(II) (slika 40) ispitivana je u intervalu koncentracije od (0,2-4,2)·10^{-6} mol dm^{-3}. Brzina reakcije raste sa povećanjem koncentracije Co(II) u ispitivanom intervalu. Kao najoptimalnija izabrana koncentracija jona Co(II) od 3,4·10^{-6} mol dm^{-3}, jer pri većim koncentracija dolazi do zakrivljenja samih kinetičkih krivih.

Pri optimalnim uslovima odigravanja reakcije: $c_{R(NO)OH}$ = *1,0·10^{-5} mol dm^{-3}*, c_{CH_3COOH} = *5,0 mol dm^{-3}*, c_{KBrO_3} = *2,5·10^{-3} mol dm^{-3}*, $c_{Co^{2+}}$ = *3,4·10^{-6} mol dm^{-3}*, c_{NaCl} = *0,1 mol dm^{-3}*, praćen je uticaj ibuprofena na brzinu reakcije. Dobijena kalibraciona prava je linearna u intervalu koncentracije ibuprofena od 0,21 do 2,06 μg cm^{-3} (slika 41).



Slika 41. Kalibraciona prava za određivanje ibuprofena. Koncentracije u rastvoru: $c_{R(NO)OH}$ = *1,0·10^{-5} mol dm^{-3}*, c_{CH_3COOH} = *5,0 mol dm^{-3}*, c_{KBrO_3} = *2,5·10^{-3} mol dm^{-3}*, $c_{Co^{2+}}$ = *3,4·10^{-6} mol dm^{-3}*, c_{NaCl} = *0,1 mol dm^{-3}*, *t = 22,0 ± 0,1°C*

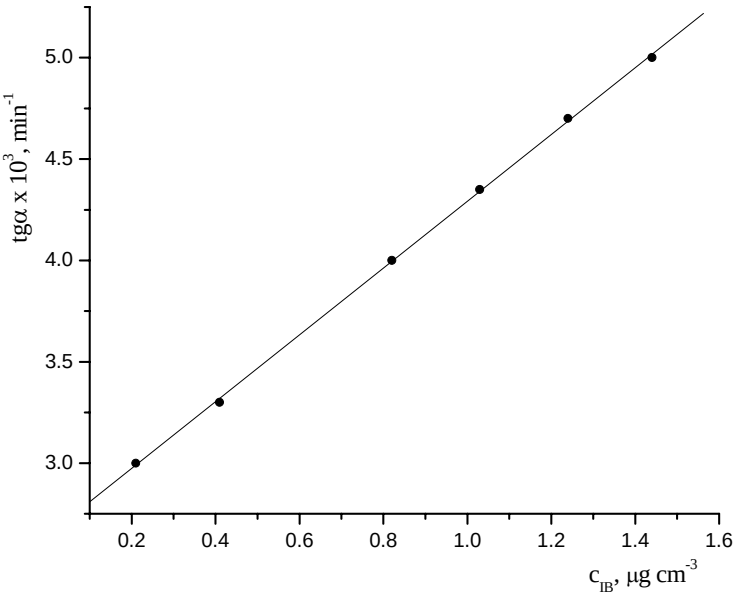
Sa slike 41 se vidi da kalibraciona prava ima tačku preloma pri koncentraciji ibuprofena 1,44 μg cm^{-3} i da se sastoji iz dva linearna dela. Kalibraciona prava na temperaturi od 22°C za koncentraciju ibuprofena u intervalu od 0,21 do 1,44 μg cm^{-3} (slika 42) može se prikazati jednačinom:

$$tg\alpha \cdot 10^3 = 1{,}64667 \cdot c_{IB} + 2{,}64494 \qquad r = 0{,}9994$$

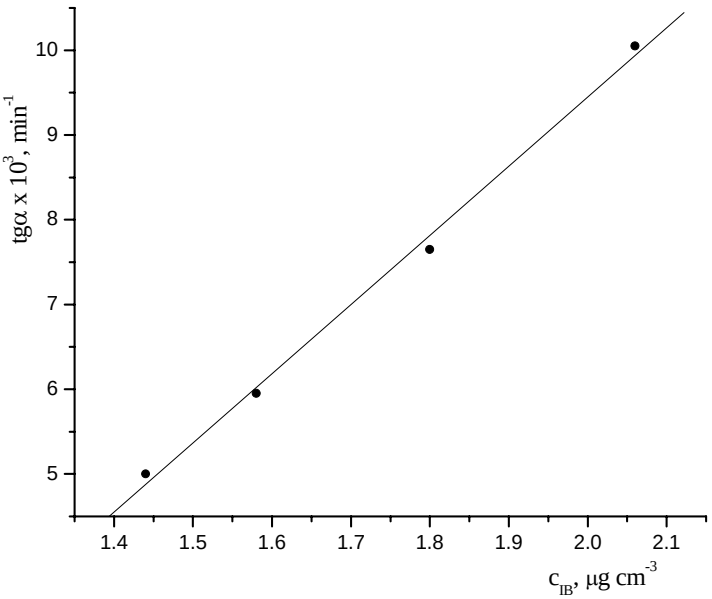
gde je:

c_{IB} – koncentracija ibuprofena izražena u μg cm^{-3}

$tg\alpha$ - nagib linearnog dela kinetičke krive u koordinatnom sistemu A = f(t)



Slika 42. Kalibraciona prava za oblast koncentracije ibuprofena od 0,21-1,44 μg cm^{-3}. Koncentracije u rastvoru: $c_{R(NO)OH}$ = 1,0·10^{-5} mol dm^{-3}, c_{CH_3COOH} = 5,0 mol dm^{-3}, c_{KBrO_3} = 2,5·10^{-3} mol dm^{-3}, $c_{Co^{2+}}$ = 3,4·10^{-6} mol dm^{-3}, c_{NaCl} = 0,1 mol dm^{-3}, t = 22,0 ± 0,1°C



Slika 43. Kalibraciona prava za oblast koncentracije ibuprofena od 1,44 do 2,06 μg cm^{-3} Koncentracije u rastvoru: $c_{R(NO)OH}$ = 1,0·10^{-5} mol dm^{-3}, c_{CH_3COOH} = 5,0 mol dm^{-3}, c_{KBrO_3} = 2,5·10^{-3} mol dm^{-3}, $c_{Co^{2+}}$ = 3,4·10^{-6} mol dm^{-3}, c_{NaCl} = 0,1 mol dm^{-3}, t = 22,0 ± 0,1°C

dok je kalibraciona prava za koncentraciju ibuprofena u intervalu od 1,44 do 2,06 μg cm^{-3} (slika 43) data jednačinom:

$$tg\alpha \cdot 10^3 = 6{,}50455 \cdot c_{IB} - 4{,}45032 \qquad r = 0{,}9966$$

gde je:

c_{IB} – koncentracija ibuprofena izražena u μg cm^{-3}

$tg\alpha$ - nagib linearnog dela kinetičke krive u koordinatnom sistemu A = f(t)

Na osnovu kinetičkih ispitivanja i određenih redova reakcije (tabela 32) može se izvesti kinetička jednačina (pri konstantnoj pH vrednosti):

$$brzina = k \cdot c_{R(NO)OH} \cdot c_{KBrO_3} \cdot c_{Co^{2+}} \cdot c_{IB}$$

gde je k - konstanta brzine reakcije.

Kinetička jednačina važi za sledeći opseg koncentracija: R(NO)OH (0,7-1,1)·10^{-5} mol dm^{-3}, CH_3COOH 4,5-6,0 mol dm^{-3}, $KBrO_3$ (1,0-3,0)·10^{-3} mol dm^{-3},Co(II) (1,8-4,2)·10^{-6} mol dm^{-3}, IB 0,21-1,44; 1,44-2,06 μg cm^{-3}, (0,1-0,7)·10^{-5}; (0,7-1,0)·10^{-5} mol dm^{-3}.

Tabela 32. Pregled reda reakcije u odnosu na svaki reaktant pojedinačno

Reaktant i opseg koncentracije, mol dm^{-3}	Red reakcije
$1{,}0 < c_{CH_3COOH} \leq 2{,}0$ $2{,}0 \leq c_{CH_3COOH} < 4{,}5$ $4{,}5 \leq c_{CH_3COOH} < 6{,}0$	1 1 0
$0{,}5\cdot10^{-5} < c_{R(NO)OH} \leq 0{,}7\cdot10^{-5}$ $0{,}7\cdot10^{-5} \leq c_{R(NO)OH} < 1{,}1\cdot10^{-5}$	1 1
$1{,}0\cdot10^{-3} < c_{KBrO_3} \leq 3{,}0\cdot10^{-3}$	1
$0{,}2\cdot10^{-6} < c_{Co^{2+}} \leq 1{,}7\cdot10^{-6}$ $1{,}7\cdot10^{-6} \leq c_{Co^{2+}} < 4{,}2\cdot10^{-6}$	1 1

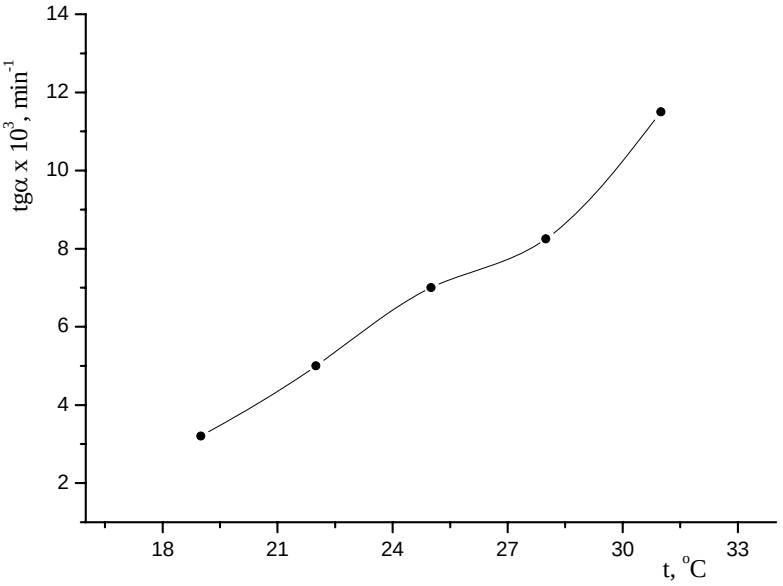
Analitički i statistički podaci za kalibracionu pravu (tabela 33) dobijeni su metodom linearne regresije u kompjuterskom programu Origin 6.1.

Tabela 33. Analitičke i statističke karakteristike kalibracione prave za određivanje ibuprofena

Parametri	
opseg linearnosti, μg cm^{-3}	0,21 – 1,44 1,44 - 2,06 n = 8
jednačina kalibracione parave	$tg\alpha \cdot 10^3 = 1{,}64667 \cdot c_{IB} + 2{,}64494$ $tg\alpha \cdot 10^3 = 6{,}50455 \cdot c_{IB} - 4{,}45032$
(nagib ± SD)·10^3	1,64667 ± 0,01503
(odsečak ± SD)·10^3	2,64494 ± 0,01447
koeficijent korelacije, r	0,9989
standardna devijacija fitovanaja, SD·10^3	0,01602
varijansa, $(SD \cdot 10^3)^2$, $(\mu g\ cm^{-3})^2$	$2{,}6 \cdot 10^{-4}$
granica detekcije, μg cm^{-3}	0,03

4.3.2. Termodinamičke karakteristike sistema

Brzina ispitivane reakcije praćenja je na 19, 22, 25, 28 i 31°C. Na osnovu dobijenih rezultata merenja dobijen je grafik zavisnosti tgα od temperature (slika 44). S obzirom na to da pri temperaturama višim od 25°C dolazi do odstupanja od linearnosti, dalja ispitivanja su vršena na 22°C.



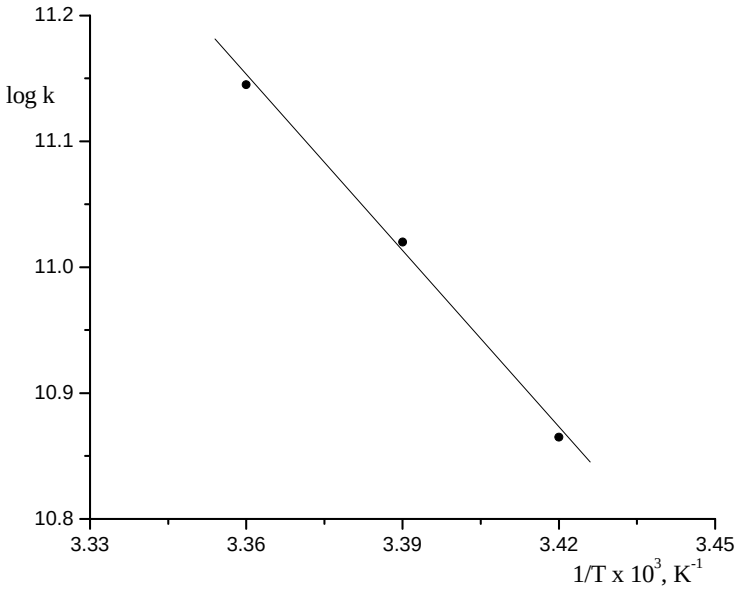
Slika 44. Zavisnost brzine reakcije od temperature. Koncentracije u rastvoru: $c_{R(NO)OH}$ = *1,0·10^{-5} mol dm^{-3},* c_{CH_3COOH} = *5,0 mol dm^{-3},* c_{KBrO_3} = *2,5·10^{-3} mol dm^{-3},* $c_{Co^{2+}}$ = *3,4·10^{-6} mol dm^{-3},* c_{IB} = *8,0·10^{-6} mol dm^{-3},* c_{NaCl} = *0,1 mol dm^{-3}*

Na osnovu kinetičke jednačine $brzina = k \cdot c_{R(NO)OH} \cdot c_{KBrO_3} \cdot c_{Co^{2+}} \cdot c_{IB}$, izračunate su konstante brzine reakcije na tri različite temperature (tabela 34).

Tabela 34. Konstante brzine reakcije na različitim temperaturama

$k \cdot 10^{11}$ (mol dm^{-3})$^{1-n}$s^{-1}	T (K)
0,74	292
1,06	295
1,43	298

n – red reakcije



Slika 45. Zavisnost logk od 1/T

Termodinamički parametri reakcije građenja aktiviranog kompleksa određeni su pomoću prave prikazane na slici 45. Iz nagiba ove prave izračunata je energija aktivacije primenom jednačine (28).

Ostali termodinamički parametri, promena entalpije (ΔH^*), promena entropije (ΔS^*), promena slobodne energije (ΔG^*) i pK* vrednost građenja aktiviranog kompleksa, izračunati su primenom jednačina (29)-(32).

Vrednosti izračunatih termodinamičkih parametara reakcije građenja aktiviranog kompleksa, primenom gore navedenih jednačina, date su u tabeli 35.

Tabela 35. Termodinamičke karakteristike građenja aktiviranog kompleksa na 295K

Sistem	**Ea* ($kJmol^{-1}$)**	**ΔH^* ($kJmol^{-1}$)**	**ΔS^* ($JK^{-1}mol^{-1}$)**	**ΔG^* ($kJmol^{-1}$)**	**pK***
R(NO)OH+HAc+Co(II)+$KBrO_3$+IB	89,38	86,93	280,04	4,32	0,76

Prema Hammond-u[139] i Smith-u[140], većina reakcija koje se odvijaju na sobnoj temperaturi imaju energiju aktivacije između 15-30 kcal mol^{-1} (62,76-125,52 kJ mol^{-1}). Vrednost izračunate energije aktivacije za ispitivani sistem je u skladu sa navedenim postulatom.

Takođe, pri relativno niskim temperaturama (sobna i niže temperature) proizvod temperature i entropije je manji od entalpije, $|T\Delta S| << |\Delta H|$.[141,142]

S obzirom da Gibsova slobodna energija zavisi od temperature to će i konstanta ravnoteže i položaj ravnoteže zavisiti od temperature. Polazeći od Van't Hofove reakcione izobare za reakcije u rastvoru ($d \ln K_c / dT = \Delta H / RT^2$) može se prodiskutovati uticaj temperature na položaj ravnoteže. Za endotermnu reakciju gde je $\Delta H > 0$ i $dK/dT > 0$, porast temperature povećava konstantu ravnoteže, odnosno pomera je u smeru građenja produkata.

Teorijski najmanja koncentracija koja se može odrediti ovom metodom može se izračunati prema *3,3S* kriterijumu, primenom jednačine (8)[143,144] i iznosi 0,03 μg cm^{-3}.

4.3.3. Tačnost i reproduktivnost određivanja ibuprofena

Tačnost i reproduktivnost metode određeni su za tri tačke sa kalibracione prave, pri čemu je izvedeno pet merenja za svaku tačku. Statističkom obradom podataka dobijeni su rezultati koji su prikazani u tabeli 36. Iz tabele se može videti da se relativna greška kreće od 1,42 do 4,88% za interval koncentracije ibuprofena od 1,44 do 0,21 μg cm^{-3}.

*Tabela 36. Tačnost i reproduktivnost određivanja ibuprofena**

Koncentracija ibuprofena (μg cm^{-3})		**RSD (%)**	$\frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \cdot 100$ **(%)**	**Recovery (%)**
odmereno	**nađeno** $\bar{x} \pm \overline{SD}$			
0,21	0,22 ± 0,01	3,93	4,76	104,76
0,83	0,82 ± 0,02	2,58	-1,20	98,80
1,44	1,45 ± 0,03	1,14	0,69	100,69

*Objašnjenje veličina i odgovarajući izrazi dati su u poglavlju 4.1.3.

4.3.4. Selektivnost određivanja ibuprofena

Za ocenu selektivnosti određivanja ibuprofena predloženom metodom ispitivan je uticaj većeg broja stranih jona i aminokiselina na brzinu ispitivane reakcije. Reakcionoj smeši pojedinačno su dodavani rastvori stranih jona, aminokiselina i punioca farmaceutskih proizvoda. Pri tome je menjana njihova koncentracija u odnosu na koncentraciju ibuprofena sve dok nije nađena ona koncentracija koja ometa određivanje ibuprofena u rastvoru (tabela 37).

Tabela 37. Selektivnost određivanja ibuprofena pri koncentraciji 1,65 µg cm^{-3}

Jonska, molekulska vrsta	I, %	q
fruktoza, glukoza, laktoza, B_1, B_6, B_{12}, Li^+, K^+, manitol, sorbitol	5-10	10^3
Si^{4+}, F^-, $C_2O_4^{2-}$	5-10	10^2
Ala, Phe, Asp, Met, Tyr, Trp, Ser nikotinska kiselina, limunska kiselina, stearinska kiselina	< 5	
His, Arg, Lys, Gly, Ca^{2+}, Zn^{2+}, Mg^{2+} 2-[4-(karboksipropil)fenil]propionska kiselina	5-10	10
Fe^{3+}, Cu^{2+}	ubrzavaju	1

q – odnos koncentracije jona/aminokiseline/punioca i IB
I - interferencioni koeficijent, $I = (c^{\circ}_{IB} - c_{IB}) / c^{\circ}_{IB}$
c°_{IB} i c_{IB} – koncentracija ibuprofena bez i u prisustvu interferirajuće supstance (dobijena iz jednačine kalibracine prave)

Aminokiseline His, Arg, Lys i Gly ometaju određivanje ibuprofena pri odnosu 1:1 jer se kompleksiraju kobaltom, kao i Cu^{2+} i Fe^{3+} joni koji grade komplekse sa 1-nitrozo-2-naftolom.

4.3.5. Primena kinetičke metode za određivanje ibuprofena u farmaceutskim preparatima i humanom kontrolnom serumu

Razrađena kinetička metoda za određivanje ibuprofena primenjena je za njegovo određivanje u farmaceutskim preparatima i humanom kontrolnom serumu. Kod određivanja ibuprofena u kontrolnom serumu dodata je ona koncentracija ibuprofena koja odgovara njegovom sadržaju u humanom serumu kada se on koristi u terapeutske svrhe.[145] Uzorci su pripremani prema postupku koji je opisan u "Eksperimentalnom delu". Kao referentna metoda korišćena je HPLC.[5,6] Rezultati su sumirani u tabelama 38 i 39. HPLC hromatogrami određivanja ibuprofena u tabletama i humanom kontrolnom serumu dati su na slici 46. Dobijeni hromatogrami standarda i uzorka pokazuju poklapanje retencionog vremena za analiziranu aktivnu komponentu - ibuprofen. U cilju kvantitativne analize, određena je integrisana površina za dati pik i sa kalibracionog dijagrama za date vrednosti apsorbancije izračunate su koncentracije ibuprofena u ispitivanim uzorcima.

Tabela 38. Tačnost i reproduktivnost određivanja ibuprofena u farmaceutskim preparatima

Metoda kalibracione prave ($\mu g\ cm^{-3}$)		**Referentna metoda (HPLC) ($\mu g\ cm^{-3}$)**	**n**	**RSD (%)**	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ **(%)**	**Recovery (%)**
odmereno	**nađeno** $\bar{x} \pm \overline{SD}$					
0,83*	0,85 ± 0,02	0,84 ± 0,03	5	3,16	2,41	102,41
1,03**	1,01 ± 0,03	1,02 ± 0,02	5	2,50	-1,94	98,06
1,44***	1,42 ± 0,02	1,41 ± 0,01	5	1,32	-1,39	98,61

** Ibuprofen*, tablete, 400 mg, Galenika a.d., Beograd
*** Ibuprofen*, tablete, 200 mg, Panfarma, Beograd
**** Ibuprofen*, krema, 20g, 1g/100mg, Galenika a.d., Beograd

Tabela 39. Tačnost i reproduktivnost određivanja ibuprofena u kontrolnom serumu

Metoda kalibracione prave (μg cm^{-3})		**Referentna metoda (HPLC) (μg cm^{-3})**	**n**	**RSD (%)**	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ **(%)**	**Recovery (%)**
dodato	**nađeno** $\bar{x} \pm \overline{SD}$					
0,31*	0,33 ± 0,01	0,32 ± 0,02	5	3,92	6,45	106,45
0,52*	0,50 ± 0,02	0,51 ± 0,01	5	3,78	-3,85	96,15

*Humani kontrolni serum, *"Lytorol N"*, bioMérieux® sa, Francuska

Količina ibuprofena koja je određena kinetičkom metodom u skladu je sa referentnom metodom i deklarisanom vrednostima za IB u farmaceutskim preparatima.

Poređenje standardnih devijacija - F-test, i srednjih vrednosti - t-test[146,147], pri 95%-tnom nivou poverenja i za dati broj stepena slobode, pokazalo je da između dve metode (kinetičke i referentne HPLC metode) ne postoji značajna razlika u preciznosti, $t_{eksp.} < t_{tab.}$ i $F_{eksp.} < F_{tab.}$ (tabele 40 i 41).

Tabela 40. t- i F-vrednosti dobijene primenom dve različite metode za određivanje ibuprofena u farmaceutskim preparatima

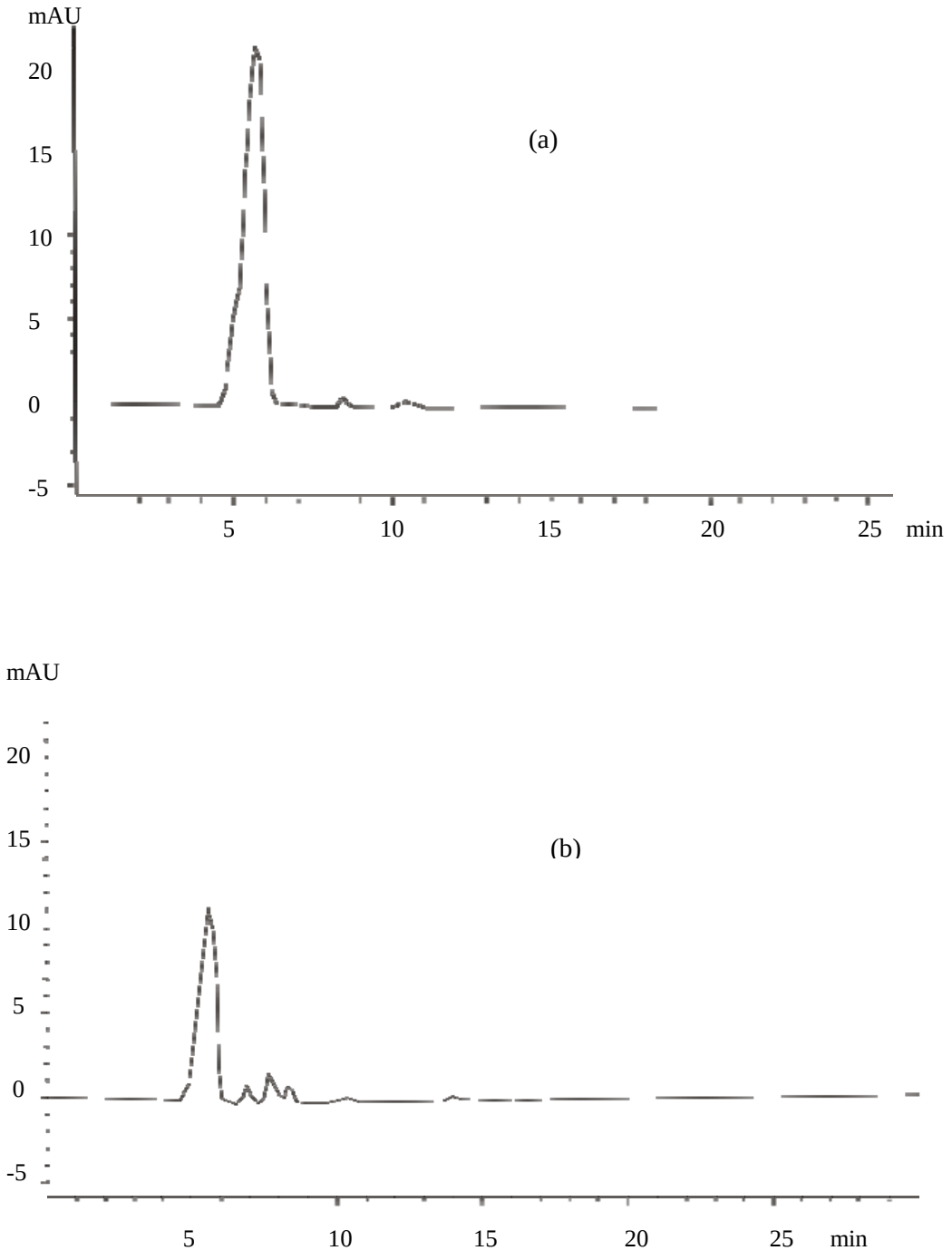
Metoda kalibracione prave (μg cm^{-3})		**Referentna metoda (HPLC) (μg cm^{-3})**	**t-test***	**F-test***
odmereno	**nađeno** $\bar{x} \pm \overline{SD}$			
0,83	0,85 ± 0,02	0,84 ± 0,03	0,609	1,36
1,03	1,01 ± 0,03	1,02 ± 0,02	0,687	1,63
1,44	1,42 ± 0,02	1,41 ± 0,01	1,054	3,41

*Tablične F- ($\nu_1 = 4$, $\nu_2 = 4$) i t-vrednosti ($\nu = 8$) pri 95%-tnom nivou poverenja su 6,39 i 2,306

Tabela 41. t- i F-vrednosti dobijene primenom dve različite metode za određivanje ibuprofena u humanom kontrolnom serumu

Metoda kalibracione prave (μg cm^{-3})		**Referentna metoda (HPLC) (μg cm^{-3})**	**t-test***	**F-test***
dodato	**nađeno** $\overline{x} \pm \overline{SD}$			
0,31*	0,33 ± 0,01	0,32 ± 0,02	1,027	2,18
0,52*	0,50 ± 0,02	0,51 ± 0,01	0,861	2,39

*Tablične F- ($\nu_1 = 4$, $\nu_2 = 4$) i t-vrednosti ($\nu = 8$) pri 95%-tnom nivou poverenja su 6,39 i 2,306



Slika 46. HPLC hromatogrami: (a) IB tablete (1,03 μg cm^{-3}), (b) spajkovan serum (0,52 μg cm^{-3} IB). Kolona: C_{18} (Zorbax, 5μm, 250 x 4,6 mm). Mobilna faza: fosforna kiselina-acetonitril-voda, 0,5:340:600 (V/V/V). Detekcija: UV 214 nm.

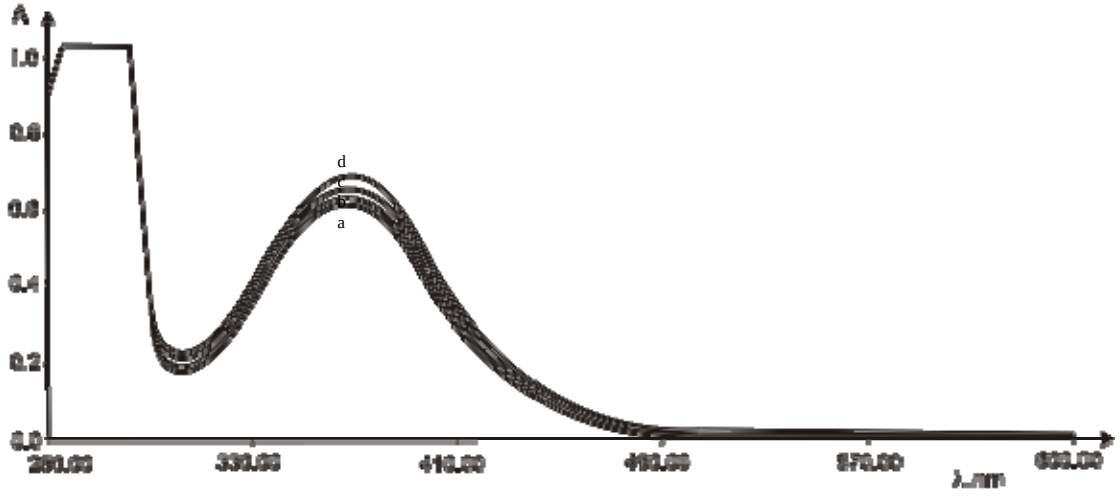
4.4. Kinetičko određivanje mikrokoličina dimenhidrinata

4.4.1. Određivanje optimalnih koncentracija

Prilikom razrade metode za određivanje dimenhidrinata korišćena je reakcija izmene metalnog jona između dva liganda. Reakcija se zasniva na istiskivanju 1-nitrozo-2-naftola iz kompleksa sa kadmijumom nakon dodatka dimenhidrinata.

$$\left[Cd(R(NO)O)_2\right]^{2+} + 2DMH \rightarrow \left[Cd(DMH)_2\right]^{2+} + 2R(NO)OH$$

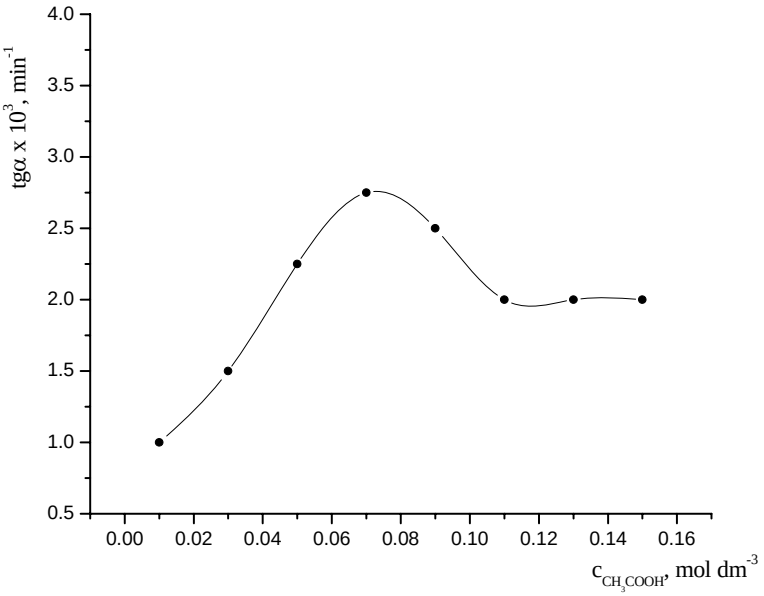
Uvođenjem dimenhidrinata u rastvor ravnoteža reakcije se pomera u desno, jer kadmijum(II) gradi stabilniji kompleks sa dimenhidrinatom nego sa 1-nitrozo-2-naftolom. Odnos metalnog jona i liganda u kompleksu je 1:2, pri čemu je u šestočlanoj helatnoj strukturi kompleksa, metalni jon koordiniran preko dva atoma azota (aminski i imidazolski N).[149] Kao rezultat formiranja kompleksa i oslobađanja 1-nitrozo-2-naftola, pojavljuje se traka na 375 nm koja odgovara apsorpcionom spektru 1-nitrozo-2-naftola u kiseloj sredini. Vremenom intenzitet ove trake raste, što je iskorišćeno za razradu kinetičko-spektrofotometrijske metode za određivanje dimenhidrinata, merenjem povećanja obojenosti rastvora na 375 nm u funkciji od vremena (slika 47). Za obradu kinetičkih podataka primenjena je tangensna metoda, s obzirom na to da postoji linearna zavisnost između promene apsorbancije rastvora i vremena odigravanja reakcije u toku prvih 5-6 minuta.



Slika 47. Promena apsorpcionog spektra 1-nitrozo-2-naftola u etanolno kiseloj sredini sa vremenom nakon dodatka dimenhidrinata: a) 1; b) 3; c) 5; d) 7 min. Koncentracije u rastvoru: $c_{R(NO)OH} = 1{,}0 \cdot 10^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{CH_3COOH} = 0{,}1$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{Cd^{2+}} = 5{,}0 \cdot 10^{-6}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{DMH} = 1{,}0 \cdot 10^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$

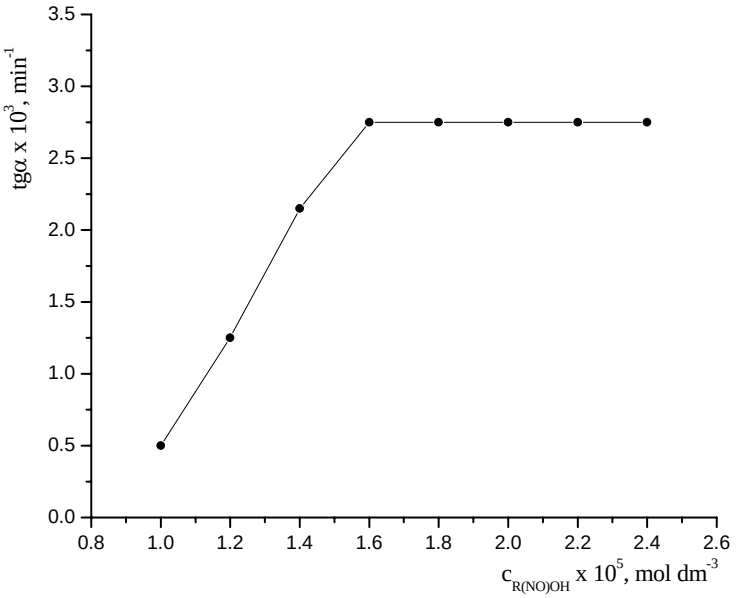
U cilju razrade što osetljivije metode za određivanje dimenhidrinata, trebalo je najpre odrediti optimalne uslove odigravanja reakcije. U tom smislu praćena je zavisnost brzine reakcije (tgα) od koncentracije svakog reaktanta pojedinačno (R(NO)OH, CH_3COOH, Cd^{2+}, DMH).

Uticaj koncentracije sirćetne kiseline na brzinu reakcije (slika 48) praćen je u intervalu $(1,0\text{-}15,0)\cdot10^{-2}$ mol dm^{-3}. Kao što se sa slike može videti, brzina reakcije raste sa povećanjem koncentracije sirćetne kiseline, dostiže maksimum i pri koncentracijama većim od $11,0\cdot10^{-2}$ mol dm^{-3} ostaje konstantna. Dalja merenja su vršena pri koncentraciji sirćetne kiseline od $7,0\cdot10^{-2}$ mol dm^{-3}.

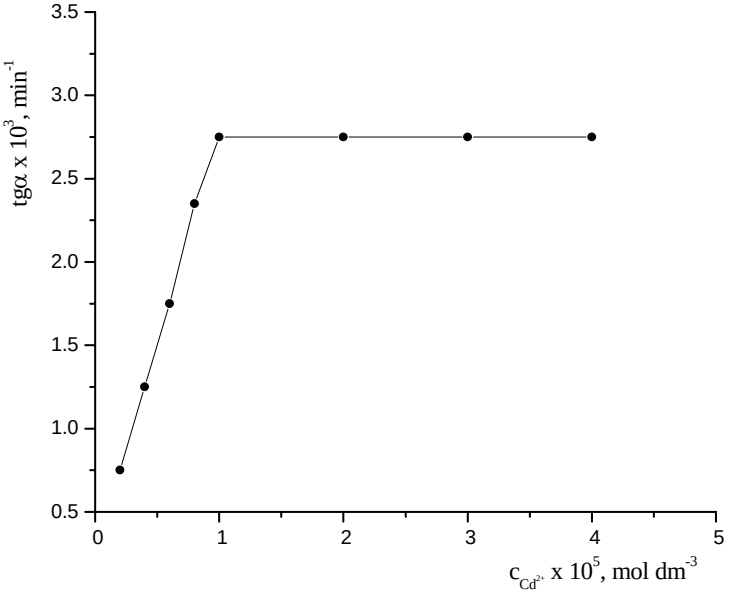


Slika 48. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije sirćetne kiseline. Koncentracije u rastvoru: $c_{R(NO)OH} = 2,0\cdot10^{-5}$ *mol* dm^{-3}, $c_{Cd^{2+}} = 1,0\cdot10^{-5}$ *mol* dm^{-3}, $c_{DMH} = 1,0\cdot10^{-5}$ *mol* dm^{-3}, $c_{NaCl} = 0,1$ *mol* dm^{-3}, $t = 22,0 \pm 0,1$ ℃

Zavisnost brzine reakcije od koncentracije 1-nitrozo-2-naftola prikazana je na slici 49. Brzina reakcije raste sa povećanjem koncentracije u intervalu od $(1,0\text{-}2,4)\cdot10^{-5}$mol dm^{-3}. Pri koncentracijama većim od $1,5\cdot10^{-5}$ mol dm^{-3}, brzina reakcije se ne menja. Koncentracija 1-nitrozo-2-naftola od $1,8\cdot10^{-5}$ mol dm^{-3} uzeta je kao optimalna koncentracija za dalja merenja.



Slika 49. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije 1-nitrozo-2-naftola. Koncentracije u rastvoru: $c_{CH_3COOH} = 7{,}0 \cdot 10^{-2}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{Cd^{2+}} = 1{,}0 \cdot 10^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{DMH} = 1{,}0 \cdot 10^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{NaCl} = 0{,}1$ *mol dm*$^{-3}$, $t = 22{,}0 \pm 0{,}1\,^{\circ}C$

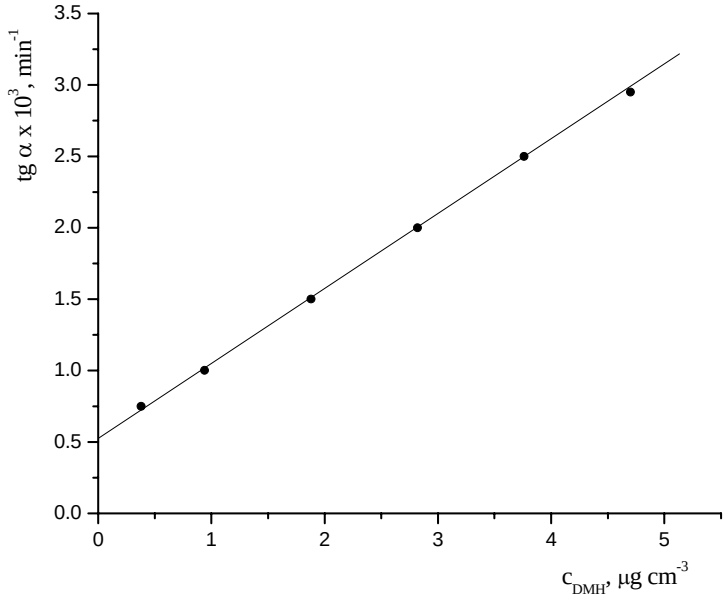


Slika 50. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije Cd(II). Koncentracije u rastvoru: $c_{CH_3COOH} = 7{,}0 \cdot 10^{-2}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{R(NO)OH} = 1{,}8 \cdot 10^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{DMH} = 1{,}0 \cdot 10^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{NaCl} = 0{,}1$ *mol dm*$^{-3}$, $t = 22{,}0 \pm 0{,}1\,^{\circ}C$

Zavisnost brzine reakcije od koncentracije kadmijuma(II) (slika 50) praćena je u intervalu koncentracije Cd(II) (0,2-4,0)·10^{-5} mol dm^{-3}. Sa slike se može videti da brzina reakcije raste sa povećanjem koncentracije i postaje konstantna pri koncentraciji Cd(II) od 1,0·10^{-5} mol dm^{-3}. U daljem radu koncentracija Cd(II) od 2,0·10^{-5} mol dm^{-3} uzeta je kao optimalna koncentracija.

Pri optimalnim uslovima odigravanja reakcije: c_{CH_3COOH} = *7,0·10^{-2} mol dm^{-3}*, $c_{R(NO)OH}$ = *1,8·10^{-5} mol dm^{-3}*, $c_{Cd^{2+}}$ = *2,0·10^{-5} mol dm^{-3}*, c_{NaCl} = *0,1 mol dm^{-3}*, *t = 22,0 ± 0,1°C*, praćen je uticaj dimenhidrinata na brzinu reakcije.

Dobijena kalibraciona prava je linearna u intervalu koncentracije dimenhidrinata 0,38-4,71 μg cm^{-3} i može poslužiti za određivanje dimenhidrinata u rastvoru (slika 51).



Slika 51. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije dimenhidrinata. Koncentracije u rastvoru: c_{CH_3COOH} = 7,0·10^{-2} mol dm^{-3}, $c_{R(NO)OH}$ = 1,8·10^{-5} mol dm^{-3}, $c_{Cd^{2+}}$ = 2,0·10^{-5} mol dm^{-3}, c_{NaCl} = 0,1 mol dm^{-3}, t = 22,0 ± 0,1 °C

Kalibraciona prava za određivanje dimenhidrinata na 22°C može se prikazati sledećom jednačinom:

$$tg\alpha \cdot 10^3 = 0{,}52486 \cdot c_{DMH} + 0{,}525 \qquad r = 0{,}9989$$

gde je:

c_{DMH} – koncentracija dimenhidrinata izražena u μg cm^{-3}

$tg\alpha$ - nagib linearnog dela kinetičke krive u koordinatnom sistemu A = f(t)

Na osnovu prikazanih zavisnosti između brzine reakcije i koncentracije svakog reaktanta pojedinačno, kao i određenog reda reakcije u odnosu na svaki reaktant pojedinačno (tabela 42), može se postaviti kinetička jednačina za ispitivani proces:

$$brzina = k \cdot c_{DMH}$$

gde je k - konstanta brzine reakcije

Kinetička jednačina važi za sledeći opseg koncentracija: R(NO)OH $(1,6\text{-}2,4)\cdot10^{-5}$ mol dm^{-3}, CH_3COOH $(1,0\text{-}7,0)\cdot10^{-2}$ mol dm^{-3}, Cd(II) $(1,0\text{-}4,0)\cdot10^{-5}$ mol dm^{-3}, DMH 0,38-4,71 μg cm^{-3}, $0,8\cdot10^{-6}$-$1,0\cdot10^{-5}$ mol dm^{-3}.

Tabela 42. Pregled reda reakcije u odnosu na svaki reaktant pojedinačno

Reaktant i opseg koncentracije, mol dm^{-3}	Red reakcije
$1,0\cdot10^{-2} < c_{CH_3COOH} \leq 7,0\cdot10^{-2}$ $7,0\cdot10^{-2} \leq c_{CH_3COOH} < 11,0\cdot10^{-2}$ $11,0\cdot10^{-2} \leq c_{CH_3COOH} < 15,0\cdot10^{-2}$	1 -1 0
$1,0\cdot10^{-5} < c_{R(NO)OH} \leq 1,6\cdot10^{-5}$ $1,6\cdot10^{-5} \leq c_{R(NO)OH} < 2,4\cdot10^{-5}$	1 0
$0,2\cdot10^{-5} < c_{Cd^{2+}} \leq 1,0\cdot10^{-5}$ $1,0\cdot10^{-5} \leq c_{Cd^{2+}} < 4,0\cdot10^{-5}$	1 0

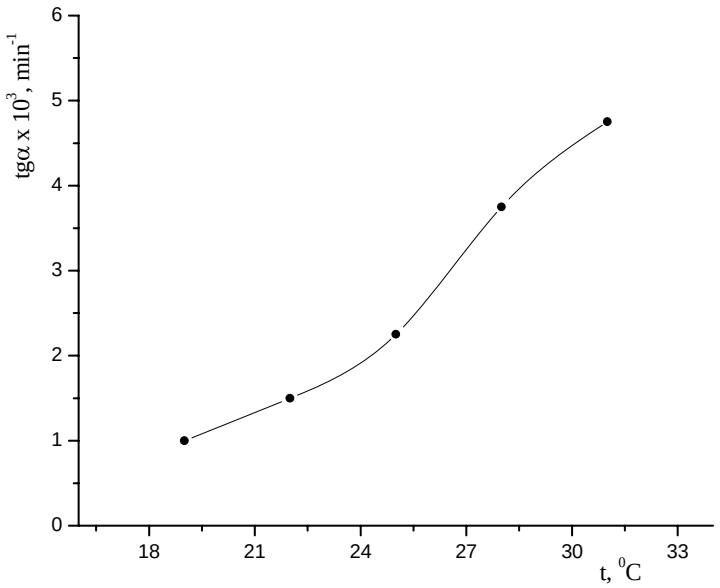
Analitički i statistički podaci za kalibracionu pravu (tabela 43) dobijeni su metodom linearne regresije u kompjuterskom programu Origin 6.1.

Tabela 43. Analitičke i statističke karakteristike kalibracione prave za određivanje dimenhidrinata

Parametri	
opseg linearnosti, μg cm^{-3}	0,38 – 4,71 n = 6
jednačina kalibracione parave	$tg\alpha \cdot 10^3 = 0{,}52486 \cdot c_{DMH} + 0{,}525$
(nagib ± SD)·10^3	0,52486 ± 0,00471
(odsečak ± SD)·10^3	0,525 ± 0,01342
koeficijent korelacije, r	$r = 0{,}9989$
standardna devijacija fitovanja, SD·10^3	0,01749
varijansa, $(SD \cdot 10^3)^2$, $(\mu g\ cm^{-3})^2$	$3{,}06 \cdot 10^{-4}$
granica detekcije, μg cm^{-3}	0,10

4.4.2. Termodinamičke karakteristike sistema

Brzina ispitivane reakcije praćenja je na 19, 22, 25, 28 i 31°C. Na osnovu dobijenih rezultata merenja dobijen je grafik zavisnosti tgα od temperature (slika 52). S obzirom na to da pri temperaturama višim od 25°C dolazi do odstupanja od linearnosti, dalja ispitivanja su vršena na 22°C.



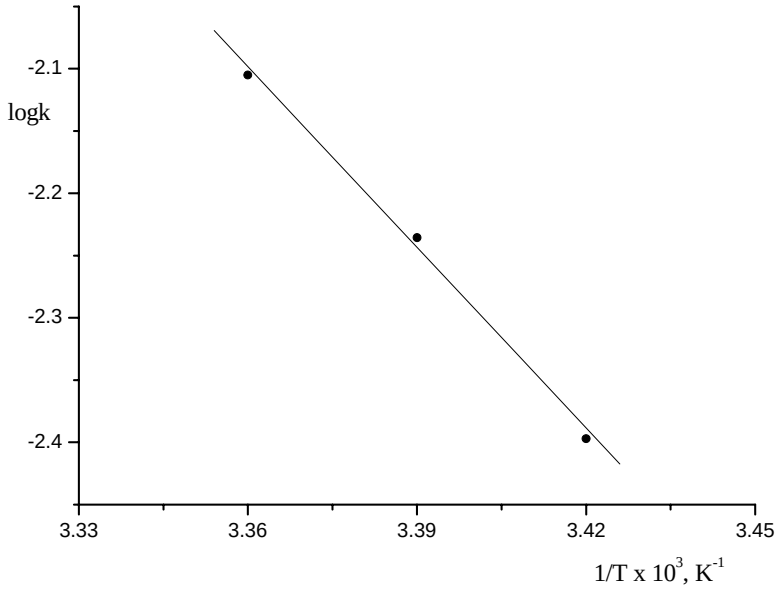
Slika 52. Zavisnost brzine reakcije od temperature. Koncentracije u rastvoru: c_{CH_3COOH} = *0,07 mol dm*$^{-3}$, $c_{R(NO)OH}$ = *1,8·10*$^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{Cd^{2+}}$ = *2,0·10*$^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, c_{DMH} = *6,0·10*$^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, c_{NaCl} = *0,1 mol dm*$^{-3}$

Na osnovu kinetičke jednačine $brzina = k \cdot c_{DMH}$, izračunate su konstante brzine reakcije na tri različite temperature (tabela 44).

Tabela 44. Konstante brzine reakcije na različitim temperaturama

$k \cdot 10^3$ (mol dm^{-3})$^{1-n}$s^{-1}	T (K)
4,07	292
6,10	295
8,14	298

n – red reakcije



Slika 53. Zavisnost logk od 1/T

Termodinamički parametri reakcije građenja aktiviranog kompleksa određeni su pomoću prave prikazane na slici 53. Iz nagiba ove prave izračunata je energija aktivacije primenom jednačine (28).

Ostali termodinamički parametri, promena entalpije (ΔH^*), promena entropije (ΔS^*), promena slobodne energije (ΔG^*) i pK* vrednost građenja aktiviranog kompleksa, mogu se izračunati primenom jednačina (29)-(32).

Vrednosti izračunatih termodinamičkih parametara reakcije građenja aktiviranog kompleksa, primenom gore navedenih jednačina, date su u tabeli 45.

Tabela 45. Termodinamičke karakteristike građenja aktiviranog kompleksa na 295K

Sistem	**Ea* (kJmol^{-1})**	**ΔH* (kJmol^{-1})**	**ΔS* (JK^{-1}mol^{-1})**	**ΔG* (kJmol^{-1})**	**pK***
R(NO)OH+CH_3COOH+Cd(II)+DMH	92,50	90,05	17,63	84,85	15,03

Prema Hammond-u[139] i Smith-u[140], većina reakcija koje se odvijaju na sobnoj temperaturi imaju energiju aktivacije između 15-30 kcal mol^{-1} (62,76-125,52 kJ mol^{-1}). Vrednost izračunate energije aktivacije za ispitivani sistem je u skladu sa navedenim postulatom.

Takođe, pri relativno niskim temperaturama (sobna i niže temperature) proizvod temperature i entropije je manji od entalpije, $|T\Delta S| << |\Delta H|$.[141,142]

S obzirom da Gibsova slobodna energija zavisi i od temperature to će i konstanta ravnoteže i položaj ravnoteže zavisiti od temperature. Polazeći od Vant Hofove reakcione izobare za reakcije u rastvoru ($d \ln K_c / dT = \Delta H / RT^2$) može se prodiskutovati uticaj temperature na položaj ravnoteže. Za endotermnu reakciju gde je $\Delta H > 0$ i $dK/dT > 0$, porast temperature povećava konstantu ravnoteže, odnosno pomera je u smeru građenja produkata.

Teorijski najmanja koncentracija dimenhidrinata koja se može odrediti ovom metodom može se izračunati prema *3,3S* kriterijumu, primenom jednačine (8)[143,144] i iznosi 0,10 μg cm^{-3}.

4.4.3. Tačnost i reproduktivnost određivanja dimenhidrinata

Tačnost i reproduktivnost metode određeni su za tri koncentracije sa kalibracione prave, pri čemu je izvedeno pet merenja za svaku koncentraciju. Statističkom obradom podataka dobijeni su rezultati koji su sumirani u tabeli 46. Kao što se može videti, relativna greška se kreće od 4,15 do 1,77% za interval koncentracije dimenhidrinata od 0,38 do 4,71 μg cm^{-3}.

*Tabela 46. Tačnost i reproduktivnost određivanja dimenhidrinata**

Koncentracija dimenhidrinata (μg cm^{-3})		**RSD (%)**	$\frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \cdot 100$ **(%)**	**Recovery (%)**
odmereno	**nađeno** $\bar{x} \pm \overline{SD}$			
0,38	0,40 ± 0,02	4,15	5,26	105,26
2,82	2,76 ± 0,06	2,02	-2,13	97,87
4,71	4,73 ± 0,08	1,77	0,64	100,42

*Objašnjenje veličina i odgovarajući izrazi dati su u poglavlju 4.1.3.

4.4.4. Selektivnost određivanja dimenhidrinata

Za ocenu selektivnosti određivanja dimenhidrinata predloženom metodom ispitivan je uticaj većeg broja stranih jona, aminokiselina i punioca farmaceutskih preparata na brzinu reakcije. Reakcionoj smeši pojedinačno su dodavani rastvori ispitivanih supstanci. Pri tome je menjana njihova koncentracija u odnosu na koncentraciju dimenhidrinata, sve dok nije nađena ona koncentracija koja ometa njegovo određivanje u rastvoru (tabela 47).

Tabela 47. Selektivnost određivanja dimenhidrinata pri koncentraciji 2,82 µg cm^{-3}

Jonska, molekulska vrsta	I, %	q
fruktoza, glukoza, laktoza	5-10	10^3
manitol, sorbitol	< 5	
B_1, B_6, B_{12}, Li^+, K^+, Si^{4+}	5-10	10^2
F^-, $C_2O_4^{2-}$, Ala, Phe, Asp, Met, Tyr, Trp, nikotinska kiselina, stearinska kiselina, limunska kiselina	< 5	
Ca^{2+}, Zn^{2+}, Mg^{2+}	5-10	10
His, Arg, Lys, Ser, Gly	< 5	
Fe^{3+}, Cu^{2+}	ubrzavaju	1

q – odnos koncentracije jona/aminokiseline/punioca i DMH
I - interferencioni koeficijent, $I = (c^{\circ}_{DMH} - c_{DMH}) / c^{\circ}_{DMH}$
c°_{DMH} i c_{DMH} – koncentracija dimenhidrinata bez i u prisustvu interferirajuće supstance (dobijena iz jednačine kalibracione prave)

S obzirom na to da joni Fe^{3+} i Cu^{2+} joni grade komplekse sa 1-nitrozo-2-naftolom, oni smetaju pri određivanju dimenhidrinata predloženom metodom.

4.4.5. Primena kinetičke metode za određivanje dimenhidrinata u farmaceutskim preparatima i humanom kontrolnom serumu

Razrađena kinetička metoda za određivanje dimenhidrinata primenjena je za njegovo određivanje u farmaceutskim preparatima i humanom kontrolnom serumu (model sistem). Uzorci su pripremani prema postupku koji je opisan u "Eksperimentalnom delu". Kao referentna metoda korišćena je HPLC.[150] Rezultati su sumirani u tabelama 48 i 49. HPLC hromatogrami određivanja dimenhidrinata u tabletama i humanom kontrolnom serumu dati su na slici 54. Dobijeni hromatogrami standarda i uzorka pokazuju poklapanje retencionog vremena za analiziranu aktivnu komponentu - dimenhidrinat. U cilju kvantitativne analize, određena je integrisana površina za dati pik i sa kalibracionog dijagrama za date vrednosti apsorbancije izračunate su koncentracije dimenhidrinata u ispitivanim uzorcima.

Tabela 48. Tačnost i reproduktivnost određivanja dimenhidrinata u farmaceutskim preparatima

Metoda kalibracione prave ($\mu g\ cm^{-3}$)		**Referentna metoda (HPLC) ($\mu g\ cm^{-3}$)**	**n**	**RSD (%)**	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ **(%)**	**Recovery (%)**
odmereno	**nađeno** $\bar{x} \pm \overline{SD}$					
1,88*	1,83 ± 0,04	1,81 ± 0,03	5	1,95	-2,66	97,34
3,76**	3,72 ± 0,03	3,70 ± 0,02	5	0,80	-1,06	98,94

**Dimigal*, tablete, 50 mg, Galenika, a. d., Beograd, Srbija
***Dramina*, tablete, 50 mg, Galenski laboratorij d. d., Rijeka, Hrvatska

*Tabela 49. Tačnost i reproduktivnost određivanja dimenhidrinata u humanom kontrolnom serumu**

Metoda kalibracione prave ($\mu g\ cm^{-3}$)		**Referentna metoda (HPLC) ($\mu g\ cm^{-3}$)**	**n**	**RSD (%)**	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ **(%)**	**Recovery (%)**
dodato	**nađeno** $\bar{x} \pm \overline{SD}$					
0,94	0,89 ± 0,03	0,87 ± 0,02	5	3,73	-5,32	94,68

*Humani kontrolni serum, *"Lytorol N"*, bioMérieux® sa, Francuska

Količina dimenhidrinata koja je određena kinetičkom metodom u skladu je sa referentnom metodom i deklarisanim vrednostima za dimenhidrinat u farmaceutskim preparatima.

Poređenje standardnih devijacija - F-test i srednjih vrednosti - t-test[146,147], pri 95%-tnom nivou poverenja i za dati broj stepena slobode, pokazalo je da između dve metode (kinetičke i referentne HPLC) ne postoji značajna razlika u preciznosti, $t_{eksp.} < t_{tab.}$ i $F_{eksp.} < F_{tab.}$ (tabele 50 i 51).

Tabela 50. t- i F-vrednosti dobijene primenom dve različite metode za određivanje dimenhidrinata u farmaceutskim preparatima

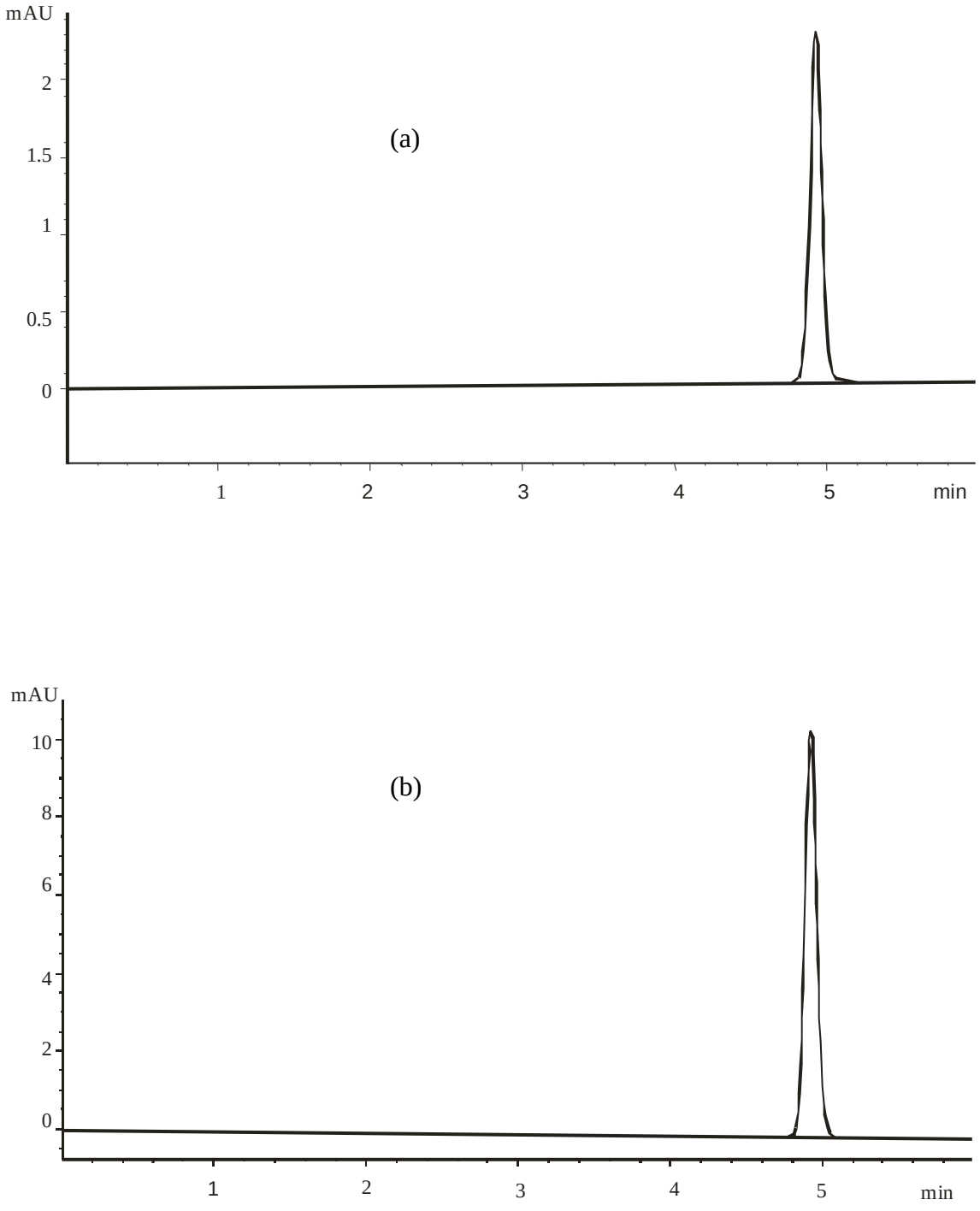
Metoda kalibracione prave (μg cm^{-3})		**Referentna metoda (HPLC) (μg cm^{-3})**	**t-test***	**F-test***
odmereno	**nađeno** $\overline{x} \pm \overline{SD}$			
1,88	1,83 ± 0,04	1,81 ± 0,03	1,562	1,76
3,76	3,72 ± 0,03	3,70 ± 0,02	1,989	2,51

*Tablične F- ($\nu_1 = 4$, $\nu_2 = 4$) i t-vrednosti ($\nu = 8$) pri 95%-tnom nivou poverenja su 6,39 i 2,306

Tabela 51. t- i F-vrednosti dobijene primenom dve različite metode za određivanje dimenhidrinata u kontrolnom serumu

Metoda kalibracione prave (μg cm^{-3})		**Referentna metoda (HPLC) (μg cm^{-3})**	**t-test***	**F-test***
dodato	**nađeno** $\overline{x} \pm \overline{SD}$			
0,94	0,89 ± 0,03	0,87 ± 0,02	1,091	1,84

*Tablične F- ($\nu_1 = 4$, $\nu_2 = 4$) i t-vrednosti ($\nu = 8$) pri 95%-tnom nivou poverenja su 6,39 i 2,306



Slika 54. HPLC hromatogrami: (a) DMH tablete (3,76 μg cm^{-3}), (b) spajkovan serum (0,56 μg cm^{-3} DMH). Kolona: C_{18} (Zorbax, 5μm, 250 x 4,6 mm). Mobilna faza: fosfatni pufer (pH 3,0±0,1)-acetonitril, 80:20 (V/V). Detekcija: UV, 285 nm.

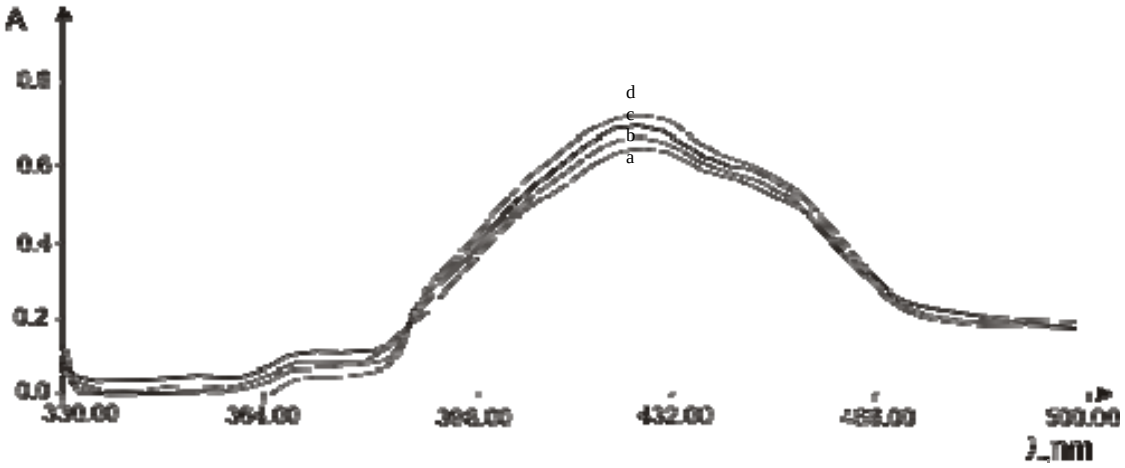
4.5. Kinetičko određivanje mikrokoličina klonazepama

4.5.1. Određivanje optimalnih koncentracija

Kao indikatorska reakcija za određivanje mikrokoličina klonazepama u rastvoru poslužila je tzv. "ligand-excange" reakcija koja se zasniva na istiskivanju 1-nitrozo-2-naftola iz kompleksa sa kobaltom nakon dodatka klonazepama. Klonazepam gradi stabilniji kompleks od 1-nitrozo-2-naftola sa kobaltom i ravnoteža reakcije se pomera u desnu stranu uz oslobađanje 1-nitrozo-2-naftola.[151]

$$3Co\left[R(NO)O\right]_2 \cdot 2H_2O + 2KZP \rightarrow Co_3\left[KZP\right]_2 + 6R(NO)OH$$

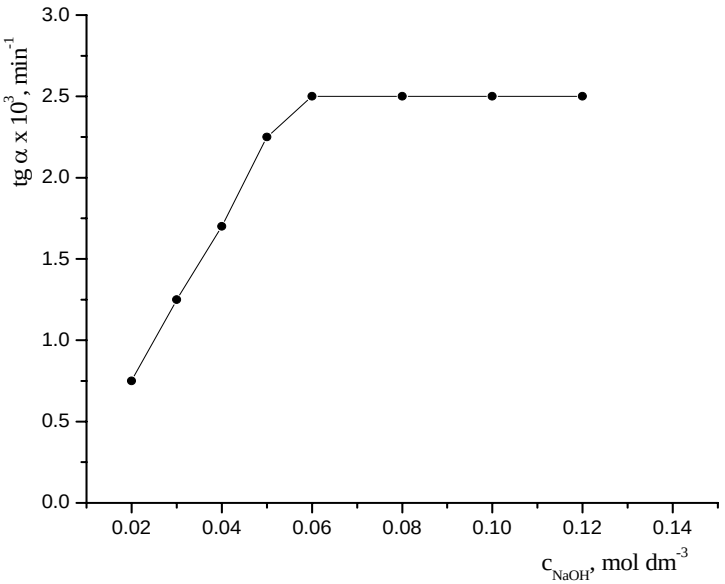
Uvođenjem klonazepama u rastvor pojavljuje se traka na 425 nm koja odgovara apsorpcionom spektru 1-nitrozo-2-naftola u baznoj sredini. Vremenom intenzitet ove trake raste, što je iskorišćeno za razradu kinetičko-spektrofotometrijske metode za određivanje klonazepama, merenjem povećanja obojenosti rastvora na 425 nm u funkciji od vremena (slika 55). Za obradu kinetičkih podataka primenjena je tangensna metoda, s obzirom na to da postoji linearna zavisnost između promene apsorbancije rastvora i vremena odigravanja reakcije u toku prvih 5-6 minuta.



Slika 55. Promena apsorpcionog spektra 1-nitrozo-2-naftola u etanolno baznoj sredini sa vremenom nakon dodatka klonazepama: a) 1; b) 3; c) 5; d) 7 min. Koncentracije u rastvoru: $c_{R(NO)OH} = 1{,}0\cdot10^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{NaOH} = 1{,}0\cdot10^{-2}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{Co^{2+}} = 1{,}7\cdot10^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{KZP} = 1{,}0\cdot10^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{NaCl} = 0{,}1$ *mol dm*$^{-3}$

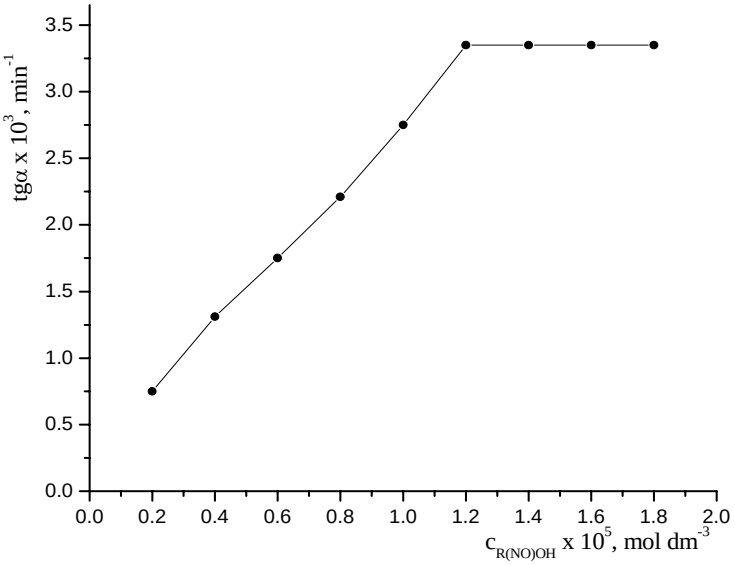
U cilju razrade što osetljivije metode za određivanje klonazepama, trebalo je najpre odrediti optimalne uslove odigravanja reakcije. U tom smislu praćena je zavisnost brzine reakcije (tgα) od koncentracije svakog reaktanta pojedinačno (R(NO)OH, NaOH, Co^{2+}, KZP).

Uticaj koncentracije natrijum-hidroksida na brzinu reakcije (slika 56) praćen je u intervalu $(2,0\text{-}12,0)\cdot10^{-2}$ mol dm^{-3}. Kao što se sa slike može videti, brzina reakcije raste sa povećanjem koncentracije natrijum-hidroksida, dostiže maksimum i pri koncentracijama većim od $6,0\cdot10^{-2}$ mol dm^{-3} ostaje konstantna. Dalja merenja su vršena pri koncentraciji natrijum-hidroksida od $8,0\cdot10^{-2}$ mol dm^{-3}.

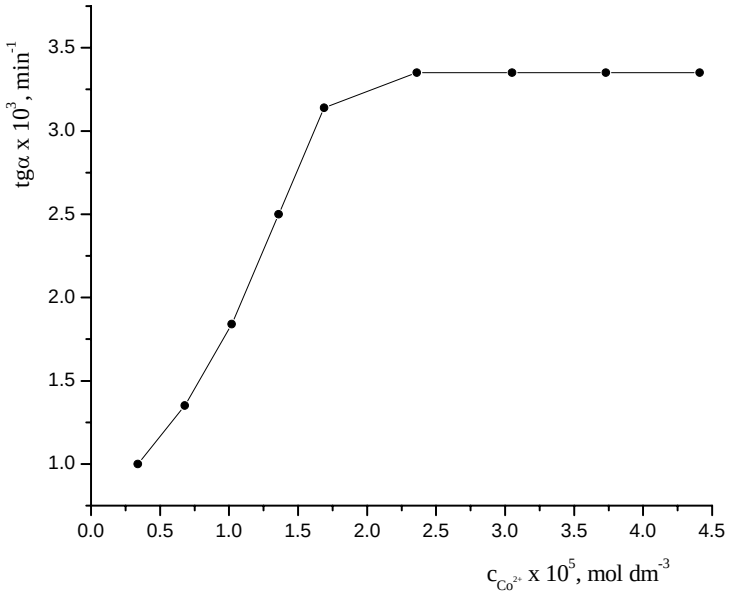


Slika 56. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije natrijum-hidroksida. Koncentracije u rastvoru: $c_{R(NO)OH} = 1,0\cdot10^{-5}$ *mol* dm^{-3}, $c_{Co^{2+}} = 1,7\cdot10^{-5}$ *mol* dm^{-3}, $c_{KZP} = 1,0\cdot10^{-5}$ *mol* dm^{-3}, $c_{NaCl} = 0,1$ *mol* dm^{-3}, $t = 22,0 \pm 0,1°C$

Zavisnost brzine reakcije od koncentracije 1-nitrozo-2-naftola prikazana je na slici 57. Brzina reakcije raste sa povećanjem koncentracije u intervalu od $(0,2\text{-}1,2)\cdot10^{-5}$mol dm^{-3}. Pri koncentracijama većim od $1,2\cdot10^{-5}$ mol dm^{-3}, brzina reakcije se ne menja. Koncentracija 1-nitrozo-2-naftola od $1,4\cdot10^{-5}$ mol dm^{-3} uzeta je kao optimalna koncentracija za dalja merenja.



Slika 57. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije 1-nitrozo-2-naftola. Koncentracije u rastvoru: $c_{NaOH} = 8{,}0 \cdot 10^{-2}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{Co^{2+}} = 1{,}7 \cdot 10^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{KZP} = 1{,}0 \cdot 10^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{NaCl} = 0{,}1$ *mol dm*$^{-3}$, $t = 22{,}0 \pm 0{,}1°C$

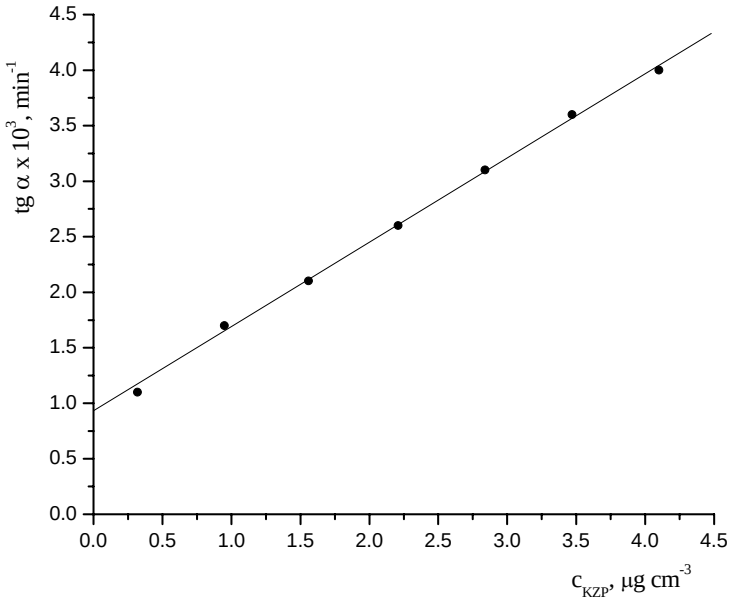


Slika 58. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije Co(II). Koncentracije u rastvoru: $c_{NaOH} = 8{,}0 \cdot 10^{-2}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{R(NO)OH} = 1{,}4 \cdot 10^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{KZP} = 1{,}0 \cdot 10^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{NaCl} = 0{,}1$ *mol dm*$^{-3}$, $t = 22{,}0 \pm 0{,}1°C$

Korelacija brzine reakcije i koncentracije kobalta(II) (slika 58) praćena je u intervalu koncentracije Co(II) (0,3-4,4)·10^{-5} mol dm^{-3}. Sa slike se može videti da brzina reakcije raste sa povećanjem koncentracije i postaje konstantna pri koncentraciji Co(II) od 2,4·10^{-5} mol dm^{-3}. U daljem radu koncentracija Co(II) od 3,1·10^{-5} mol dm^{-3} uzeta je kao optimalna koncentracija.

Pri optimalnim uslovima odigravanja reakcije: $c_{NaOH} = 8{,}0 \cdot 10^{-2}$ *mol* dm^{-3}, $c_{R(NO)OH} = 1{,}4 \cdot 10^{-5}$ *mol* dm^{-3}, $c_{Co^{2+}} = 3{,}1 \cdot 10^{-5}$ *mol* dm^{-3}, $c_{NaCl} = 0{,}1$ *mol* dm^{-3}, $t = 22{,}0 \pm 0{,}1°C$, praćen je uticaj klonazepama na brzinu reakcije.

Dobijena kalibraciona prava je linearna u intervalu koncentracije klonazepama 0,32-4,10 µg cm^{-3} i može poslužiti za određivanje klonazepama u rastvoru (slika 59).



Slika 59. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije klonazepama. Koncentracije u rastvoru: $c_{NaOH} = 8{,}0 \cdot 10^{-2}$ *mol* dm^{-3}, $c_{R(NO)OH} = 1{,}4 \cdot 10^{-5}$ *mol* dm^{-3}, $c_{Co^{2+}} = 3{,}1 \cdot 10^{-5}$ *mol* dm^{-3}, $c_{NaCl} = 0{,}1$ *mol* dm^{-3}, $t = 22{,}0 \pm 0{,}1°C$

Kalibraciona prava za određivanje klonazepama na 22°C može se prikazati sledećom jednačinom:

$$tg\alpha \cdot 10^3 = 0{,}75881 \cdot c_{KZP} + 0{,}93235 \qquad r = 0{,}9985$$

gde je:

c_{KZP} – koncentracija klonazepama izražena u µg cm^{-3}

$tg\alpha$ - nagib linearnog dela kinetičke krive u koordinatnom sistemu A = f(t)

Na osnovu prikazanih zavisnosti između brzine reakcije i koncentracije svakog reaktanta pojedinačno, kao i određenog reda reakcije u odnosu na svaki reaktant pojedinačno (tabela 52), može se postaviti kinetička jednačina za ispitivani proces:

$$brzina = k \cdot c_{KZP}$$

gde je k - konstanta brzine reakcije.

Kinetička jednačina važi za sledeći opseg koncentracija: R(NO)OH (1,2-1,8)·10^{-5} mol dm^{-3}, NaOH (6,0-12,0)·10^{-2} mol dm^{-3}, Co(II) (2,4-4,4)·10^{-5} mol dm^{-3}, KZP 0,32-4,10 µg cm^{-3}, 0,5·10^{-6}-1,3·10^{-5} mol dm^{-3}.

Tabela 52. Pregled reda reakcije u odnosu na svaki reaktant pojedinačno

Reaktant i opseg koncentracije, mol dm^{-3}	Red reakcije
$2{,}0\cdot10^{-2} < c_{NaOH} \leq 6{,}0\cdot10^{-2}$ $6{,}0\cdot10^{-2} \leq c_{NaOH} < 12{,}0\cdot10^{-2}$	1 0
$0{,}2\cdot10^{-5} < c_{R(NO)OH} \leq 1{,}2\cdot10^{-5}$ $1{,}2\cdot10^{-5} \leq c_{R(NO)OH} < 1{,}8\cdot10^{-5}$	1 0
$0{,}3\cdot10^{-5} < c_{Co^{2+}} \leq 2{,}4\cdot10^{-5}$ $2{,}4\cdot10^{-5} \leq c_{Co^{2+}} < 4{,}4\cdot10^{-5}$	1 0

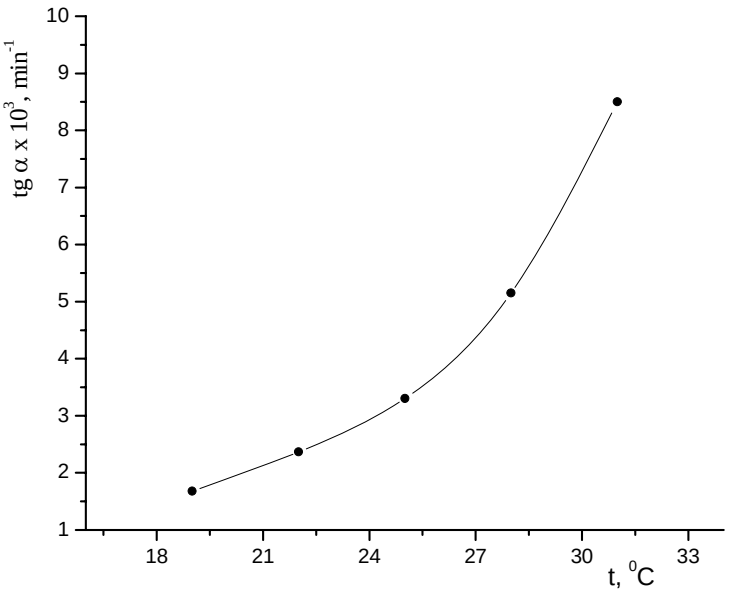
Analitički i statistički podaci za kalibracionu pravu (tabela 53) dobijeni su metodom linearne regresije u kompjuterskom programu Origin 6.1.

Tabela 53. Analitičke i statističke karakteristike kalibracione prave za određivanje klonazepama

Parametri	
opseg linearnosti, μg cm^{-3}	0,32 – 4,10 n = 7
jednačina kalibracione parave	$tg\alpha \cdot 10^3 = 0{,}75881 \cdot c_{KZP} + 0{,}93235$
(nagib ± SD)·10^3	0,75881 ± 0,01828
(odsečak ± SD)·10^3	0,93235 ± 0,04647
koeficijent korelacije, r	$r = 0{,}9985$
standardna devijacija fitovanja, SD·10^3	0,06
varijansa, $(SD \cdot 10^3)^2$, $(\mu g\ cm^{-3})^2$	$3{,}6 \cdot 10^{-3}$
granica detekcije, μg cm^{-3}	0,24

4.5.2. Termodinamičke karakteristike sistema

Brzina ispitivane reakcije praćenja je na 19, 22, 25, 28 i 31°C. Na osnovu dobijenih rezultata merenja dobijen je grafik zavisnosti tgα od temperature (slika 60). S obzirom na to da pri temperaturama višim od 25°C dolazi do odstupanja od linearnosti, dalja ispitivanja su vršena na 22°C.



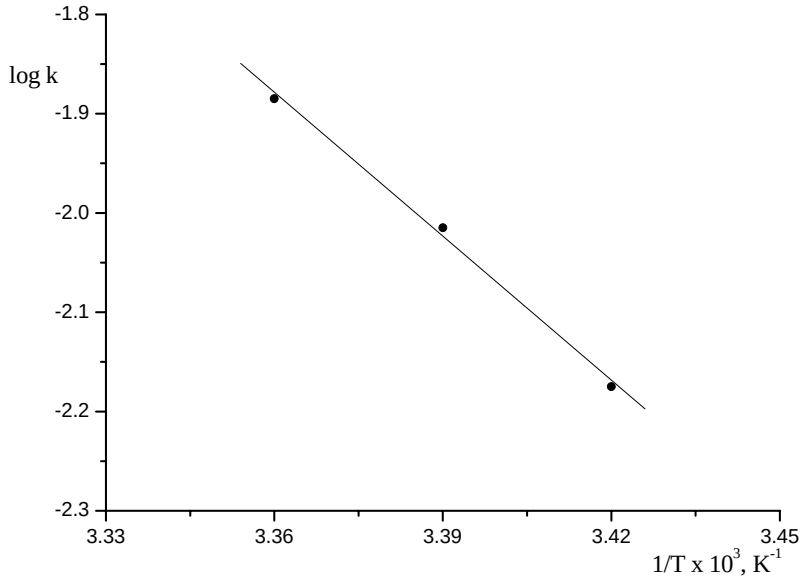
Slika 60. Zavisnost brzine reakcije od temperature. Koncentracije reaktanata u rastvoru: $c_{R(NO)OH} = 1{,}4 \cdot 10^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{NaOH} = 8{,}0 \cdot 10^{-2}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{Co^{2+}} = 3{,}1 \cdot 10^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{KZP} = 7{,}0 \cdot 10^{-6}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{NaCl} = 0{,}1$ *mol dm*$^{-3}$

Na osnovu kinetičke jednačine $brzina = k \cdot c_{KZP}$, izračunate su konstante brzine reakcije na tri različite temperature (tabela 54).

Tabela 54. Konstante brzine reakcije na različitim temperaturama

$k \cdot 10^2$ (mol dm^{-3})$^{1-n}$s^{-1}	T (K)
0,68	292
0,96	295
1,33	298

n – red reakcije



Slika 61. Zavisnost logk od 1/T

Termodinamički parametri reakcije građenja aktiviranog kompleksa određeni su pomoću prave prikazane na slici 61. Iz nagiba ove prave izračunata je energija aktivacije primenom jednačine (28).

Ostali termodinamički parametri, promena entalpije (ΔH^*), promena entropije (ΔS^*), promena slobodne energije (ΔG^*) i pK* vrednost građenja aktiviranog kompleksa, mogu se izračunati primenom jednačina (29)-(32).

Vrednosti izračunatih termodinamičkih parametara reakcije građenja aktiviranog kompleksa, primenom gore navedenih jednačina, date su u tabeli 55.

Tabela 55. Termodinamičke karakteristike građenja aktiviranog kompleksa na 295K

Sistem	**Ea* ($kJmol^{-1}$)**	**ΔH^* ($kJmol^{-1}$)**	**ΔS^* ($JK^{-1}mol^{-1}$)**	**ΔG^* ($kJmol^{-1}$)**	**pK***
R(NO)OH+NaOH+Co(II)+KZP	92,45	89,99	21,61	83,61	14,81

Prema Hammond-u[139] i Smith-u[140], većina reakcija koje se odvijaju na sobnoj temperaturi imaju energiju aktivacije između 15-30 kcal mol^{-1} (62,76-125,52 kJ mol^{-1}). Vrednost izračunate energije aktivacije za ispitivani sistem je u skladu sa navedenim postulatom.

Takođe, pri relativno niskim temperaturama (sobna i niže temperature) proizvod temperature i entropije je manji od entalpije, $|T\Delta S| << |\Delta H|$.[141,142]

S obzirom da Gibsova slobodna energija zavisi i od temperature to će i konstanta ravnoteže i položaj ravnoteže zavisiti od temperature. Polazeći od Van't Hofove reakcione izobare za reakcije u rastvoru ($d \ln K_c / dT = \Delta H / RT^2$) može se prodiskutovati uticaj temperature na položaj ravnoteže. Za endotermnu reakciju gde je $\Delta H > 0$ i $dK/dT > 0$, porast temperature povećava konstantu ravnoteže, odnosno pomera je u smeru građenja produkata.

Teorijski najmanja koncentracija koja se može odrediti ovom metodom može se izračunati prema *3,3S* kriterijumu, primenom jednačine (8)[143,144] i iznosi 0,26 μg cm^{-3}.

4.5.3. Tačnost i reproduktivnost određivanja klonazepama

Tačnost i reproduktivnost metode određeni su za tri koncentracije sa kalibracione prave, pri čemu je izvedeno pet merenja za svaku koncentraciju. Statističkom obradom podataka dobijeni su rezultati koji su sumirani u tabeli 56. Kao što se može videti, relativna greška se kreće od 3,39 do 1,53% za interval koncentracije klonazepama od 0,32 do 4,1 μg cm^{-3}.

*Tabela 56. Tačnost i reproduktivnost određivanja klonazepama**

Koncentracija klonazepama (μg cm^{-3})		**RSD (%)**	$\frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \cdot 100$ **(%)**	**Recovery (%)**
odmereno	**nađeno** $\bar{x} \pm \overline{SD}$			
0,32	0,33 ± 0,01	3,39	3,12	103,12
2,21	2,15 ± 0,04	2,08	-2,71	97,29
4,10	3,39 ± 0,06	1,53	-2,68	97,32

*Objašnjenje veličina i odgovarajući izrazi dati su u poglavlju 4.1.3.

4.5.4. Selektivnost određivanja klonazepama

Za ocenu selektivnosti određivanja klonazepama predloženom metodom ispitivan je uticaj većeg broja stranih jona, aminokiselina i punioca farmaceutskih preparata na brzinu reakcije. Reakcionoj smeši pojedinačno su dodavani rastvori ispitivanih supstanci. Pri tome je menjana njihova koncentracija u odnosu na koncentraciju klonazepama, sve dok nije nađena ona koncentracija koja ometa njegovo određivanje u rastvoru (tabela 57).

Tabela 57. Selektivnost određivanja klonazepama pri koncentraciji 2,21 μg cm^{-3}

Jonska, molekulska vrsta	I, %	q
limunska kiselina	10 – 15	10^2
fruktoza, glukoza, laktoza, B_1, B_6, B_{12}, manitol, sorbitol, nikotinska kiselina, Si^{4+}	5 - 10	
Li^+, K^+, F^-, stearinska kiselina	< 5	
Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}, $C_2O_4^{2-}$	5 - 10	10
Ser, Phe, Met, Tyr, Trp, Ala, Asp	< 5	
His, Arg, Lys, Gly	usporavaju	1
Fe^{3+}, Cu^{2+}	ubrzavaju	1

q – odnos koncentracije jona/aminokiseline/punioca i KZP
I - interferencioni koeficijent, $I = (c^{\circ}_{KZP} - c_{KZP}) / c^{\circ}_{KZP}$
c°_{KL} i c_{KL} – koncentracija klonazepama bez i u prisustvu interferirajuće supstance (dobijena iz jednačine kalibracine prave)

Aminokiseline His, Arg, Lys i Gly ometaju određivanje klonazepama pri odnosu 1:1 jer se kompleksiraju kobaltom, dok Cu^{2+} i Fe^{3+} joni grade komplekse sa 1-nitrozo-2-naftolom tako da i oni smetaju određivanju klonazepama predloženom metodom.

4.5.5. Primena kinetičke metode za određivanje klonazepama u farmaceutskim preparatima i humanom kontrolnom serumu

Razrađena kinetička metoda za određivanje klonazepama primenjena je za njegovo određivanje u farmaceutskim preparatima i humanom kontrolnom serumu (model sistem). Uzorci su pripremani prema postupku koji je opisan u "Eksperimentalnom delu". Kao referentna metoda korišćenana je HPLC.[5] Rezultati su sumirani u tabelama 58 i 59. HPLC hromatogrami određivanja klonazepama u tabletama i humanom kontrolnom serumu dati su na slici 62. Dobijeni hromatogrami standarda i uzorka pokazuju poklapanje retencionog vremena za analiziranu aktivnu komponentu - klonazepam. U cilju kvantitativne analize, određena je integrisana površina za dati pik i sa kalibracionog dijagrama za date vrednosti apsorbancije izračunate su koncentracije diazepama u ispitivanim uzorcima.

Tabela 58. Tačnost i reproduktivnost određivanja klonazepama u farmaceutskim preparatima

Metoda kalibracione prave ($\mu g\ cm^{-3}$)		**Referentna metoda (HPLC) ($\mu g\ cm^{-3}$)**	**n**	**RSD (%)**	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ **(%)**	**Recovery (%)**
odmereno	**nađeno** $\bar{x} \pm \overline{SD}$					
2,84*	2,81 ± 0,04	2,78 ± 0,03	5	1,56	-1,06	98,94
3,47**	3,44 ± 0,05	3,41 ± 0,04	5	1,44	-0,87	99,13

**Rivotril*, tablete, 2 mg, Galenika a.d., Beograd
***Rivotril*, tablete, 2 mg, La Roche, Švajcarska

Sadržaj pomoćnih supstanci: kukuruzni skrob, laktoza monohidrat, talk, magnezijum-stearat

Tabela 59. Tačnost i reproduktivnost određivanja klonazepama u humanom kontrolnom serumu

Metoda kalibracione prave ($\mu g\ cm^{-3}$)		**Referentna metoda (HPLC) ($\mu g\ cm^{-3}$)**	**n**	**RSD (%)**	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ **(%)**	**Recovery (%)**
dodato	**nađeno** $\bar{x} \pm \overline{SD}$					
0,32*	0,30 ± 0,02	0,28 ± 0,01	5	4,88	-6,25	93,75
0,95*	0,92 ± 0,03	0,91 ± 0,02	5	2,34	-3,16	96,84

*Humani kontrolni serum, *"Lytorol N"*, bioMérieux® sa, Francuska

Količina klonazepama koja je određena kinetičkom metodom u skladu je sa referentnom metodom i deklarisanim vrednostima za klonazepam u farmaceutskim preparatima.

Poređenje standardnih devijacija - F-test i srednjih vrednosti - t-test[146,147] pri 95%-tnom nivou poverenja i za dati broj stepena slobode, pokazalo je da između dve metode (kinetičke i referentne) ne postoji značajna razlika u preciznosti, $t_{eksp.} < t_{tab.}$ i $F_{eksp.} < F_{tab.}$ (tabele 60 i 61).

Tabela 60. t- i F-vrednosti dobijene primenom dve različite metode za određivanje klonazepama u farmaceutskim preparatima

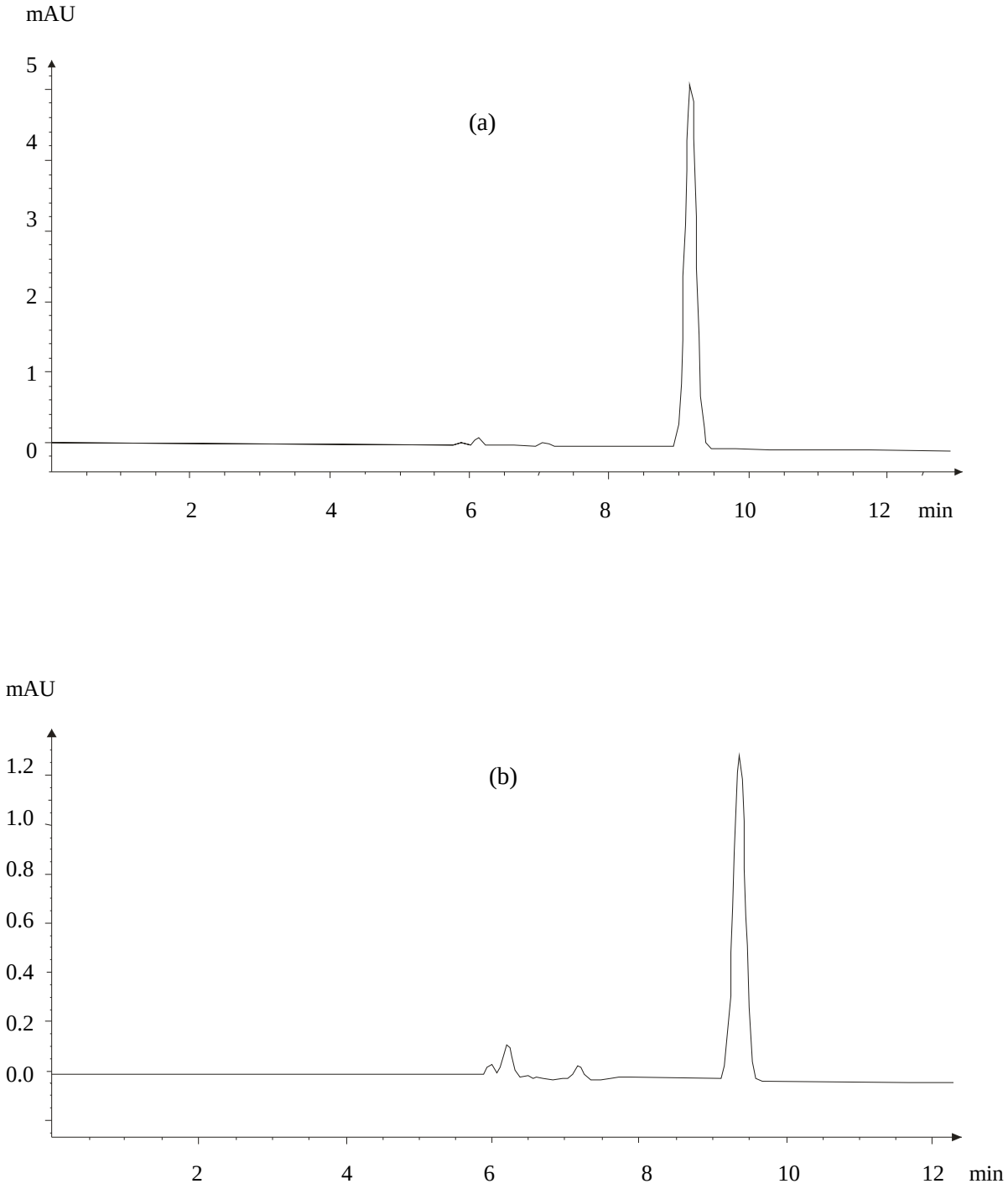
Metoda kalibracione prave ($\mu g\ cm^{-3}$)		**Referentna metoda (HPLC) ($\mu g\ cm^{-3}$)**	**t-test***	**F-test***
odmereno	**nađeno** $\bar{x} \pm \overline{SD}$			
2,84	2,81 ± 0,04	2,78 ± 0,03	1,216	1,75
3,47	3,44 ± 0,05	3,41 ± 0,04	1,078	1,68

*Tablične F- ($\nu_1 = 4$, $\nu_2 = 4$) i t-vrednosti ($\nu = 8$) pri 95%-tnom nivou poverenja su 6,39 i 2,306

Tabela 61. t- i F-vrednosti dobijene primenom dve različite metode za određivanje klonazepama u kontrolnom serumu

Metoda kalibracione prave (μg cm^{-3})		**Referentna metoda (HPLC) (μg cm^{-3})**	**t-test***	**F-test***
dodato	**nađeno** $\bar{x} \pm \overline{SD}$			
0,32	0,30 ± 0,01	0,28 ± 0,01	1,976	1,26
0,95	0,92 ± 0,02	0,91 ± 0,01	1,090	1,91

*Tablične F- ($\nu_1 = 4$, $\nu_2 = 4$) i t-vrednosti ($\nu = 8$) pri 95%-tnom nivou poverenja su 6,39 i 2,306



Slika 62. HPLC hromatogrami: (a) KZP tablete (3,47 μg cm^{-3}), (b) spajkovan serum (0,95 μg cm^{-3} KZP). Kolona: C_{18} (Zorbax, 5μm, 250 x 4,6 mm). Mobilna faza: tetrahidrofuran-metanol-amonijum-fosfat, 10:42:48 (V/V/V). Detekcija: UV 254 nm.

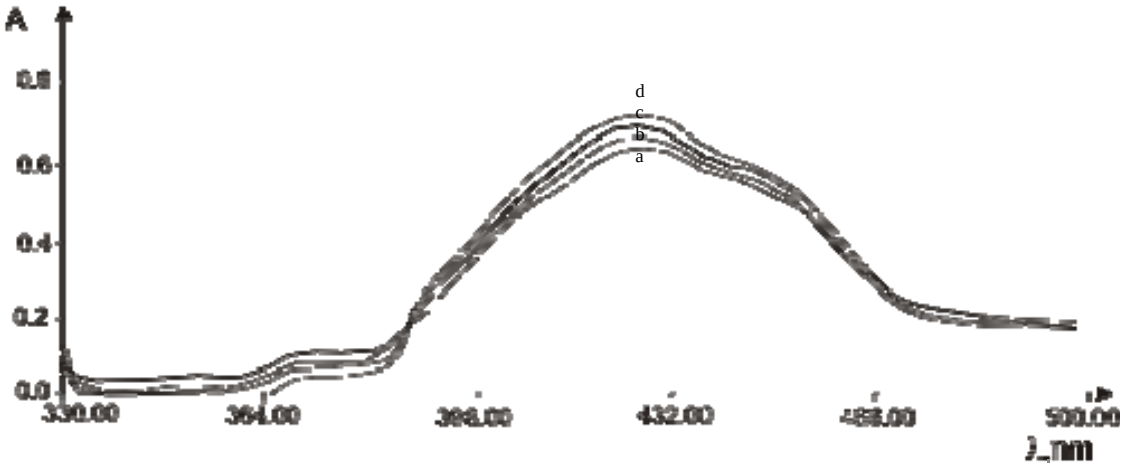
4.6. Kinetičko određivanje mikrokoličina diazepama

4.6.1. Određivanje optimalnih koncentracija

Kao indikatorska reakcija za određivanje mikrokoličina diazepama u rastvoru poslužila je tzv. ligand-exchange reakcija koja se zasniva na istiskivanju 1-nitrozo-2-naftola iz kompleksa sa bakrom nakon dodatka diazepama. Diazepam gradi stabilniji kompleks sa bakrom od 1-nitrozo-2-naftola i ravnoteža reakcije se pomera u desnu stranu uz oslobađanje 1-nitrozo-2-naftola.[152]

$$Cu[R(NO)O]_2 + 2DZP \rightarrow [Cu(DZP)_2]Cl_2 + 2R(NO)OH$$

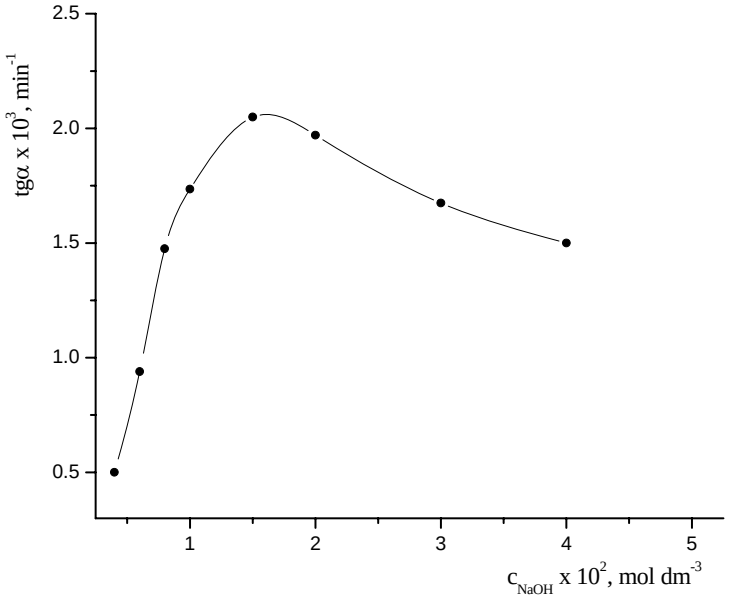
Uvođenjem diazepama u rastvor pojavljuje se traka na 425 nm koja odgovara apsorpcionom spektru 1-nitrozo-2-naftola u baznoj sredini. Vremenom intenzitet ove trake raste, što je iskorišćeno za razradu kinetičko-spektrofotometrijske metode za određivanje diazepama, merenjem povećanja obojenosti rastvora na 425 nm u funkciji od vremena (slika 63). Za obradu kinetičkih podataka primenjena je tangensna metoda, s obzirom na to da postoji linearna zavisnost između promene apsorbancije rastvora i vremena odigravanja reakcije u toku prvih 5-6 minuta.



Slika 63. Promena apsorpcionog spektra 1-nitrozo-2-naftola u etanolno baznoj sredini sa vremenom nakon dodatka diazepama: a) 1; b) 3; c) 5; d) 7 min. Koncentracije u rastvoru: $c_{R(NO)OH} = 1{,}0 \cdot 10^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{NaOH} = 1{,}0 \cdot 10^{-2}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{Cu^{2+}} = 1{,}6 \cdot 10^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{DZP} = 1{,}0 \cdot 10^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$

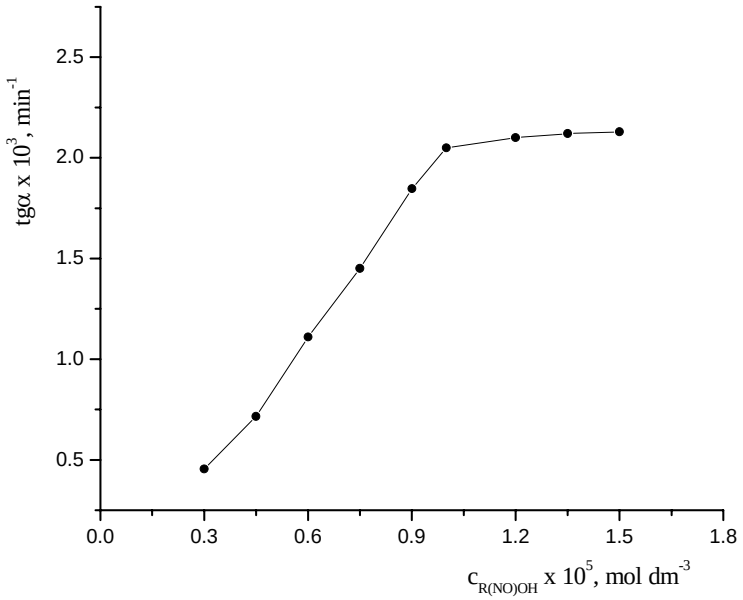
U cilju razrade što osetljivije metode za određivanje diazepama, trebalo je najpre odrediti optimalne uslove odigravanja reakcije. U tom smislu praćena je zavisnost brzine (tgα) reakcije od koncentracije svakog reaktanta pojedinačno (R(NO)OH, NaOH, Cu^{2+}, DZP).

Uticaj koncentracije natrijum-hidroksida na brzinu reakcije (slika 64) praćen je u intervalu $(0,4\text{-}4,0)\cdot10^{-2}$ mol dm^{-3}. Kao što se sa slike može videti, brzina reakcije raste sa povećanjem koncentracije natrijum-hidroksida, prolazi kroz maksimum i pri koncentracijama većim od $1,5\cdot10^{-2}$ mol dm^{-3} opada. Dalja merenja su vršena pri koncentraciji natrijum-hidroksida od $1,5\cdot10^{-2}$ mol dm^{-3}.

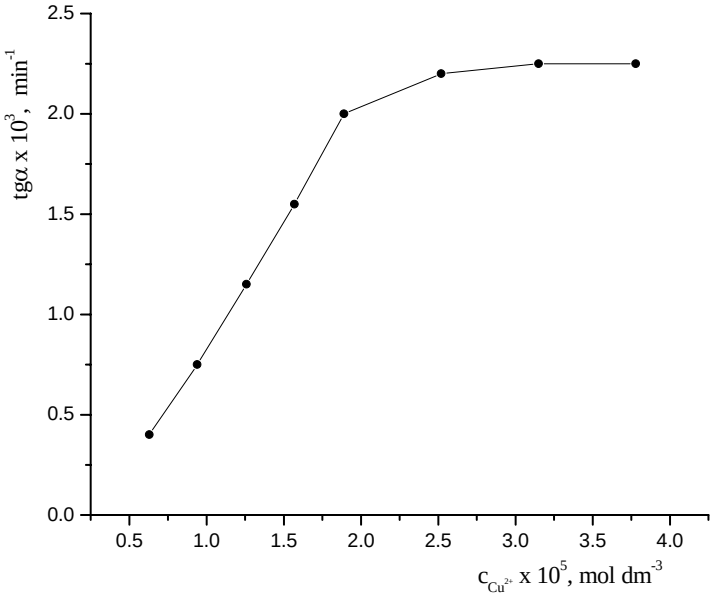


Slika 64. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije natrijum-hidroksida. Koncentracije u rastvoru: $c_{R(NO)OH} = 1,0\cdot10^{-5}$ *mol* dm^{-3}, $c_{Cu^{2+}} = 1,6\cdot10^{-5}$ *mol* dm^{-3}, $c_{DZP} = 1,0\cdot10^{-5}$ *mol* dm^{-3}, $c_{NaCl} = 0,1$ *mol* dm^{-3}, $t = 22,0 \pm 0,1°C$

Zavisnost brzine reakcije od koncentracije 1-nitrozo-2-naftola prikazana je na slici 65. Brzina reakcije raste sa povećanjem koncentracije u intervalu od $(0,3\text{-}1,5)\cdot10^{-5}$mol dm^{-3}. Pri koncentracijama većim od $1,0\cdot10^{-5}$ mol dm^{-3}, brzina reakcije se ne menja. Koncentracija 1-nitrozo-2-naftola od $1,2\cdot10^{-5}$ mol dm^{-3} uzeta je kao optimalna koncentracija za dalja merenja.



Slika 65. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije 1-nitrozo-2-naftola. Koncentracije u rastvoru: $c_{NaOH} = 1{,}5 \cdot 10^{-2}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{Cu^{2+}} = 1{,}6 \cdot 10^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{DZP} = 1{,}0 \cdot 10^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{NaCl} = 0{,}1$ *mol dm*$^{-3}$, $t = 22{,}0 \pm 0{,}1$°*C*

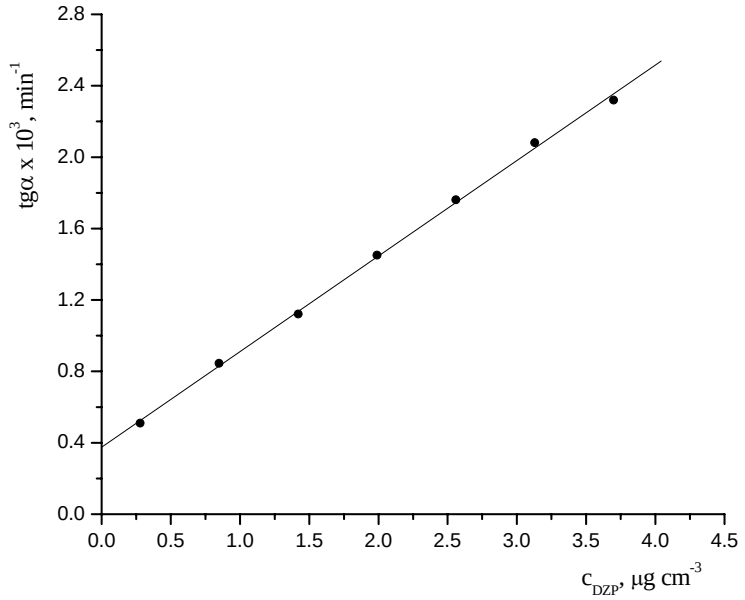


Slika 66. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije Cu(II). Koncentracije u rastvoru: $c_{NaOH} = 1{,}5 \cdot 10^{-2}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{R(NO)OH} = 1{,}2 \cdot 10^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{DZP} = 1{,}0 \cdot 10^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{NaCl} = 0{,}1$ *mol dm*$^{-3}$, $t = 22{,}0 \pm 0{,}1$°*C*

Korelacija brzine reakcije i koncentracije bakra(II) (slika 66) praćena je u intervalu koncentracije Cu(II) (0,6-4,4)·10^{-5} mol dm^{-3}. Sa slike se može videti da brzina reakcije raste sa povećanjem koncentracije i postaje konstantna pri koncentraciji Cu(II) većim od 2,5·10^{-5} mol dm^{-3}. U daljem radu koncentracija Cu(II) od 3,2·10^{-5} mol dm^{-3} uzeta je kao optimalna koncentracija.

Pri optimalnim uslovima odigravanja reakcije: $c_{NaOH} = 1{,}5 \cdot 10^{-2}$ *mol* dm^{-3}, $c_{R(NO)OH} = 1{,}2 \cdot 10^{-5}$ *mol* dm^{-3}, $c_{Cu^{2+}} = 3{,}2 \cdot 10^{-5}$ *mol* dm^{-3}, $c_{NaCl} = 0{,}1$ *mol* dm^{-3}, $t = 22{,}0 \pm 0{,}1°C$, praćen je uticaj diazepama na brzinu reakcije.

Dobijena kalibraciona prava je linearna u intervalu koncentracije diazepama 0,28-3,70 µg cm^{-3} i može poslužiti za određivanje klonazepama u rastvoru (slika 67).



Slika 67. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije diazepama. Koncentracije u rastvoru: $c_{NaOH} = 1{,}5 \cdot 10^{-2}$ *mol* dm^{-3}, $c_{R(NO)OH} = 1{,}2 \cdot 10^{-5}$ *mol* dm^{-3}, $c_{Cu^{2+}} = 3{,}2 \cdot 10^{-5}$ *mol* dm^{-3}, $c_{NaCl} = 0{,}1$ *mol* dm^{-3}, $t = 22{,}0 \pm 0{,}1°C$

Kalibraciona prava za određivanje diazepama na 22°C može se prikazati sledećom jednačinom:

$$tg\alpha \cdot 10^3 = 0{,}53509 \cdot c_{DZP} + 0{,}37589 \qquad r = 0{,}9984$$

gde je:

c_{DZP} – koncentracija diazepama izražena u µg cm^{-3}

$tg\alpha$ - nagib linearnog dela kinetičke krive u koordinatnom sistemu A = f(t)

Na osnovu prikazanih zavisnosti između brzine reakcije i koncentracije svakog reaktanta pojedinačno, kao i određenog reda reakcije u odnosu na svaki reaktant pojedinačno (tabela 62), može se postaviti kinetička jednačina za ispitivani proces:

$$brzina = k \cdot c_{NaOH} \cdot c_{DZP}$$

gde je k - konstanta brzine reakcije

Kinetička jednačina važi za sledeći opseg koncentracija: R(NO)OH $(1,0\text{-}1,5)\cdot10^{-5}$ mol dm^{-3}, NaOH $(0,4\text{-}1,5)\cdot10^{-2}$ mol dm^{-3}, Cu(II) $(2,5\text{-}4,4)\cdot10^{-5}$ mol dm^{-3}, DZP 0,28-3,70 μg cm^{-3}, $(0,1\text{-}1,5)\cdot10^{-5}$ mol dm^{-3}.

Tabela 62. Pregled reda reakcije u odnosu na svaki reaktant pojedinačno

Reaktant i opseg koncentracije, mol dm^{-3}	Red reakcije
$0,4\cdot10^{-2} < c_{NaOH} \leq 1,5\cdot10^{-2}$ $1,5\cdot10^{-2} \leq c_{NaOH} < 4,0\cdot10^{-2}$	1 -1
$0,3\cdot10^{-5} < c_{R(NO)OH} \leq 1,0\cdot10^{-5}$ $1,0\cdot10^{-5} \leq c_{R(NO)OH} < 1,5\cdot10^{-5}$	1 0
$0,6\cdot10^{-5} < c_{Cu^{2+}} \leq 2,5\cdot10^{-5}$ $2,5\cdot10^{-5} \leq c_{Cu^{2+}} < 4,4\cdot10^{-5}$	1 0

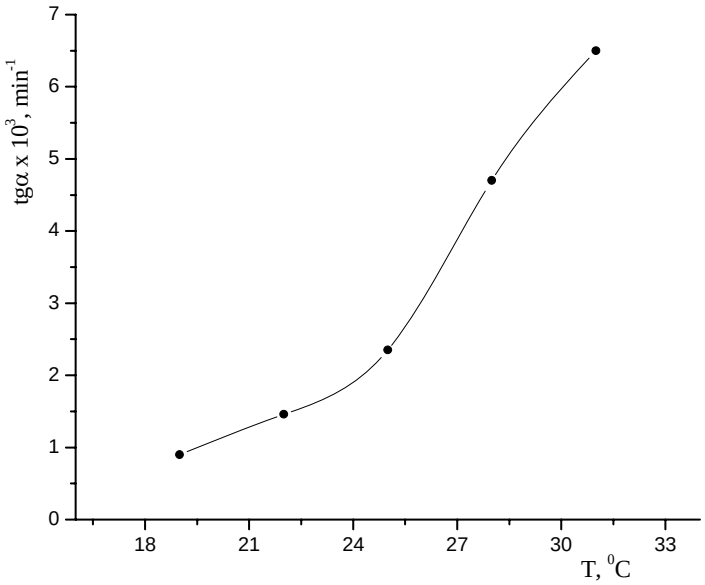
Analitički i statistički podaci za kalibracionu pravu (tabela 63) dobijeni su metodom linearne regresije u kompjuterskom programu Origin 6.1.

Tabela 63. Analitičke i statističke karakteristike kalibracione prave za određivanje diazepama

Parametri	
opseg linearnosti, μg cm^{-3}	0,28 – 3,70 n = 7
jednačina kalibracione parave	$tg\alpha \cdot 10^3 = 0{,}53509 \cdot c_{DZP} + 0{,}37589$
(nagib ± SD)·10^3	0,53509 ± 0,00828
(odsečak ± SD)·10^3	0,37589 ± 0,019
koeficijent korelacije, r	$r = 0{,}9984$
standardna devijacija fitovanja, SD·10^3	0,02499
varijansa, $(SD \cdot 10^3)^2$, $(\mu g\ cm^{-3})^2$	$6{,}2 \cdot 10^{-4}$
granica detekcije, μg cm^{-3}	0,14

4.6.2. Termodinamičke karakteristike sistema

Brzina ispitivane reakcije praćena je na 19, 22, 25, 28 i 31°C. Na osnovu dobijenih rezultata merenja dobijen je grafik zavisnosti tgα od temperature (slika 68). S obzirom na to da pri temperaturama višim od 25°C dolazi do odstupanja od linearnosti, dalja ispitivanja su vršena na temperaturi od 22°C.



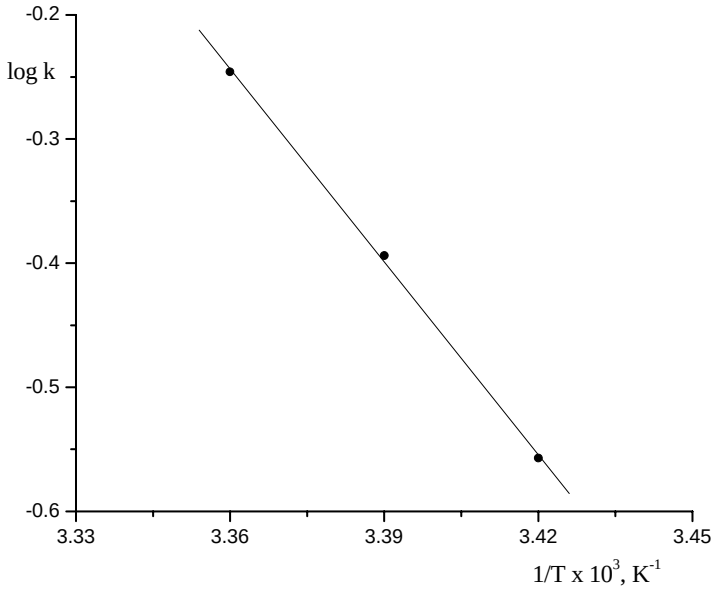
Slika 68. Zavisnost brzine reakcije od temperature. Koncentracije raktanata u rastvoru: $c_{R(NO)OH}$ *= 1,2·10*$^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, c_{NaOH} *= 1,5·10*$^{-2}$ *mol dm*$^{-3}$, $c_{Cu^{2+}}$ *= 3,2·10*$^{-5}$ *mol dm*$^{-3}$, c_{DZP} *= 7,0·10*$^{-6}$ *mol dm*$^{-3}$

Na osnovu kinetičke jednačine $brzina = k \cdot c_{NaOH} \cdot c_{DZP}$, izračunate su konstante brzine reakcije na tri različite temperature (tabela 64).

Tabela 64. Konstante brzine reakcije na različitim temperaturama

$k \cdot 10^1$ (mol dm^{-3})$^{1-n}$s^{-1}	T (K)
2,77	292
4,04	295
5,68	298

n – red reakcije



Slika 69. Zavisnost logk od 1/T

Termodinamički parametri reakcije građenja aktiviranog kompleksa određeni su pomoću prave prikazane na slici 69. Iz nagiba ove prave izračunata je energija aktivacije primenom jednačine (28).

Ostali termodinamički parametri, promena entalpije (ΔH^*), promena entropije (ΔS^*), promena slobodne energije (ΔG^*) i pK* vrednost građenja aktiviranog kompleksa, mogu se izračunati primenom jednačina (29)-(32).

Vrednosti izračunatih termodinamičkih parametara reakcije građenja aktiviranog kompleksa, primenom gore navedenih jednačina, date su u tabeli 65.

Tabela 65. Termodinamičke karakteristike građenja aktiviranog kompleksa na 295K

Sistem	**Ea* ($kJmol^{-1}$)**	**ΔH^* ($kJmol^{-1}$)**	**ΔS^* ($JK^{-1}mol^{-1}$)**	**ΔG^* ($kJmol^{-1}$)**	**pK***
R(NO)OH+NaOH+Cu(II)+DZP	99,14	96,69	75,41	74,44	13,18

Prema Hammond-u[139] i Smith-u[140], većina reakcija koje se odvijaju na sobnoj temperaturi imaju energiju aktivacije između 15-30 kcal mol^{-1} (62,76-125,52 kJ mol^{-1}). Vrednost izračunate energije aktivacije za ispitivani sistem je u skladu sa navedenim postulatom.

Takođe, pri relativno niskim temperaturama (sobna i niže temperature) proizvod temperature i entropije je manji od entalpije, $|T\Delta S| << |\Delta H|$.[141,142]

S obzirom da Gibsova slobodna energija zavisi od temperature to će i konstanta ravnoteže i položaj ravnoteže zavisiti od temperature. Polazeći od Van't Hofove reakcione izobare za reakcije u rastvoru ($d \ln K_c / dT = \Delta H / RT^2$) može se prodiskutovati uticaj temperature na položaj ravnoteže. Za endotermnu reakciju gde je $\Delta H > 0$ i $dK/dT > 0$, porast temperature povećava konstantu ravnoteže, odnosno pomera je u smeru građenja produkata.

Teorijski najmanja koncentracija koja se može odrediti ovom metodom može se izračunati prema *3,3S* kriterijumu, primenom jednačine (8)[143,144] i iznosi 0,14 μg cm^{-3}.

4.6.3. Tačnost i reproduktivnost određivanja diazepama

Tačnost i reproduktivnost metode određeni su za tri koncentracije sa kalibracione prave, pri čemu je izvedeno pet merenja za svaku koncentraciju. Statističkom obradom podataka dobijeni su rezultati koji su sumirani u tabeli 66. Kao što se može videti, relativna greška se kreće od 4,93 do 2,39 % za interval koncentracije diazepama od 0,28 do 3,70 μg cm^{-3}.

*Tabela 66. Tačnost i reproduktivnost određivanja diazepama**

Koncentracija diazepama (μg cm^{-3})		**RSD (%)**	$\frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \cdot 100$ **(%)**	**Recovery (%)**
odmereno	**nađeno** $\bar{x} \pm \overline{SD}$			
0,28	0,30 ± 0,01	4,93	7,14	107,14
1,99	1,97 ± 0,06	3,23	-1,01	98,99
3,70	3,67 ± 0,08	2,39	-0,81	99,19

*Objašnjenje veličina i odgovarajući izrazi dati su u poglavlju 4.1.3.

4.6.4. Selektivnost određivanja diazepama

Za ocenu selektivnosti određivanja diazepama predloženom metodom ispitivan je uticaj većeg broja stranih jona, aminokiselina i punioca farmaceutskih preparata na brzinu reakcije. Reakcionoj smeši pojedinačno su dodavani rastvori ispitivanih supstanci. Pri tome je menjana njihova koncentracija u odnosu na koncentraciju diazepama, sve dok nije nađena ona koncentracija koja ometa njegovo određivanje u rastvoru (tabela 67).

Tabela 67. Selektivnost određivanja diazepama pri koncentraciji 1,99 μg cm^{-3}

Jonska, molekulska vrsta	I, %	q
limunska kiselina	10 – 15	10^2
fruktoza, glukoza, laktoza, B_1, B_6, B_{12}, F^-, Si^{4+} nikotinska kiselina	5 - 10	
manitol, sorbitol, stearinska kiselina, Li^+, K^+, $C_2O_4^{2-}$	< 5	
Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}	5 – 10	10
Met, Tyr, Trp	< 5	
Phe, Asp, Lys	5 -10	1
His, Arg, Gly, Ala, Ser	usporavaju	1
Fe^{3+}	ubrzava	1

q – odnos koncentracije jona/aminokiseline/punioca i DZP
I - interferencioni koeficijent, $I = (c^{\circ}_{DZP} - c_{DZP}) / c^{\circ}_{DZP}$
c°_{DZP} i c_{DZP} – koncentracija diazepama bez i u prisustvu interferirajuće supstance (dobijena iz jednačine kalibracine prave)

Aminokiseline His, Arg, Gly, Ala, Ser ometaju određivanje diazepama pri odnosu 1:1 jer se kompleksiraju bakrom, kao i Fe^{3+} joni koji grade kompleks sa 1-nitrozo-2-naftolom.

4.6.5. Primena kinetičke metode za određivanje diazepama u farmaceutkim preparatima i humanom kontrolnom sreumu

Razrađena kinetička metoda za određivanje diazepama primenjena je za njegovo određivanje u farmaceutskim preparatima i humanom kontrolnom serumu (model sistem). Uzorci su pripremani prema postupku koji je opisan u "Eksperimentalnom delu". Kao referentna metoda korišćena je HPLC.[153] Rezultati su sumirani u tabelama 68 i 69. HPLC hromatogrami određivanja diazepama u tabletama i humanom kontrolnom serumu dati su na slici 70. Dobijeni hromatogrami standarda i uzorka pokazuju poklapanje retencionog vremena za analiziranu aktivnu komponentu - diazepam. U cilju kvantitativne analize, određena je integrisana površina za dati pik i sa kalibracionog dijagrama za date vrednosti apsorbancije izračunate su koncentracije diazepama u ispitivanim uzorcima.

Tabela 68. Tačnost i reproduktivnost određivanja diazepama u farmaceutskim preparatima

Metoda kalibracione prave ($\mu g\ cm^{-3}$)		**Referentna metoda (HPLC) ($\mu g\ cm^{-3}$)**	**n**	**RSD (%)**	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ **(%)**	**Recovery (%)**
odmereno	**nađeno** $\bar{x} \pm \overline{SD}$					
1,42*	1,39 ± 0,06	1,36 ± 0,07	5	4,09	- 2,11	97,89
2,56**	2,51 ± 0,03	2,48 ± 0,05	5	1,21	-1,95	98,05
3,13***	3,09 ± 0,04	3,06 ± 0,06	5	1,30	-1,28	98,72

**Diazepam*, mikroklizme, 2,5 cm^3/5 mg, Apoteka Beograd
***Bensedin®*, tablete, 2 mg, Galenika a.d., Beograd
****Diazepam*, tablete, 2 mg, Panfarma d.o.o., Beograd

Tabela 69. Tačnost i reproduktivnost određivanja diazepama u humanom kontrolnom serumu

Metoda kalibracione prave ($\mu g\ cm^{-3}$)		**Referentna metoda (HPLC) ($\mu g\ cm^{-3}$)**	**n**	**RSD (%)**	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ **(%)**	**Recovery (%)**
dodato	**nađeno** $\bar{x} \pm \overline{SD}$					
0,85*	0,83 ± 0,03	0,80 ± 0,02	5	3,81	- 2,35	97,65

*Humani kontrolni serum, *"Lytorol N"*, bioMérieux® sa, Francuska

Količina diazepama koja je određena kinetičkom metodom u skladu je sa referentnom metodom i deklarisanim vrednostima za diazepam u farmaceutskim preparatima.

Poređenje standardnih devijacija - F-test i srednjih vrednosti - t-test[146,147], pri 95%-tnom nivou poverenja i za dati broj stepena slobode, pokazalo je da između dve metode (kinetičke i referentne) ne postoji značajna razlika u preciznosti, $t_{eksp.} < t_{tab.}$ i $F_{eksp.} < F_{tab.}$ (tabele 70 i 71).

Tabela 70. t- i F-vrednosti dobijene primenom dve različite metode za određivanje diazepama u farmaceutskim preparatima

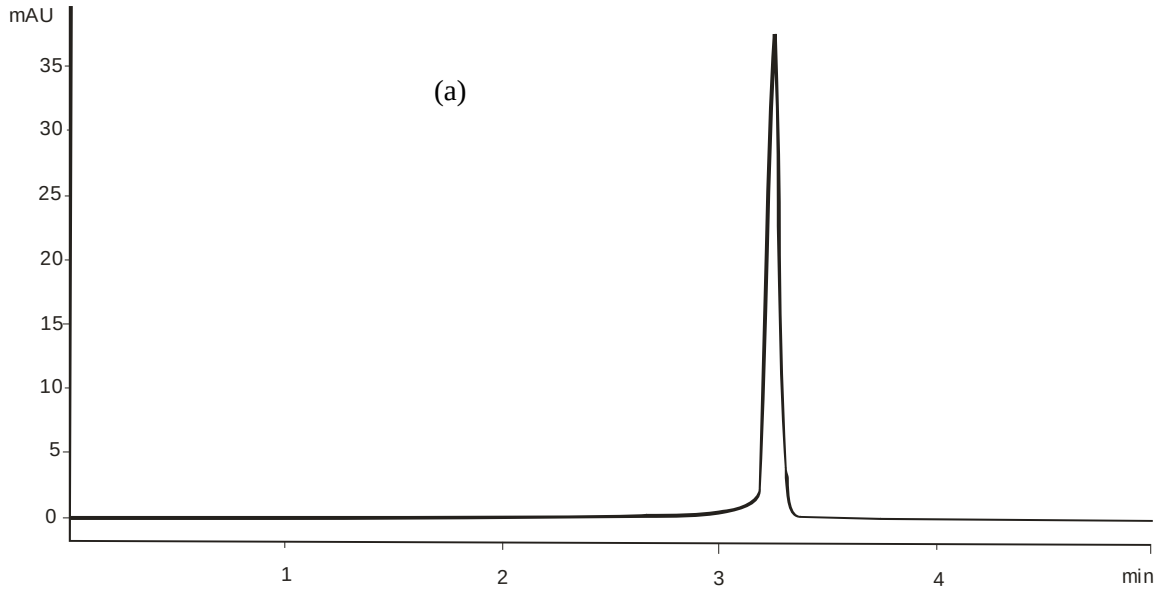
Metoda kalibracione prave ($\mu g\ cm^{-3}$)		**Referentna metoda (HPLC) ($\mu g\ cm^{-3}$)**	**t-test***	**F-test***
odmereno	**nađeno** $\bar{x} \pm \overline{SD}$			
1,42	1,39 ± 0,06	1,36 ± 0,07	0,730	1,62
2,56	2,51 ± 0,03	2,48 ± 0,05	1,129	2,81
3,13	3,09 ± 0,04	3,06 ± 0,06	0,968	2,01

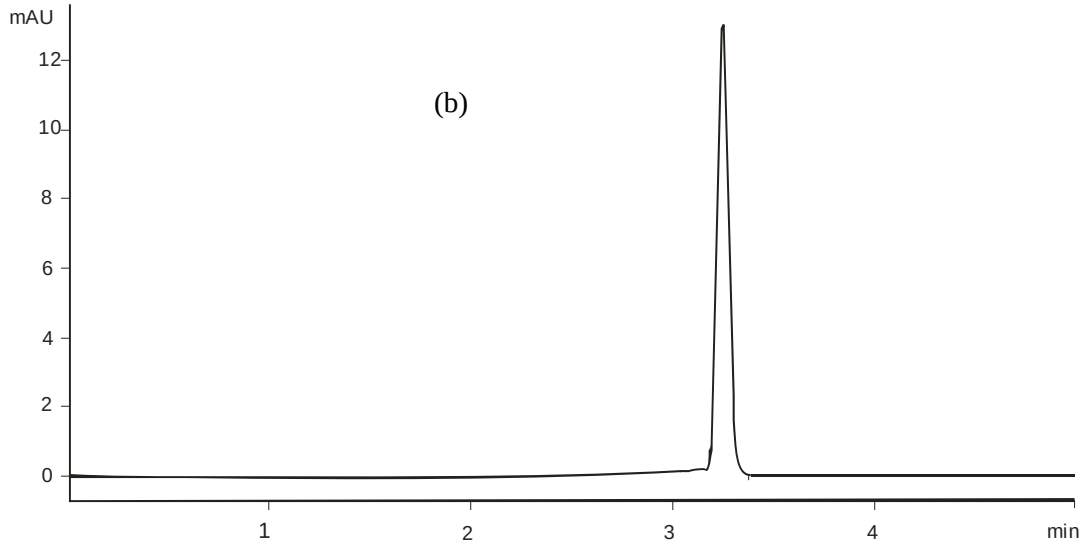
*Tablične F- ($\nu_1 = 4$, $\nu_2 = 4$) i t-vrednosti ($\nu = 8$) pri 95%-tnom nivou poverenja su 6,39 i 2,306

Tabela 71. t- i F-vrednosti dobijene primenom dve različite metode za određivanje diazepama u kontrolnom serumu

Metoda kalibracione prave (μg cm^{-3})		**Referentna metoda (HPLC) (μg cm^{-3})**	**t-test***	**F-test***
dodato	**nađeno** $\bar{x} \pm \overline{SD}$			
0,85	0,83 ± 0,03	0,80 ± 0,02	1,757	2,35

*Tablične F- ($\nu_1 = 4$, $\nu_2 = 4$) i t-vrednosti ($\nu = 8$) pri 95%-tnom nivou poverenja su 6,39 i 2,306





Slika 70. HPLC hromatogrami: (a) DZP tablete (2,56 μg cm^{-3}), (b) spajkovan serum (0,85 μg cm^{-3} DZP). Kolona: C_{18} (Zorbax, 5μm, 250 x 4,6 mm). Mobilna faza: acetonitril-voda 30:70 (V/V). Detekcija: UV 254 nm.

5. ZAKLJUČAK

U cilju određivanja mikrokoličina diklofenaka, acetilsalicilne kiseline, ibuprofena, dimenhidrinata, klonazepama i diazepama urađeno je sledeće:

1. Predložene su nove kinetičke metode za određivanje pomenutih analgetika i sedativa u rastvoru koje se zasnivaju na istiskivanju 1-nitrozo-2-naftola iz kompleksa sa metalnim jonom (kobalt/kadmijum/bakar) nakon dodatka odgovarajućeg analgetika, odnosno sedativa, tzv. "ligand-exchange" reakcija;

2. Određeni su optimalni uslovi za određivanje ispitivanih analgetika i sedativa pri kojima oni pokazuju najjače delovanje na brzinu indikatorske reakcije;

Analgetik	**Koncentracija (mol dm^{-3})**			**t (°C)**	**λ_{max} (nm)**
	1-nitrozo-2-naftol	**CH_3COOH**	**Co(II)**		
Diklofenak	$2,5\cdot10^{-5}$	4,0	$6,8\cdot10^{-5}$	22	375
Analgetik	**Koncentracija (mol dm^{-3})**			**t (°C)**	**λ_{max} (nm)**
	1-nitrozo-2-naftol	**NaOH**	**Co(II)**		
Acetilsalicilna kiselina	$1,5\cdot10^{-5}$	0,1	$3,4\cdot10^{-5}$	22	410
Analgetik	**Koncentracija (mol dm^{-3})**			**t (°C)**	**λ_{max} (nm)**
	1-nitrozo-2-naftol	**CH_3COOH $KBrO_3$**	**Co(II)**		
Ibuprofen	$1,0\cdot10^{-5}$	5,0 $2,5\cdot10^{-3}$	$3,4\cdot10^{-6}$	22	375
Sedativ	**Koncentracija (mol dm^{-3})**			**t (°C)**	**λ_{max} (nm)**
	1-nitrozo-2-naftol	**CH_3COOH**	**Cd(II)**		
Dimenhidrinat	$1,8\cdot10^{-5}$	$7,0\cdot10^{-2}$	$2,0\cdot10^{-5}$	22	425
Sedativ	**Koncentracija (mol dm^{-3})**			**t (°C)**	**λ_{max} (nm)**
	1-nitrozo-2-naftol	**NaOH**	**Co(II)**		

Klonazepam	$1,4\cdot10^{-5}$	$8,0\cdot10^{-2}$	$3,1\cdot10^{-5}$	22	425
Sedativ	**Koncentracija (mol dm^{-3})**			**t (°C)**	**λ_{max} (nm)**
	1-nitrozo-2-naftol	**NaOH**	**Cu(II)**		
Diazepam	$1,2\cdot10^{-5}$	$1,5\cdot10^{-2}$	$3,2\cdot10^{-5}$	22	425

3. Izračunata je tačnost i reproduktivnost određivanja ispitivanih analgetika i sedativa predloženim metodama;

Analgetik/Sedativ	**Interval koncentracije (μg cm^{-3})**	**RSD (%)**	**$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot100$ (%)**
Diklofenak	1,59-38,18	4,95-0,90	-2,52/-0,18
Acetilsalicilna kis.	0,72-9,00	3,63-1,14	2,78/1,22
Ibuprofen	0,21-1,44; 1,44-2,06	3,93-1,14	4,76/0,69
Dimenhidrinat	0,38-4,71	4,15-1,77	5,26/0,64
Klonazepam	0,32-4,10	3,39-1,53	3,12/-2,68
Diazepam	0,28- 3,70	4,93 -2,39	7,14/-0,81

4. Izračunata je teorijski najmanja koncentracija ispitivanih analgetika i sedativa na osnovu *3,3S kriterijuma*, koja se može odrediti datim metodama;

Analgetik/Sedativ	**LOD (μg cm^{-3})**
Diklofenak	1,29
Acetilsalicilna kiselina	0,35
Ibuprofen	0,03
Dimenhidrinat	0,10
Klonazepam	0,26
Diazepam	0,14

5. Na osnovu zavisnosti između brzine reakcije i koncentracije svakog reaktanta pojedinačno, postavljene su kinetičke jednačine za ispitivane procese;

Sistem	**Jednačina***
R(NO)OH+CH_3COOH+Co(II)+D	$brzina = \kappa \cdot c_D$
R(NO)OH+NaOH+Co(II)+ASA	$brzina = \kappa \cdot c_{ASA}$
R(NO)OH+HAc+Co(II)+$KBrO_3$+IB	$brzina = k \cdot c_{R(NO)OH} \cdot c_{KBrO_3} \cdot c_{Co^{2+}} \cdot c_{IB}$
R(NO)OH+CH_3COOH+Cd(II)+DMH	$brzina = \kappa \cdot c_{CH_3COOH} \cdot c_{DMH}$
R(NO)OH+NaOH+Co(II)+KZP	$brzina = k \cdot c_{KZP}$
R(NO)OH+NaOH+Cu(II)+DZP	$brzina = \kappa \cdot c_{NaOH} \cdot c_{DZP}$

*Kinetičke jednačine važe za sledeći opseg koncentracija:

R(NO)OH (2,0-4,0)·10^{-5} mol dm^{-3}, CH_3COOH 3,0-6,0 mol dm^{-3}, Co(II) (5,1-10,2)·10^{-5} mol dm^{-3}, **D** 1,59-38,18 μg cm^{-3}, 0,5·10^{-6}-1,2·10^{-5} mol dm^{-3}

R(NO)OH (1,25-2,00)·10^{-5} mol dm^{-3}, NaOH 0,9-1,2 mol dm^{-3}, Co(II) (2,6-5,9)·10^{-5} mol dm^{-3}, **ASA** 0,72-9,00 μg cm^{-3}, (0,4-5,0)·10^{-5} mol dm^{-3}

R(NO)OH (0,7-1,1)·10^{-5} mol dm^{-3}, CH_3COOH 4,5-6,0 mol dm^{-3}, $KBrO_3$ (1,0-3,0)·10^{-3} mol dm^{-3}, Co(II) (0,2-4,2)·10^{-6} mol dm^{-3}, **IB** 0,21-1,44; 1,44-2,06 μg cm^{-3}, (0,1-0,7)·10^{-5}; (0,7-1,0)·10^{-5} mol dm^{-3}

R(NO)OH (1,6-2,4)·10^{-5} mol dm^{-3}, CH_3COOH (1,0-7,0)·10^{-2} mol dm^{-3}, Cd(II) (1,0-4,0)·10^{-5} mol dm^{-3}, **DMH** 0,38-4,71 μg cm^{-3}, 0,8·10^{-6}-1,0·10^{-5} mol dm^{-3}

R(NO)OH (1,2-1,8)·10^{-5} mol dm^{-3}, NaOH (6,0-12,0)·10^{-2} mol dm^{-3}, Co(II) (2,4-4,4)·10^{-5} mol dm^{-3}, **KZP** 0,32-4,10 μg cm^{-3}, 0,5·10^{-6}-1,3·10^{-5} mol dm^{-3}

R(NO)OH (1,0-1,5)·10^{-5} mol dm^{-3}; NaOH (0,4-1,5)·10^{-2} mol dm^{-3}; Cu(II) (2,5-4,4)·10^{-5} mol dm^{-3}; **DZP** (0,1-1,3)·10^{-5} mol dm^{-3}

6. Na osnovu kinetičkih jednačina određene su konstante brzine reakcija na temperaturi 292, 295, 298K;

Sistem	**Konstanta brzine** $(\text{mol dm}^{-3})^{1-n}\text{s}^{-1}$	**T (K)**		
		292	**295**	**298**
R(NO)OH+CH_3COOH+Co(II)+D	$k\cdot10^{3}$	0,58	0,81	1,04
R(NO)OH+NaOH+Co(II)+ASA	$k\cdot10^{2}$	0,73	1,0	1,37
R(NO)OH+HAc+Co(II)+$KBrO_3$+IB	$k\cdot10^{11}$	0,76	1,06	1,43
R(NO)OH+CH_3COOH+Cd(II)+DMH	$k\cdot10^{3}$	4,07	6,1	8,14
R(NO)OH+NaOH+Co(II)+KZP	$k\cdot10^{2}$	0,68	0,96	1,33
R(NO)OH+NaOH+Cu(II)+DZP	$k\cdot10^{1}$	2,77	4,04	5,68

Prema izrazu (16) može se zaključiti da osetljivost raste, a detekcioni limit opada (odsečak ($k'[A]_0$) krive $-\Delta[A]/\Delta t$ = f($[C]_0$)) sa povećanjem konstante brzine.

7. Na osnovu linearne zavisnosti logaritma konstante brzine i recipročne vrednosti apsolutne temperature određena je energija aktivacije, kao i ostali termodinamički parametri reakcije građenja aktiviranog kompleksa ΔH*, ΔS*, ΔG*, pK* na 295K;

Sistem	Ea* ($kJmol^{-1}$)	ΔH* ($kJmol^{-1}$)	ΔS* ($JK^{-1}mol^{-1}$)	ΔG* ($kJmol^{-1}$)	pK*
R(NO)OH+CH_3COOH+Co(II)+D	73,31	70,86	-63,71	89,65	15,88
R(NO)OH+NaOH+Co(II)+ASA	79,81	77,36	-20,84	83,51	14,79
R(NO)OH+HAc+Co(II)+$KBrO_3$+IB	89,38	86,93	280,04	4,32	0,76
R(NO)OH+CH_3COOH+Cd(II)+DMH	92,50	90,05	17,63	84,85	15,03
R(NO)OH+NaOH+Co(II)+KZP	92,45	89,99	21,61	83,61	14,81
R(NO)OH+NaOH+Cu(II)+DZP	99,14	96,69	75,41	74,44	13,18

8. Ispitana je selektivnost predloženih metada, odnosno ispitan je uticaj većeg broja stranih jona, aminokiselina i punioca farmaceutskih proizvoda na brzinu reakcije.

Sistem	Usporavaju	Ubrzavaju
R(NO)OH+CH_3COOH+Co(II)+D	His, Arg, Lys, Ala, Asp, Gly	Fe^{3+}, Cu^{2+}
R(NO)OH+NaOH+Co(II)+ASA	His, Arg, Lys, Ser, Gly,Ca^{2+}, Zn^{2+}, Mg^{2+}	Fe^{3+}, Cu^{2+}
R(NO)OH+HAc+Co(II)+$KBrO_3$+IB	His, Arg, Lys, Gly Ca^{2+}, Zn^{2+}, Mg^{2+}	Fe^{3+}, Cu^{2+}
R(NO)OH+CH_3COOH+Cd(II)+DMH	Ca^{2+},Zn^{2+},Mg^{2+},Mn^{2+}, His,Arg,Lys, Ser, Gly	Fe^{3+}, Cu^{2+}
R(NO)OH+NaOH+Co(II)+KZP	His, Arg, Lys, Gly	Fe^{3+}, Cu^{2+}
R(NO)OH+NaOH+Cu(II)+DZP	His, Arg, Gly, Ala, Ser	Fe^{3+}

Uobičajni sastojci tabletiranih lekova (glukoza, fruktoza, laktoza, skrob, manitol, sorbitol), kao i neke od aminokiselina nemaju većeg uticaja na određivanje pomenutih analgetika i sedativa u farmaceutskim preparatima. Aminokiseline His, Arg, Lys, Gly, Ala, Ser, Asp ometaju određivanje jer se kompleksiraju sa metalnim jonima (kobalt/kadmijum/bakar), kao i joni Fe^{3+}, Cu^{2+} koji grade komplekse sa 1-nitrozo-2-

naftolom. Kako ovih jona nema u farmaceutskim preparatima u kombinaciji sa ispitivanim analgetikom, odnosno sedativom, može se smatrati da oni neće ometati njihovo određivanje. Interferirajući uticaj Fe^{3+} jona u serumu, može se uspešno otkloniti maskiranjem sa F^- jonima.

9. Metoda je primenjena za direktno određivanje ispitivanih analgetika i sedativa u farmaceutskim preparatima i humanom kontrolnom serumu. Rezultati dobijeni predloženim metodama su u skladu sa referentnim HPLC metodama.

Diklofenak

Metoda kalibracione prave (μg cm^{-3})		**Referentna metoda (HPLC) (μg cm^{-3})**	**n**	**RSD (%)**	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ **(%)**	**Recovery (%)**
odmereno	**nađeno** $\bar{x} \pm \overline{SD}$					
20,68*	20,55 ± 0,44	20,90 ± 0,49	5	2,13	-0,63	99,37
25,45**	25,36 ± 0,49	25,08 ± 0,35	5	1,94	-0,35	99,65
30,22***	30,40 ± 0,50	30,33 ± 0,76	5	1,65	0,60	100,60

**Diklofen Retard*, tablete, 100 mg, Galenika a.d., Beograd, Srbija
***Diklofen*, ampule, 3 cm^3/75 mg, Galenika a.d., Beograd, Srbija
****Diklofen Retard*, tablete, 100 mg, Panfarma d.o.o., Beograd, Srbija

Metoda kalibracione prave (μg cm^{-3})		**Referentna metoda (HPLC) (μg cm^{-3})**	**n**	**RSD (%)**	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ **(%)**	**Recovery (%)**
dodato	**nađeno** $\bar{x} \pm \overline{SD}$					
2,00*	1,96 ± 0,07	1,89 ± 0,06	5	3,77	- 2,00	98,00
3,18*	3,20 ± 0,10	3,14 ± 0,08	5	3,19	0,63	100,63

**Humani kontrolni serum, "Lytorol N"*, bioMérieux® sa, Francuska

Acetilsalicilna kiselina

Metoda kalibracione prave (μg cm^{-3})		Referentna metoda (HPLC) (μg cm^{-3})	n	RSD (%)	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ (%)	Recovery (%)
odmereno	nađeno $\bar{x} \pm \overline{SD}$					
1,80*	1,76 ± 0,09	1,72 ± 0,07	5	4,87	-2,22	97,78
4,50**	4,58 ± 0,11	4,54 ± 0,09	5	2,41	1,77	101,77
6,31***	6,27 ± 0,16	6,23 ± 0,14	5	2,62	-0,63	99,37

**Aspirin®*, tablete, 100 mg, Bayer d.o.o., Beograd, Srbija
***Cardiopirin®*, tablete, 100 mg, Pharmaswiss d.o.o., Beograd, Srbija
****Andol®*, tablete, 100 mg, Pliva Hrvatska d.o.o., Zagreb, Hrvatska

Metoda kalibracione prave (μg cm^{-3})		Referentna metoda (HPLC) (μg cm^{-3})	n	RSD (%)	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ (%)	Recovery (%)
dodato	nađeno $\bar{x} \pm \overline{SD}$					
7,20*	7,08 ± 0,24	7,11 ± 0,35	5	3,38	-1,67	98,33
9,00*	8,93 ± 0,29	8,90 ± 0,40	5	3,23	0,78	99,22

***Humani kontrolni serum, *"Lytorol N"*, bioMérieux® sa, Francuska

Ibuprofen

Metoda kalibracione prave ($\mu g\ cm^{-3}$)		Referentna metoda (HPLC) ($\mu g\ cm^{-3}$)	n	RSD (%)	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ (%)	Recovery (%)
odmereno	nađeno $\bar{x} \pm \overline{SD}$					
0,83*	0,82 ± 0,02	0,84 ± 0,03	5	3,16	-1,20	98,80
1,03**	1,02 ± 0,03	1,01 ± 0,02	5	2,50	-0,97	99,03
1,44***	1,42 ± 0,02	1,41 ± 0,01	5	1,32	-1,39	98,61

**Ibuprofen*, tablete, 400 mg, Galenika a.d., Beograd, Srbija
***Ibuprofen*, tablete, 200 mg, Panfarma, Beograd, Srbija
****Ibuprofen*, krema, 20g, 1g/100mg, Galenika a.d., Beograd, Srbija

Metoda kalibracione prave ($\mu g\ cm^{-3}$)		Referentna metoda (HPLC) ($\mu g\ cm^{-3}$)	n	RSD (%)	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ (%)	Recovery (%)
dodato	nađeno $\bar{x} \pm \overline{SD}$					
0,31*	0,32 ± 0,01	0,33 ± 0,02	5	3,92	3,23	103,23
0,52*	0,53 ± 0,02	0,54 ± 0,01	5	3,78	1,92	101,92

***Humani kontrolni serum, *"Lytorol N"*, bioMérieux® sa, Francuska

Dimenhidrinat

Metoda kalibracione prave ($\mu g\ cm^{-3}$)		Referentna metoda (HPLC) ($\mu g\ cm^{-3}$)	n	RSD (%)	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ (%)	Recovery (%)
odmereno	nađeno $\bar{x} \pm \overline{SD}$					
1,88*	1,83 ± 0,04	1,81 ± 0,03	5	1,95	-2,66	97,34
3,76**	3,72 ± 0,03	3,70 ± 0,02	5	0,80	-1,06	98,94

**Dimigal*, tablete, 50 mg, Galenika, a.d., Beograd, Srbija
***Dramina*, tablete, 50 mg, Galenski laboratorij d.d., Rijeka, Hrvatska

Metoda kalibracione prave ($\mu g\ cm^{-3}$)		Referentna metoda (HPLC) ($\mu g\ cm^{-3}$)	n	RSD (%)	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ (%)	Recovery (%)
dodato	nađeno $\bar{x} \pm \overline{SD}$					
0,94*	0,89 ± 0,03	0,87 ± 0,02	5	3,73	-5,32	94,68

*Humani kontrolni serum, *"Lytorol N"*, bioMérieux® sa, Francuska

Klonazepam

Metoda kalibracione prave ($\mu g\ cm^{-3}$)		Referentna metoda (HPLC) ($\mu g\ cm^{-3}$)	n	RSD (%)	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ (%)	Recovery (%)
odmereno	nađeno $\bar{x} \pm \overline{SD}$					
2,84*	2,81 ± 0,04	2,78 ± 0,03	5	1,56	-1,06	98,94
3,47**	3,44 ± 0,05	3,41 ± 0,04	5	1,44	-0,87	99,13

**Rivotril*, tablete, 2 mg, Galenika a.d., Beograd, Srbija
***Rivotril*, tablete, 2 mg, La Roche, Švajcarska

Metoda kalibracione prave ($\mu g\ cm^{-3}$)		Referentna metoda (HPLC) ($\mu g\ cm^{-3}$)	n	RSD (%)	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ (%)	Recovery (%)
dodato	nađeno $\bar{x} \pm \overline{SD}$					
0,32*	0,30 ± 0,02	0,28 ± 0,01	5	4,88	-6,25	93,75
0,95*	0,92 ± 0,03	0,91 ± 0,02	5	2,34	-3,16	96,84

*Humani kontrolni serum, *"Lytorol N"*, bioMérieux® sa, Francuska

Diazepam

Metoda kalibracione prave ($\mu g\ cm^{-3}$)		Referentna metoda (HPLC) ($\mu g\ cm^{-3}$)	n	RSD (%)	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ (%)	Recovery (%)
odmereno	nađeno $\bar{x} \pm \overline{SD}$					
1,42*	1,39 ± 0,06	1,36 ± 0,07	5	4,09	- 2,11	97,89
2,56**	2,51 ± 0,03	2,48 ± 0,05	5	1,21	-1,95	98,05
3,13***	3,09 ± 0,04	3,06 ± 0,06	5	1,30	-1,28	98,72

*_Diazepam_, mikroklizme, 2,5 cm^3/5 mg, Apoteka Beograd, Srbija
**_Bensedin_®, tablete, 2 mg, Galenika a.d., Beograd, Srbija
***_Diazepam_, tablete, 2 mg, Panfarma d.o.o., Beograd, Srbija

Metoda kalibracione prave ($\mu g\ cm^{-3}$)		Referentna metoda (HPLC) ($\mu g\ cm^{-3}$)	n	RSD (%)	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ (%)	Recovery (%)
dodato	nađeno $\bar{x} \pm \overline{SD}$					
0,85*	0,83 ± 0,03	0,80 ± 0,02	5	3,81	- 2,35	97,65

*Humani kontrolni serum, *"Lytorol N"*, bioMérieux® sa, Francuska

10. Poređenje standardnih devijacija - F-test i srednjih vrednosti - t-test pri 95%-tnom nivou poverenja i za dati broj stepena slobode, pokazalo je da između dve metode (kinetičke i referentne) ne postoji značajna razlika u preciznosti, $t_{eksp} < t_{tab}$ i $F_{eksp} < F_{tab}$

6. SUMMARY

To refer to develop the new methods for the determination of microquantities of diclofenac, acetylsalicylic acid, ibuprofen, dimenydrinate, clonazepam and diazepam, it had done next:

1. The new kinetic methods for the determination of micro quantitities of mentioned analgesics and sedatives were described. The methods are based on "ligand-exchange" reactions. Actually analgesic/sedative displace metal ion (cobalt/copper/cadmium) from the complex with 1-nitroso-2-naphthol;

2. Optimal conditions for the determination investigated analgesics and sedatives were determined;

Analgesic	**Concentration (mol dm^{-3})**			**t (°C)**	**λ_{max} (nm)**
	1-nitroso-2-naphthol	**CH_3COOH**	**Co(II)**		
Diclofenac	$2.5\cdot10^{-5}$	4.0	$6.8\cdot10^{-5}$	22	375
Analgesic	**Concentration (mol dm^{-3})**			**t (°C)**	**λ_{max} (nm)**
	1-nitroso-2-naphthol	**NaOH**	**Co(II)**		
Acetylsalicylic acid	$1.5\cdot10^{-5}$	0.1	$3.4\cdot10^{-5}$	22	410
Analgesic	**Concentration (mol dm^{-3})**			**t (°C)**	**λ_{max} (nm)**
	1-nitroso-2-naphthol	**CH_3COOH $KBrO_3$**	**Co(II)**		
Ibuprofen	$1.0\cdot10^{-5}$	5.0 $2.5\cdot10^{-3}$	$3.4\cdot10^{-6}$	22	375
Sedative	**Concentration (mol dm^{-3})**			**t (°C)**	**λ_{max} (nm)**
	1-nitroso-2-naphthol	**CH_3COOH**	**Cd(II)**		
Dimenhydrinate	$1.8\cdot10^{-5}$	$7.0\cdot10^{-2}$	$2.0\cdot10^{-5}$	22	425

Sedative	Concentration (mol dm^{-3})			t (°C)	λ_{max} (nm)
	1-nitroso-2-naphthol	NaOH	Co(II)		
Clonazepam	$1.4 \cdot 10^{-5}$	$8.0 \cdot 10^{-2}$	$3.05 \cdot 10^{-5}$	22	425
Sedative	Concentration (mol dm^{-3})			t (°C)	λ_{max} (nm)
	1-nitroso-2-naphthol	NaOH	Cu(II)		
Diazepam	$1.2 \cdot 10^{-5}$	$1.5 \cdot 10^{-2}$	$3.15 \cdot 10^{-5}$	22	425

3. The accuracy and precision of the developed methods was calculated;

Analgesic/Sedative	Concentration range (μg cm^{-3})	RSD (%)	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu} \cdot 100$ (%)
Diclofenak	1.59-38.18	4.95-0.90	-2.52/-0.18
Acetylsalicylic acid	0.72-9.00	3.63-1.14	2.78/1.22
Ibuprofen	0.21-1.44; 1.44-2.06	3.93-1.14	4.76/0.69
Dimenhydrinate	0.38-4.71	4.15-1.77	5.26/0.64
Clonazepam	0.32-4.1	3.39-1.53	3.12/-2.68
Diazepam	0.28- 3.70	4.93 -2.39	7.14/-0.81

4. The minimum concentrations of investigated analgesics and sedatives which can be determined by developed methods were calculated based on *3.3S criterion*;

Analgesic/Sedative	LOD (μg cm^{-3})
Diclofenak	1.29
Acetylsalicylic acid	0.35
Ibuprofen	0.03

Dimenhydrinate	0.10
Clonazepam	0.26
Diazepam	0.14

5. On the basis of the dependence of the rate of reactions on the concentration of each of the reactants, the kinetic equations for the the investigated processes were determined;

System	Equation*
R(NO)OH+CH_3COOH+Co(II)+D	$rate = \kappa \cdot c_D$
R(NO)OH+NaOH+Co(II)+ASA	$rate = \kappa \cdot c_{ASA}$
R(NO)OH+HAc+Co(II)+$KBrO_3$+IB	$rate = k \cdot c_{R(NO)OH} \cdot c_{KBrO_3} \cdot c_{Co^{2+}} \cdot c_{IB}$
R(NO)OH+CH_3COOH+Cd(II)+DMH	$rate = \kappa \cdot c_{CH_3COOH} \cdot c_{DMH}$
R(NO)OH+NaOH+Co(II)+KZP	$rate = k \cdot c_{KZP}$
R(NO)OH+NaOH+Cu(II)+DZP	$rate = \kappa \cdot c_{NaOH} \cdot c_{DZP}$

*The equations are valid for the following concentration range:

R(NO)OH (2.0-4.0)·10^{-5} mol dm^{-3}, CH_3COOH 3.0-6.0 mol dm^{-3}, Co(II) (5.1-10.2)·10^{-5} mol dm^{-3}, **D** 1.59-38.18 μg cm^{-3}, 0.5·10^{-6}-1.2·10^{-5} mol dm^{-3}

R(NO)OH (1.25-2.00)·10^{-5} mol dm^{-3}, NaOH 0.9-1.2 mol dm^{-3}, Co(II) (2.6-5.9)·10^{-5} mol dm^{-3}, **ASA** 0.72-9.00 μg cm^{-3}, (0.4-5.0)·10^{-5} mol dm^{-3}

R(NO)OH (0.7-1.1)·10^{-5} mol dm^{-3}, CH_3COOH 4.5-6.0 mol dm^{-3}, $KBrO_3$ (1.0-3.0)·10^{-3} mol dm^{-3}, Co(II) (0.2-4.2)·10^{-6} mol dm^{-3}, **IB** 0.21-1.44; 1.44-2.06 μg cm^{-3}, (0.1-0.7)·10^{-5}; (0.7-1.0)·10^{-5} mol dm^{-3}

R(NO)OH (1.6-2.4)·10^{-5} mol dm^{-3}, CH_3COOH (1.0-7.0)·10^{-2} mol dm^{-3}, Cd(II) (1.0-4.0)·10^{-5} mol dm^{-3}, **DMH** 0.38-4.71 μg cm^{-3}, 0.8·10^{-6}-1.0·10^{-5} mol dm^{-3}

R(NO)OH (1.2-1.8)·10^{-5} mol dm^{-3}, NaOH (6.0-12.0)·10^{-2} mol dm^{-3}, Co(II) (2.4-4.4)·10^{-5} mol dm^{-3}, **KZP** 0.32-4.10 µg cm^{-3}, 0.5·10^{-6}-1.3·10^{-5} mol dm^{-3}

R(NO)OH (1.0-1.5)·10^{-5} mol dm^{-3}; NaOH (0.4-1.5)·10^{-2} mol dm^{-3}; Cu(II) (2.5-4.4)·10^{-5} mol dm^{-3}; **DZP** (0.1-1.3)·10^{-5} mol dm^{-3}

6. On the basis of the kinetic equations, the rate constants for the investigated reactions at 292, 295, 298K were calculated;

System	**The rate constant** $(mol\ dm^{-3})^{1-n}s^{-1}$	**T (K)**		
		292	**295**	**298**
R(NO)OH+CH_3COOH+Co(II)+D	k·10^3	0.58	0.81	1.04
R(NO)OH+NaOH+Co(II)+ASA	k·10^2	0.73	1.0	1.37
R(NO)OH+HAc+Co(II)+$KBrO_3$+IB	k·10^{11}	0.76	1.06	1.43
R(NO)OH+CH_3COOH+Cd(II)+DMH	k·10^3	4.07	6.1	8.14
R(NO)OH+NaOH+Co(II)+KZP	k·10^2	0.68	0.96	1.33
R(NO)OH+NaOH+Cu(II)+DZP	k·10^1	2.77	4.04	5.68

According to the equation (16), the sensitivity increases and the detection limit decreases (the intercept ($k'[A]_0$) of the plot of $-\Delta[A]/\Delta t$ vs. $[C]_0$) with increasing rate constants.

7. A linear relationship between the logarithm of the rate constants and reciprocal of the temperature for the investigated reactions was found. Thermodinamics parameters ΔH*, ΔS*, ΔG* and pK* value for activated complex at 295K were calculated;

System	Ea* ($kJmol^{-1}$)	ΔH* ($kJmol^{-1}$)	ΔS* ($JK^{-1}mol^{-1}$)	ΔG* ($kJmol^{-1}$)	pK*
R(NO)OH+CH_3COOH+Co(II)+D	73.31	70.86	-63.71	89.65	15.88
R(NO)OH+NaOH+Co(II)+ASA	79.81	77.36	-20.84	83.51	14.79
R(NO)OH+HAc+Co(II)+$KBrO_3$+IB	89.38	86.93	280.04	4.32	0.76
R(NO)OH+CH_3COOH+Cd(II)+DMH	92.50	90.05	17.63	84.85	15.03
R(NO)OH+NaOH+Co(II)+KZP	92.45	89.99	21.61	83.61	14.81
R(NO)OH+NaOH+Cu(II)+DZP	99.14	96.69	75.41	74.44	13.18

According to Hammond[139] and Smith[140], most reactions which have observable rates at ordinary temperatures have activation energies of 15-30 kcal mol^{-1} (62.76-125.52 kJ mol^{-1}). The valued of activation energies calculated for the reactions investigated are in accordance with this postulate.

Also, at low temperature (room temperature and lower than it), occurrence in real systems provides $|T\Delta S| << |\Delta H|$. In this case can be written $\Delta G \approx \Delta H$.[141,142]

8. To assess the selectivity of the developed methods, the interference of those species accompanying investigated analgesics and sedatives in pharmaceuticals was studied;

System	Decrease slope of the calibration curve	Increase slope of the calibration curve
R(NO)OH+CH_3COOH+Co(II)+D	His, Arg, Lys, Ala, Asp, Gly	Fe^{3+}, Cu^{2+}
R(NO)OH+NaOH+Co(II)+ASA	His, Arg, Lys, Ser, Gly,Ca^{2+}, Zn^{2+}, Mg^{2+}	Fe^{3+}, Cu^{2+}
R(NO)OH+HAc+Co(II)+$KBrO_3$+IB	His, Arg, Lys, Gly Ca^{2+}, Zn^{2+}, Mg^{2+}	Fe^{3+}, Cu^{2+}
R(NO)OH+CH_3COOH+Cd(II)+DMH	Ca^{2+},Zn^{2+},Mg^{2+}, His,Arg,Lys, Ser,Gly	Fe^{3+}, Cu^{2+}

R(NO)OH+NaOH+Co(II)+KZP	His, Arg, Lys, Gly	Fe^{3+}, Cu^{2+}
R(NO)OH+NaOH+Cu(II)+DZP	His, Arg, Gly, Ala, Ser	Fe^{3+}

As can be seen, the usual ingredients of powdery drugs (fructose, glucose, lactose, mannitol, sorbitol) and some of the vitamins B_1, B_6, B_{12}, and ions Li^+, K^+, F^-, $C_2O_4^{2-}$ will not interfere with the methods, because the amounts tolerated are much higher than those usually present in pharamceuticals. Binder such as gelatin and filler such as talc are insoluble in ethanol which was used for dissolving pharmaceutical preparations. Silicon dioxide is also insoluble in ethanol. It also should be noted that a higher tolerance level exists for the presence of the some amino acids. Amino acids (His, Arg, Lys, Gly) and ions Ca^{2+}, Zn^{2+}, Mg^{2+} interfere with the methods. More severe intrference was observed for Fe^{3+} (masked with F^- ions) and Cu^{2+} ions.

9. The developed methods were applied to the determination of investigated analgesics and sedatives in pharmaceuticals and human control serum. The results obtained for developed methods are in accordance with the official HPLC methods.

Diclofenac

Method of the calibration curve (μg cm^{-3})		**Official method (HPLC) (μg cm^{-3})**	**n**	**RSD (%)**	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ **(%)**	**Recovery (%)**
taken	**found** $\bar{x} \pm \overline{SD}$					
20.68*	20.55 ± 0.44	20.90 ± 0.49	5	2.13	-0.63	99.37
25.45**	25.36 ± 0.49	25.08 ± 0.35	5	1.94	-0.35	99.65
30.22***	30.40 ± 0.50	30.33 ± 0.76	5	1.65	0.60	100.60

**Diklofen Retard*, tablets, 100 mg, Galenika a.d., Belgrade, Serbia
***Diklofen*, ampoules, 3 cm^3/75 mg, Galenika a.d., Belgrade, Serbia
****Diklofen Retard*, tablets, 100 mg, Panfarma d.o.o., Belgrade, Serbia

Method of the calibration curve (μg cm^{-3})		Official method (HPLC) (μg cm^{-3})	n	RSD (%)	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ (%)	Recovery (%)
added	found $\bar{x} \pm \overline{SD}$					
2.00*	1.96 ± 0.07	1.89 ± 0.06	5	3.77	- 2.00	98.00
3.18*	3.20 ± 0.10	3.14 ± 0.08	5	3.19	0.63	100.63

*Human control serum, *"Lytorol N"*, bioMérieux® sa, France

Acetylsalicylic acid

Method of the calibration curve (μg cm^{-3})		Official method (HPLC) (μg cm^{-3})	n	RSD (%)	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ (%)	Recovery (%)
taken	found $\bar{x} \pm \overline{SD}$					
1.80*	1.76 ± 0.09	1.72 ± 0.07	5	4.87	-2.22	97.78
4.50**	4.58 ± 0.11	4.54 ± 0.09	5	2.41	1.77	101.77
6.31***	6.27 ± 0.16	6.23 ± 0.14	5	2.62	-0.63	99.37

**Aspirin*®, tablets, 100 mg, Bayer d.o.o., Belgrade, Serbia
***Cardiopirin*®, tablets, 100 mg, Pharmaswiss d.o.o., Belgrade, Serbia
****Andol*®, tablets, 100 mg, Pliva Hrvatska d.o.o., Zagreb, Croatia

Method of the calibration curve (μg cm^{-3})		Official method (HPLC) (μg cm^{-3})	n	RSD (%)	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ (%)	Recovery (%)
added	found $\bar{x} \pm \overline{SD}$					
7.20*	7.08 ± 0.24	7.11 ± 0.35	5	3.38	-1.67	98.33
9.00*	8.93 ± 0.29	8.90 ± 0.40	5	3.23	0.78	99.22

*Human control serum, *"Lytorol N"*, bioMérieux® sa, France

Ibuprofen

Method of the calibration curve (μg cm^{-3})		Official method (HPLC) (μg cm^{-3})	n	RSD (%)	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ (%)	Recovery (%)
taken	found $\bar{x} \pm \overline{SD}$					
0.83*	0.82 ± 0.02	0.84 ± 0.03	5	3.16	-1.20	98.80
1.03**	1.02 ± 0.03	1.01 ± 0.02	5	2.50	-0.97	99.03
1.44***	1.42 ± 0.02	1.41 ± 0.01	5	1.32	-1.39	98.61

**Ibuprofen*, tablets, 400 mg, Galenika a.d., Belgrade, Serbia
***Ibuprofen*, tablets, 200 mg, Panfarma, Belgrade, Serbia
****Ibuprofen*, cream, 20g, 1g/100mg, Galenika a.d., Belgrade, Serbia

Method of the calibration curve ($\mu g\ cm^{-3}$)		Official method (HPLC) ($\mu g\ cm^{-3}$)	n	RSD (%)	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ (%)	Recovery (%)
added	found $\bar{x} \pm \overline{SD}$					
0.31*	0.32 ± 0.01	0.33 ± 0.02	5	3.92	3.23	103.23
0.52*	0.53 ± 0.02	0.54 ± 0.01	5	3.78	1.92	101.92

*Human control serum, *"Lytorol N"*, bioMérieux® sa, France

Dimenhydrinate

Method of the calibration curve ($\mu g\ cm^{-3}$)		Official method (HPLC) ($\mu g\ cm^{-3}$)	n	RSD (%)	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ (%)	Recovery (%)
taken	found $\bar{x} \pm \overline{SD}$					
1.88*	1.83 ± 0.04	1.81 ± 0.03	5	1.95	-2.66	97.34
3.76**	3.72 ± 0.03	3.70 ± 0.02	5	0.80	-1.06	98.94

**Dimigal*, tablets, 50 mg, Galenika, a.d., Beograd, Serbia
***Dramina*, tablets, 50 mg, Galenski laboratorij d.d., Rijeka, Croatia

Method of the calibration curve ($\mu g\ cm^{-3}$)		Official method (HPLC) ($\mu g\ cm^{-3}$)	n	RSD (%)	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ (%)	Recovery (%)
added	found $\bar{x} \pm \overline{SD}$					
0.94*	0.89 ± 0.03	0.87 ± 0.02	5	3.73	-5.32	94.68

*Human control serum, *"Lytorol N"*, bioMérieux® sa, France

Clonazepam

Method of the calibration curve (μg cm^{-3})		Official method (HPLC) (μg cm^{-3})	n	RSD (%)	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ (%)	Recovery (%)
taken	found $\bar{x} \pm \overline{SD}$					
2.84*	2.81 ± 0.04	2.78 ± 0.03	5	1.56	-1.06	98.94
3.47**	3.44 ± 0,05	3.41 ± 0.04	5	1.44	-0.87	99.13

**Rivotril*, tablets, 2 mg, Galenika a.d., Belgrade, Serbia
***Rivotril*, tablets, 2 mg, La Roche, Switzerland

Method of the calibration curve (μg cm^{-3})		Official method (HPLC) (μg cm^{-3})	n	RSD (%)	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ (%)	Recovery (%)
added	found $\bar{x} \pm \overline{SD}$					
0.32*	0.30 ± 0.02	0.28 ± 0.01	5	4.88	-6.25	93.75
0.95*	0.92 ± 0.03	0.91 ± 0.02	5	2.34	-3.16	96.84

**Human control serum, "Lytorol N"*, bioMérieux® sa, France

Diazepam

Method of the calibration curve (μg cm^{-3})		Official method (HPLC) (μg cm^{-3})	n	RSD (%)	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ (%)	Recovery (%)
taken	found $\bar{x} \pm \overline{SD}$					
1.42*	1.39 ± 0.06	1.36 ± 0.07	5	4.09	- 2.11	97.89
2.56**	2.51 ± 0.03	2.48 ± 0.05	5	1.21	-1.95	98.05
3.13***	3.09 ± 0.04	3.06 ± 0.06	5	1.30	-1.28	98.72

**Diazepam*, microclizm, 2.5 cm^3/5 mg, Pharmacy Belgrade, Serbia
***Bensedin*®, tablets, 2 mg, Galenika a.d., Belgrade, Serbia
****Diazepam*, tablets, 2 mg, Panfarma d.o.o., Belgrade, Serbia

Method of the calibration curve (μg cm^{-3})		Official method (HPLC) (μg cm^{-3})	n	RSD (%)	$\frac{\bar{x}-\mu}{\mu}\cdot 100$ (%)	Recovery (%)
added	found $\bar{x} \pm \overline{SD}$					
0.85*	0.83 ± 0.03	0.80 ± 0.02	5	3.81	- 2.35	97.65

***Human control serum, *"Lytorol N"*, bioMérieux® sa, France

10. The results of the proposed methods were statistically compared with those of the official methods using a point hypothesis test. The results show that the calculated F- and t- values at 95 % confidence level are less than the theoretical ones ($t_{exp} < t_{tab}$ and $F_{exp} < F_{tab}$), confirming no significant differences between the performance of the proposed and the official methods.

7. LITERATURA

1. J. N. Delgado and W. A. Remers, *Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*, Lippircott Williams and Wilkins, 1998
2. Dr Dragutin Tomić, *Farmakoterapija*, Priručnik za liječnike, stomatologe i farmaceute, Medicinska knjiga , Zagreb,1989.
3. Milenko Milošević, Vladislav Varagić, *Farmakologija* za II razred medicinske škole, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd, 2006.
4. Milena Pokrajac, Dragoljub Pantić, *Farmaceutska hemija I i II* za III i IV razred medicinske škole, Zavod za udžbenike, Beograd, 2007.
5. "British Pharmacopoeia 98/34/EEC", The Stationery Office, London, 2005
6. "United States Pharmacopoeia, USP-27/NF-22", Authority of the United States Pharmacopeia Convention, Rockville, 2004
7. M. Tubino and R. L. de Souza, *J. AOAC Int.*, 2005, 88, 1684-1687
8. A. K. Shakya, G. K. Joshi, P. Mishra, *Indian J. Pharm. Sci.*, 1992, 54, 44-46
9. R. L. de Souza and M. Tubino, *J. Braz. Chem. Soc*., 2005, 16, 1068-1073
10. A. A. Matin, M. A. Farajzadeh, A. Jouyban, *IL Farmaco*, 2005, 60, 855-858
11. J. A. Arancibia and G. M. Escander, *The Analyst*, 1999, 124, 1833-1838
12. P. C. Damiani, M. Bearzotti, M. A. Cabezon, A. C. Olivieri, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1999, 20, 587-590
13. A. M. Pimenta, A. N. Araujo, M. C. B. S. M. Montenegro, *Anal. Chim. Acta*, 2002, 470, 185-194
14. M. A. Castillo and L. Bruzzone, Anal. Sci., 2006, 22, 431-433
15. M. L. F. de Cordova, P. O. Barrales, A. M. Diaz, *Anal. Chim. Acta*, 1998, 369, 263-268
16. P. Ortega-Barrales, A. Ruiz-Medina, M. L. Fernandez-de Cordova and A. Molina-Diaz, *Anal. Sci*., 1999, 15, 985-987
17. Q. Dong, W. Jin, *Electrophoresis*, 2001, 22, 2786–2792
18. A. Macià, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull, *Electrophoresis*, 2004, 25, 428–436
19. A. Zinellu, C. Carru, S. Sotgia, E. Porqueddu, P. Enrico, L. Deiana, *Europ. J. Pharm. Sci.*, 2005, 24, 375–380
20. Y. Ding, C. D. Garcia, *Electroanalysis*, 2006, 18, 2202–2209
21. M. Tubino, R. L. de Souza, *Talanta*, 2006, 68, 776-780
22. V. Asfak, D. Mrinalini, B. Leena, G. Rahul, *Chromatographia*, 2007, 66, 941–943
23. A. Stafiej, K. Pyrzynska, F. Regan, *J. Sep. Sci*., 2007, 30, 985 – 991
24. R. Bhushan, D. Gupta and A. Mukherjee, *Biomed. Chromatogr*., 2007, 21,1284–1290
25. A. Goyal, S. R. Jain, *Acta Pharm. Sci.*, 2007, 49, 147-151.
26. M. Pedrouzo, S. Reverte, F. Borrull, E. Pocurull, R. M. Marce, *J. Sep. Sci.*, 2007, 30, 297–303
27. A. Panusa, G. Multari, G. Incarnato, L. Gagliardi, *J. Pharm. Biomed. Anal*., 2007, 43, 1221–1227
28. B. W. Glombitza and P. C. Schmidt, *J. Pharm. Sci.*, 1994, 83, 751-757
29. Y. Kokot, K. Burda, *J. Pharm. Biomed. Anal*., 1998, 18, 871-875
30. M. M. Sena and R. J. Poppi, *J. Pharm. Biomed. Anal*., 2004, 34, 27-34
31. K. W. Street Jr, G. H. Schenk, *J. Pharm. Sci.*, 1981, 70, 641-646
32. A. V. Pereira, C. Ancieto and O. Fatibello-Filho, *The Analyst*, 1998, 123, 1011-1015
33. M. M. Karim, C. W. Jeon, H. S. Lee, S. M. Alam, S. H. Lee, J. H. Choi, S. O. Jin and A. K. Das, *J. Fluoresc*., 2006, 16, 713-721
34. R. Szostak and S. Mazaurek, *The Analyst*, 2002, 127, 144-148
35. S. Zaugg, X. Zhang, J. Sweedler, W. Thormann, *J. Chromatogr. B*, 2001, 752, 17-31

36. R. Sandulescu, R. Oprean, S. Mirel, P. Suciu, F. Hadadea, S. Lotrean, *Eur. J. Pharmacol.*, 1998, 6, S44
37. L. Rover Jr, C. A. B. Garcia, G. de Oliviera Neto, L. T. Kubota, F. Galembeck, *Anal. Chim. Acta*., 1998, 366, 103-109
38. L. T. Kubota, J. C. B. Fernandes, L. Rover Jr, G. de Oliviera Neto, *Talanta*, 1999, 50, 661-667
39. F. A. A. Matias, M. M. D. C. Vila and M. Tubino, *J. Braz. Chem. Soc*., 2004, 15, 327-330
40. Gillian P. McMahon and M. T. Kelly, *Anal. Chem*., 1998, 70, 409-414
41. P. Kuban, E. M. Abad-Villar, P. C. Hauser, *J. Chromatogr. A*, 2006, 1107, 159–164
42. M. L. Altun, T. Ceyhan, M. Kartal, T. Atay, N. Ozdemir, S. Cevheroglu, *J. Pharm. Biomed. Anal*. 2001, 25, 93-101
43. H. Ibrahim, A. Boyer, J. Bouajila, F. Couderec, F. Nepveu, *J. Chromatogr. B* 2007, 857, 59-66
44. M. Carini, G. Aldini, M. Orioli, R. M. Facino, *J. Pharm. Biomed. Anal*. 2002, 29, 1061-1071
45. S. K. Bae, K. A. Seo, E. J. Jung, H. S. Kim, C. W. Yeo, J. H. Shon, K. M. Park, K. H. Liu, J. G. Shin, *Biomed. Chromatogr.* 2008, 22, 590-595
46. A. K. Sanyal and D. Laha, *J. AOAC Int*., 1994, 77, 1108-1111
47. N. A. El Ragehy, M. Abdelkawy and A. El Bayoumy, *Anal. Lett.*, 1994, 27, 2127-2139
48. I. Singhvi and S. C. Chaturvedi, *Asian J. Chem.*, 1998, 10, 879-884
49. I. M. Palabiyik, E. Dinc, F. Onur, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2004, 34, 473-483
50. M. M. Sena, C. B. Freitas, L. C. Silva, C. N. Perez, Y. O. de Paula, *Quim. Nova*, 2007, 30, 75-79
51. P. C. Damiani, M. Bearzotti, M. A. Cabezon, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2001, 25, 679-683
52. L. A. Hergert, G. M. Escandar, *Talanta*, 2003, 60, 235-246
53. A. G. Lista, M. E. Palomeque, B. S. F. Band, *J. Braz. Chem. Soc*., 2006, 17, 1428-1431
54. M. Medenica, D. Ivanovic, *Arzneim.-Forsch. (Drug Research)*, 1998, 48, 73-76
55. S. S. M. Hassan, W. H. Mahmoud, M. S. Abdel-Samad, *Microchim. Acta*, 1998, 129, 251-257
56. J. Lenik, B. Marczewska, C. Wardak, *Desalination*, 2004, 163, 77-83
57. A. O. Santini, J. E. de Oliveira, H. R. Pezza, L. Pezza, *Microchem J*., 2006, 84, 44-49
58. R. Hamoudova, M. Pospisilova, *J. Pharm. Biomed. Anal*., 2006, 41, 1463-1467
59. R. Canaparo, E. Muntoni, G. P. Zara, C. Della Pepa, E. Berno, M. Costa, M. Eandi, *Biomed. Chromatogr*., 2000, 14, 219-226
60. L. Chen, L. Zhang, Y. Li, G. Qi, *Jiefangjun Yaoxue Xuebao*, 2007, 23, 138-140
61. A. Kot-Wasik, J. Debska, A. Wasik, J. Namiesnik, *Chromatographia*, 2006, 64, 13-21
62. K. Suenami, L. W. Lim, T. Takeuchi, Y. Sasajima, K. Sato, Y. Takekoshi, S. Kanno, *J. Sep. Sci*., 2006, 29, 2725-2732
63. M. Pedrouzo, S. Reverte< F. Borrull, E. Pocurull, M. Rosa, *J. Sep. Sci*., 2007, 30, 297-303
64. A. Panusa, G. Multari, G. Incaranto, L. Gagliardi, *J. Pharm. Biomed. Anal*., 2007, 43, 1221-1227
65. A. Togola, H. Budzinski, *Anal. Bioanal. Chem*., 2007, 388, 627-635
66. A. Lajeunesse, C. Gagnon, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 2007, 87, 565-578
67. Z. Yu, S. Peldszus, P. M. Huck, *J. Chromatogr. A*, 2007, 1148, 65-77

68. A. Kar and G. I. Aniuha, *J. Pharm. Sci.*, 1981, 70, 690-691
69. M. J. A. Canada, M. I. P. Reguera, A. M. Diaz and, L. F. Capitan-Vallvey, *Talanta*, 1999, 49, 691-701
70. R. M. Shubietah, A. Z. Abu Zuhri, A. G. Fogg, *Microcim. Acta*, 1999, 130, 165-171
71. G. Skofitsch, F. Lembeck, *Arzneim.-Forsch. (Drug Research)*, 1993, 33, 1674-1676
72. U. Doge, K. Eger, *Pharmazie*, 2007, 62, 174-178
73. A. J. Lange and P. R. Griffiths, *Applied Spectroscopy*, 1993, 47, 403-410
74. V. Tavares, C. C. Macedo, L. Montanhez, F. A. P. Barros, E. C. Meurer, D. R. Campos, E. C. Coelho, S. A. Calaffati and J. Pedrazzoli Jr, *J. Chromatogr. B*, 2007, 853, 127-132
75. C. Wang, G. Fan, M. Lin, Y. Chen, W. Zhao, Y. Wu, *J. Chromatogr. B*, 2007, 854, 48-56
76. Q. Falin, D. Qinglong, *Zhongguo Yaoxue Zazhi*, 1991, 11, 369-370
77. F. Randez-Gil, J. A. Daros, A. Salvador, M. De la Guardia, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1991, 9, 539-545
78. A. El-Brashy, F. A. Aly, F. Belal, *Microchim. Acta*, 1993, 110, 55-60
79. A. A. Salem, B. N. Barsoum, E. L. Izake, *Anal. Lett.*, 2002, 35, 1631-1648
80. A. A. Salem, B. N. Barsoum, E. L. Izake, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2004, 60, 771-780
81. A. Sioufil, J. P. Dubois, *J. Chromatogr. B: Biomed. Appl.*, 1990, 531, 459-480
82. A. El Mahjoub, C. Staub, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2000, 23, 447-458
83. M. Wilhelm, H. J. Battista, D. Obendorf, *J. Chromatogr. A.*, 2000, 897, 215-225
84. S. N. Muchohi, B. R. Ogutu, C. P. J. C. Newton, S. O. Kokwaro, *J. Chromatogr. B: Biomed. Appl.*, 2001, 761, 255-259
85. S. Diallo, E. Bugni, F. Senhadj-Raoul, S. Gasdeblay, D. Marot, M. C. Dessalles, G. Mahuzier, *Talanta*, 2001, 55, 721-732
86. I. F. Bares, F. Pehourcq, C. Jarry, *J. Pharm. Biomed. Anal*., 2004, 36, 865-869
87. J. Hackett, A. A. Elian, *Forensic Sci. Int.*, 2007, 166, 209-217
88. L. E. Cavedal, F. D. Mendes, C. C. Domingues, A. K. Patni, T. Monif, S. Reyar, A. Dos S. Pereira, G. D. Mendes, G. De Nucci, *J. Mass. Spectrom*., 2007, 42, 81-88
89. S. V. Gandhi, N. D. Dhavale, V. Z. Jadhav, S. S. Sabnis, *J. AOAC Int*., 2008, 91, 33-38
90. D. Song, S. Zhang, K. Kohlhof, *J. Chromatogr. B:Biomed. Appl*., 1996, 686, 199-204
91. M. Pujadas, S. Pichini, E. Civit, E. Santamarina, K. Perez, R. de la Torre, *J. Pharm. Biomed. Anal*., 2007, 44, 594-601
92. M. M. Correia dos Santos, V. Famila, M. L. Simoes Goncalves, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, 374, 1074-1081
93. A. A. Salem, B. N. Barsoum, E. L. Izake, *Anal. Chim. Acta*, 2003, 498, 79-91
94. A. El-Brashy, F. A. Aly and F. Belal, *Microchim. Acta*, 1993, 110, 55-60
95. A. A. Salem, B. N. Barsoum, E. L. Izake, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2004, 60, 771-780
96. S. M. Khalile, M. A. Zayed, S. M. Abd Allah, *Egypt. J. Chem*., 2004, 47, 1-16
97. S. Laiwruangrath, J. Makchit, M. Chinag, *Anal. Sci*., 2006, 22, 127-130
98. K. Chiba, H. Horii, T. Chiba, Y. Kato, T. Hirano, T. Ishizaki, *J. Chromatogr. B.*, 1995, 668, 77-84
99. M. J. Koenigbauer and M. A. Curtis, J. Chromatogr. B, 1988, 427, 277
100. A. El Mahjoub, C. Staub, *J. Pharm. Biomed. Anal*., 2000, 23, 447-458
101. C. Ferrezra, C. Ortiz, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2001, 25, 493-499
102. S. N. Muchohi, B. R. Ogutu, C. R. J. C. Newton, G. O. Kokwaro, *J. Chromatogr, B.*, 2001, 761, 255-259

103. Z. Liu, J. Short, A. Rose, S. Ren, N. Contel, S. Grossman, S. Unger, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2001, 26, 321-330
104. S. Diallo, E. Bugni, F. Senhadj-Raoul, S. Gasdeblay, D. Marot, M. C. Dessalles, G. Mahuzier, *Talanta*, 2001, 55, 721-732
105. W. Hanpitakpong, V. Banmairuroi, B. Kamanikom, A. Choemung and K. Na-Bangchang, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2004, 36, 871-876
106. M. Bakavoli, M. Kaykhaii, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2003, 31, 1185-1189
107. L. Wang, H. Zhao, Y. Qiu and Z. Zhou, *J. Chromatogr. A.*, 2006, 1136, 99-105
108. M. Pujadas, S. Pichini, E. Civit, E. Santamarina, K. Perez and R. de la Torre, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2007, 44, 594-601
109. R. Cordero and S. Paterson, *J. Chromatogr. B.*, 2007, 850, 423-431
110. N. Thuaud, B. Sebille, M. H. Livertoux, J. Bessiere, *J. Chromatogr. A*, 1983, 282, 509-518
111. M. M. Correia dos Santos, V. Famila, M. L. Simoes Goncalves, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, 374, 1074-1081
112. W. Guo, H. Lin, L. Liu and J. Song, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2004, 34, 1137-1144
113. R. S. Guerrero, C. G. Benito and J. M. Calatayud, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1993, 11, 1357-1360
114. J. Dolejsova, P. Solich, Ch. K. Polydorou, M. A. Koupparis, C. E. Efstathiou, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1999, 20, 357-362
115. J. Moros, S. Garrigues and M. de la Guardia, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2007, 43, 1277-1282
116. A. Es-haghi, X. Zhang, F. M. Musteata, H. Bagheri and J. Pawliszyn, *The Analyst*, 2007, 132, 672-768
117. S. Furlanetto, S. Orlandini, G. Massolini, M. T. Faucci, E. La Porta and S. Pinzauti, *The Analyst*, 2001, 126, 1700-1706
118. M. S. A. Pardo, M. Steppe, M. F. M. Tavares, E. R. M. Kedor-Hackmann and M. I. R. M. Santoro, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2005, 37, 273-279
119. Paul H. Houston, *Chemical Kinetics and Reaction Dynamics*, McGraw-Hill, New York, 2001.
120. D. Perez-Bendito, M. Silva, *Kinetic Methods in Analytical Chemistry,* Ellis Horwood Chichester, 1988.
121. D. W. Margerum and T. J. Bydalek, *Inorg. Chem*., 1962, 1, 852
122. S. Funashi, S. Yamada and M. Tanaka, *Anal. Chim. Acta*., 1971, 56, 371
123. M. Tabata, S. Funashi and M. Tanaka, *Anal. Chim. Acta*., 1972, 62, 289
124. D. C. Olsen and D. M. Margerum, *J. Am. Chem. Soc*., 1963, 85, 297
125. S. Raman, *Indian J. Chem*., 1975,13, 1229
126. M. Phull, H. C. Bajaj and P. C. Nigam, *Talanta*, 1981, 28, 610
127. N. D. Lis, N. E. Katz, *Anal. Asoc. Quim. Argentina*, 1981, 69, 1
128. M. K. Gadia and M. C. Mehra, *Microchem. J.*, 1978,23, 278
129. J. Das and K. Datta, *J. Indian Chem. Soc.* 1974, 51, 553
130. B. R. Reddy and S. Raman, *Indian J. Chem*., 1984, 23A, 48
131. S. Funashashi, M. Tabata and M. Tanaka, *Anal. Chim. Acta*, 1971, 57, 311
132. S. Funashashi, M. Tabata and M. Tanaka, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 1971, 44, 1586
133. V. Golubović, *Organski reaktivi u analitičkoj hemiji*, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 1980.
134. K. K. Chatterje *Anal. Chim. Acta.*, 1959, 20, 423-427

135. F. Feigel, *Chemistry of Specific, Selective and Sensitive Reactions,* Academic Press, New York, 1949.
136. C. M. Callahan, W. C. Fernelius and B. P. Block, *Anal. Chim. Acta*, 1957, 16, 101-108
137. R. Bucci, A. D. Magri, A. L. Magri, A. Napoli, *Polyhedron*, 2000, 19, 2515-2520
138. N. Okulik, A. H. Jubert, *J. Mol. Struct. (Theochem)*, 2004, 682, 55-62
139. G. S. Hammond, *J. Chem. Phys.*, 1955, 77, 334-338
140. I. W. M. Smith, *Chem. Soc. Rev.*, 2008, 37, 812-826
141. I. D. Holclajtner Antunović, *Opšti kurs fizičke hemije*, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd, 2000.
142. N. B. Milić, S. P. Sovilj, *Kinetičko-termodinamički principi i mehanizam hemijskih reakcija, priručnik za računske i eksperimentalne vežbe*, NIK, Beograd, 2000.
143. J. Ermer, *J. Pharm. Biomed. Anal*., 2001, 24, 755-767
144. V. Thomsen, D. Schatzlein and D. Mercuro, *Spectroscopy*, 2003, 18, 112-114
145. The Pharmaceutica Society of Great Britain, *Clarke's isolation and identification of drugs*, The Pharmaceutical Press, London, 1986
146. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Saunders College Publishing, Philadelphia, 1996
147. C. Hartmann, J. Smeyers-Verbeke, W. Penninckx, Y. V. Hezden, P. Vankeerberghen, D. L. Massart, *Anal. Chem*., 1995, *67*, 4491-4499
148. A. H. Ahmed, A. A. Omran, G. M. El-Sherbiny, G. *J. Appl. Sci. Res.*, 2006, 2, 44-50
149. A. Temiezer, N. Ozaltin, *Gazi Univ. Ecz. Fak. Der.*, 1986, 3, 21-27
150. L. C. Kvist, S. B. Andersson, J. Berglund, B. Wennergren, S. M. Fors, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2000, 22, 405-411
151. M. Gajewska, A. Goldnik, E. Wojcik, E. Lukasik, *Chem. Anality*., 1988, 33, 155-162
152. C. Preti and G. Tosi, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 1979, 41, 263-266
153. C. Ferreyra, C. Ortiz, *J. Pharm. Biomed. Anal*., 2001, 25, 493-499

Registar

A

acetilsalicilna kiselina, 16, 83
analgetici, 13

B

benzodiazepini, 22

D

detekcioni limit, 38
diazepam, 27, 140
diklofenak, 14, 68
dimenhidrinat, 23, 113

E

energija aktivacije, 75
entalpija, 75
entropija, 75

H

hemijska kinetika, 30
HPLC hromatografija, 49
    kvalitativna, 52
    kvantitativna, 52

I

ibuprofen, 19, 97
indikatorska reakcija, 65
interferencioni koeficijent, 78

K

kinetičke metode analize, 30
    podela, 31, 32
    diferencijalna metoda, 32
    integralna metoda, 32
klonazepam, 25, 126

korelaciona analiza, 48
korelacioni faktor, 48
kvantifikacioni limit, 38

L

"ligand-exchange" reakcije, 42

M

metode
- za određivanje diklofenaka, 15
- za određivanje acetilsalicilne kiseline,18
- za određivanje ibuprofena, 20
- za određivanje dimenhidrinata, 24
- za određivanje klonazepama, 26
- za određivanje diazepama, 28
- tangensna, 33
- fiksnog vremena, 34
- zadate koncentracije, 35

N

1-nitrozo-2-naftol, 65

O

osetljivost, 37

P

preciznost, 41

R

recovery, 77
regresiona analiza, 46

S

sedativi, 22
selektivnost, 41

određivanja diklofenaka, 78
određivanja acetilsalicilne kis., 92
određivanja ibuprofena, 108
određivanja dimenhidrinata, 122
određivanja klonazepama, 135
određivanja diazepama, 149
standardna devijacija
pojedinačnog merenja, 77
srednje vrednosti, 77
relativna, 77
slobodna energija, 75
srednja aritmetička vrednost, 77

T

tačnost, 41
tačnost i reproduktivnost
određivanja diklofenaka, 77
određivanja acetilsalicilne kis., 91
određivanja ibuprofena, 107
određivanja dimenhidrinata, 121
određivanja klonazepama, 134
određivanja diazepama, 148

V

varijansa, 73

BIOGRAFIJA SA BIBLIOGRAFIJOM

BIOGRAFSKI PODACI

a) Lični podaci

Aleksandra N. Pavlović (devojačko Petrović) rođena je 1.02.1974.god. u Nišu.

b) Podaci o dosadašnjem obrazovanju

Aleksandra Pavlović upisala se školske 1993/94. god. na Filozofski fakultet u Nišu, Smer hemija, i diplomirala na istom 29.05.1998.god., prosečnom ocenom 8,95. Diplomski rad odbranila je ocenom 10 i time stekla pravo na diplomu o visokoj stručnoj spremi i stručni naziv diplomirani hemičar opšte hemije. U toku studija bila je stipendista Fonda za talentovane učenike i studente grada Niša. Školske 1998/99. godine upisala je poslediplomske studije na Filozofskom fakultetu u Nišu, na Odseku za hemiju, smer analitička hemija. Nakon položenih ispita prosečnom ocenom 10,00, odbranila je magistarski rad, iz oblasti analitičke hemije, pod nazivom "Kinetičko određivanje aminokiselina: histidina, arginina i lizina" 07.12.2002. god. na Prirodno-matematičkom fakultetu u Nišu.

c) Profesionalna karijera

Nakon završetka studija, radila je na Filozofskom fakultetu kao saradnik na projektu MNTR Republike Srbije "Razrada novih analitičkih metoda za analizu elemenata u uzorcima prirodnog i veštačkog porekla u vodenim i nevodenim sredinama" (br. 02M14) sve do izbora za asistenta-pripravnika na Odseku za hemiju 1. decembra 1999. godine. Poslediplomske studije, finansirane od strane Republike, smer analitička hemija, upisala je 13.11.1998. godine. Kao asistent drži vežbe iz predmeta: Instrumentalna analitička hemija I i Instrumentalna analitička hemija II (smer diplomirani hemičar) i Instrumentalna analitička hemija (smer profesor hemije).

BIBLIOGRAFSKI PODACI

Aleksandra Pavlović je do sada objavila 3 rada u vodećim, 8 radova u međunarodnim časopisima, 1 u nacionalnom časopisu i 15 saopštenja na međunarodnim i nacionalnim naučnim skupovima. Jos dva rada su u procesu štampanja, kao i zbirka zadataka iz Instrumentalne analitičke hemije. Radovi u kategoriji $\mathbf{R_{51b}}$ pod rednim brojevima 2 i 3, $\mathbf{R_{52}}$ pod rednim brojem 8, kao i saopštenja u kategoriji $\mathbf{R_{72}}$ pod rednim brojevima 3-5 su deo doktorske disertacije.

Radovi objavljeni u vodećim časopisima međunarodnog značaja $R_{51b} = 5$

1. S. S. Mitić, G. Ž. Miletić, **A. N. Pavlović** and S. B. Tošić, Kinetic Spectrophotometric Determination of Chromium(VI) by Oxidation of Sodium Pyrogallol-5-sulphonate by Hydrogen Peroxide, *Monatshefte fur Chemie (Chem. Month.)*, 135(8), 927-936, 2004

2. S. S. Mitić, G. Ž. Miletić, **A. N. Pavlović**, S. B. Tošić and E. T. Pecev, Determination of Diclofenac Sodium in Commercial Pharmaceutical Formulations and Human Control Serum Using a Kinetic-Spectrophotometric Method, *Chem. Pharm. Bull.*, 55(10), 1423-1426, 2007

3. S. S. Mitić, G. Ž. Miletić, **A. N. Pavlović**, S. B. Tošić and S. M. Sunarić, Quantitative Analysis of Acetylsalicylic Acid in Commercial Pharmaceutical Formulations and Human Control Serum Using Kinetic Spectrophotometry, *Acta. Chim. Slov.*, 55, 508-515, 2008

Radovi objavljeni u časopisima međunarodnog značaja $R_{52} = 3$

1. S. S. Mitić, G. Ž. Miletić, **A. N. Petrović** and S. B.Tošić, A Kinetic determination of lysine in pharmaceutical sample, *J. Serb. Chem. Soc.*, 67(11), 783-792, 2002

2. S. S. Mitić, G. Ž. Miletić, **A. N. Petrović**, S. B. Tošić, Kinetic determination of histidine in pharmaceutical sample, *Oxidation Communications*, 27(2), 453-462, 2004

3. M. V. Obradović, S. S. Mitić, S. B. Tošić and **A. N. Pavlović,** Spectrophotometric investigation of the Fe(III)-disulphonated hydroquinone complex, *J. Serb. Chem. Soc.*, 70(4), 651-659, 2005

4. S. S. Mitić, G. Ž. Miletić, **A. N. Pavlović**, S. B. Tošić and D. S. Velimirović, Development and Evaluation of a Kinetic-Spectrophotometric method for Determination of Arginine, *J. Chin. Chem. Soc*., 54(1), 47-54, 2007

5. S. S. Mitić, V. V. Živanović, M. V. Obradović, S. B. Tošić, **A. N. Pavlović**, Catalytic Kinetic Spectrophotometric Method for Determination of Phosphate Ion, *Chin. J. Chem.*, 25(4), 531-534, 2007

6. S. S. Mitić, G. Ž. Miletić, V. V. Živanović, D. A. Kostić, **A. N. Pavlović**, Development and evaluation of kinetic-spectrophotometric method for the determination of simazine, *Oxidation Communications*, 30(4), 937-944, 2007

7. Z. M. Grahovac, S. S. Mitić, T. G. Pecev, E. T. Pecev, **A. N. Pavlović,** Kinetic Spectrophotometric Determination of Ascorbic Acid in Pharmaceutical Samples by Oxidation of Ponceau 4R by Hydrogen Peroxide, *J. Chin. Chem. Soc*., 55(1), 137-142, 2008

8. S. S. Mitić, G. Ž. Miletić, **A. N. Pavlović**, B. B. Arsić, V. V. Živanović, Quantitative analysis of ibuprofen in pharmaceuticals and human control serum using kinetic spectrophotometry, *J. Serb. Chem. Soc.*, 73(8-9), 879-890, 2008

Rad u vodećem časopisu nacionalnog značaja $R_{61} = 2$

1. S. S. Mitić, G. Ž. Miletić, Z. B. Grahovac, S. B. Tošić, **A. N. Petrović**, Determination of benzoate in solution by kinetic method, *Ukrain. Chem. J.*, 69(7-8), 39-42, 2003

Radovi saopšteni na skupovima međunarodnog značaja štampani u celini
$R_{54} = 1$

1. S. Mitić, G. Miletić, **A. Petrović**, Influence of lysine as the inhibitor on the thermodynamic characteristics on the reaction of oxidation of purpurin by hidrogen peroxide, 6th International Conference of Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Proceedings, Volume I, 213, September 26-28, 2002, Belgrade, Yugoslavia

2. S. S. Mitić, G. Ž. Miletić, **A. N. Pavlović**, S. B. Tošić, The new kinetic method for the determination of histidine, II Regional Symposium "Chemistry and Environment", Proceedings, 105, June 18-22, 2003, Kruševac, Serbia and Montenegro

3. Snežana S. Mitić, Gordana Ž. Miletić, **Aleksandra N. Pavlović,** Kinetic determination of arginine by its inhibitory effect on oxidation of 1,2,4-trihydroxyantra-quinone oxidation by hydrogen peroxide, XVIII Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, September 23-25, 2004, Ohrid, Republic of Macedonia

4. S. S. Mitić, G. Ž. Miletić, **A. N. Pavlović**, Investigation of the influence of glycine as the inhibitor on the thermodynamic characteristics of 1,2,4-trihydroxyantra-quinone oxidation with hydrogen peroxide, 7th International Conference of Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Proceedings, Volume I, 246, September 21-23, 2004, Belgrade, Serbia and Montenegro

Radovi saopšteni na skupovima međunarodnog značaja štampani u izvodu
$R_{72} = 0,5$

1. A. N. Petrović, S. S. Mitić, G. Ž. Miletić, Kinetic determination of lysine, 3rd International Conference of the Chemical Societies of the South-Eastern European Countries on Chemistry in the New Millenium-an Endless Frontier, Book of Abstracts, Volume I, 42, September 22-25, 2002, Buchurest, Romania

2. Snežana S. Mitić, **Aleksandra N. Pavlović,** Olivera D. Anđelković, Identification and determination of glycine in pharmaceutical samples using paper chromatography and kinetic method, 5th International Conference of the South-Eastern European Chemical Societies, Book of Abstracts, Volume I, 132, September 10-14, 2006, Ohrid, Republic of Macedonia

3. Snežana S. Mitić, Gordana Ž. Miletić, **Aleksandra N. Pavlović,** Determination of acetylsalicylic acid based on "ligand-exchange reaction", XXth Congress of Chemists and Technologists of Macedonia (with international participation), Abstract Book, 94, September 17-20, 2008, Ohrid, Republic of Macedonia

4. Aleksandra N. Pavlović, Snežana S. Mitić, Gordana Ž. Miletić, Quantitative analysis of acetylsalicylic acid in commercial dosage form and human control serum, XXth Congress of Chemists and Technologists of Macedonia (with international participation), Abstract Book, 96, September 17-20, 2008, Ohrid, Republic of Macedonia

5. Snežana B. Tošić, Snežana S. Mitić, **Aleksandra N. Pavlović,** Determination of diazepam by kinetic spectrophotometry, XXth Congress of Chemists and Technologists of Macedonia (with international participation), Abstract Book, 98, September 17-20, 2008, Ohrid, Republic of Macedonia

Radovi saopšteni na skupovima nacionalnog značaja štampani u celini
R_{65} = 0,5

1. Snežana S. Mitić, Gordana Ž. Miletić, **Petrović N. Aleksandra**, Određivanje sadražaja histidina u farmaceutskom preparatu kinetičkom metodom, IV jugoslovenski simpozijum "Hemija i zaštita životne sredine", Knjiga izvoda radova, 163, Zrenjanin, 23-26. septembar, 2001

2. Mitić S. Snežana, Miletić Ž. Gordana, **Petrović N. Aleksandra**, Određivanje sadražaja arginina u farmaceutskom preparatu kinetičkom metodom, Savetovanje "Stanje i perspektive istraživanja i razvoja u hemijskoj i mašinskoj industriji", Zbornik radova,169, Kruševac, 22-24. oktobar, 2001

3. Snežana Mitić, Mirjana Obradović, Snežana Tošić, **Aleksandra Pavlović**, Određivanje olova u prirodnim vodama ICP-OES tehnikom, 5. simpozijum "Hemija i zaštita životne sredine" sa međunarodnim učešćem, Knjiga izvoda, 36, Tara, 27-30. maj, 2008

4. D. Kostić, S. Mitić, B. Radovanović, S. Tošić, **A. Pavlović**, S. Despotović, I. Rašić, Određivanje metala u grožđu Jugoistočne Srbije ICP-OES tehnikom, 5. simpozijum "Hemija i zaštita životne sredine" sa međunarodnim učešćem, Knjiga izvoda, 74, Tara, 27-30. maj, 2008

Radovi saopšteni na skupovima nacionalnog značaja štampani u izvodu
R_{73} = 0,2

1. S. Mitić, G. Miletić, **A. Petrović**, Uticaj histidina kao inhibitora na termodinamičke karakteristike oksidacije purpurina vodonik peroksidom, Prvi jugoslovenski simpozijum o termodinamici i faznim dijagramima, Zbornik izvoda radova, 22, Borsko jezero, 21-23. jun, 2001

2. S. S. Mitić, G. Ž. Miletić, **A. N. Petrović,** Određivanje kadmijuma u bistrom soku borovnice, Sedmi simpozijum o flori jugoistočne Srbije i susednih područja, Knjiga izvoda, 66, Dimitrovgrad, 2002

Odbranjena magistarska teza R_{82} = 3

Aleksandra N. Pavlović, Kinetičko određivanje aminokiselina: histidina, arginina i lizina, Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, 2002.

Zbirka zadataka R_{23} = 2

Snežana S. Mitić, **Aleksandra N. Pavlović**, Valentina V. Živanović, Zbirka zadataka iz instrumentalne analitičke hemije, prihvaćena recenzija

Učešće na projektima:

"Razrada novih analitičkih metoda za analizu elemenata u uzorcima prirodnog i veštačkog porekla u vodenim i nevodenim sredinama" (br. 02M14) od 1999. do 2000. godine koji je finansiralo Ministarstvo za nauku, tehnologije i razvoj Republike Srbije.

”Razvoj novih i poboljšanje postojećih analitičkih metoda za praćenje kvaliteta industrijskih proizvoda i životne sredine” (br. 1211) od 2001. do 2005. godine koji je finansiralo Ministarstvo za nauku, tehnologije i razvoj Republike Srbije.

"Razvoj i primena metoda za praćenje kvaliteta industrijskih proizvoda i životne sredine" (br. 142015) od 2006. godine koji finansira Ministarstvo nauke i zaštite životne sredine Republike Srbije.