

## **Elektrohemijsko ponašanje metoksiimino cefalosporina i njihovo *in-vitro* i *in-vivo* određivanje u urinu primenom adsorptivne „striping” voltametrije**

Mara M. Aleksić<sup>\*1</sup>, Vera Kapetanović<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut za fizičku hemiju, <sup>2</sup>Institut za analitičku hemiju,  
Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Vojvode Stepe 450,  
11000 Beograd, Srbija

---

### **Kratak sadržaj**

U poslednje dve dekade elektroanalitičke metode su primenjivane za osetljiva i selektivna određivanja velikog broja cefalosporina. U ovom radu detaljno je prikazano elektrohemijsko ponašanje metoksiimino cefalosporina, mehanizam i priroda procesa njihove redukcije na površini živine elektrode, a posebna pažnja posvećena je sposobnosti molekula cefalosporina da se adsorbuju na površini elektrode. Voltametrijske metode sa akumulacijom zasnivaju se na procesu specifične adsorpcije cefalosporina na površini živine elektrode i primenjuju se za određivanje veoma niskih koncentracija cefalosporina kako *in-vitro*, tako i *in-vivo* u biološkom materijalu urinu. Sumirani su rezultati primene metode adsorptivne „striping” diferencijalno pulsne voltametrije (AdSDPV) za određivanje cefpodoksim proksetila (CP), cefotaksima (CF), dezacetilcefotaksima (DCF) i cefetameta (CEF). Najveća osetljivost *in-vitro* određivanja u uzorcima urina, ostvarena je za CP u kiseljoj sredini (granica detekcije:  $7,4 \cdot 10^{-9} \text{M}$  i granica određivanja:  $2,4 \cdot 10^{-8} \text{M}$ ), što je u saglasnosti sa najizraženijom adsorpcijom ovog antibiotika, a zatim slede CF, DCF i na kraju CEF. Prikazana je i primena AdSDPV metode za *in-vivo* određivanja CF i DCF. Prednost AdSDPV nad drugim analitičkim metodama je u jednostavnosti pripreme uzorka, a prednost nad ostalim voltamperometrijskim metodama leži u većoj osetljivosti i selektivnosti.

**Ključne reči:** metoksiimino cefalosporini, redukcija, adsorpcija, AdSDPV određivanje, urin

---

\* Adresa za korespondenciju: mara@pharmacy.bg.ac.rs

## Uvod

Cefalosporini su sintetski antibiotici slični penicilinima po mehanizmu dejstva i farmakološkim karakteristikama, a od njih se razlikuju po širem antibakterijskom spektru i otpornosti na  $\beta$ -laktamazu [1]. Ova jedinjenja sadrže  $\beta$ -laktamski ciklus vezan za šestočlani dihidrotiazinski ciklus i poseduju različite supstituente u bočnim lancima u C3 i C7 položajima. Sa elektrohemijskog stanovišta posebnu grupu čine metoksiimino cefalosporini, cefalosporini sa metoksiimino grupom u C7 položaju, koja se može redukovati na živinoj elektrodi, na čemu se i zasniva primena elektroanalitičkih metoda.

Rani radovi El-Maali i koautora [2], kao i Bernacca i saradnika [3], bavili su se ispitivanjem mehanizma redukcije metoksiimino grupe na živinoj elektrodi primenom klasične polarografije sa jednosmernom strujom, dok su Ogorevc [4] i Fogg [5] sa saradnicima koristili diferencijalno pulsnu polarografiju za kvantitativno određivanje cefalosporina i njihovih degradacionih produkata u vodenim rastvorima. Polarografske metode pokazale su nisku osetljivost, pa je započela primena voltametrije sa akumulacijom cefalosporina na površini stacionarne živine elektrode [6]. Ova metoda, iako je pokazala veću osetljivost za određivanja u farmaceutskim preparatima, nije mogla biti primenjena za određivanje iz biološkog materijala.

Osim redukcije na živinoj elektrodi, metoksiimino cefalosporini mogu se redukovati ili oksidovati i na čvrstim elektrodama. Za ova određivanja utvrđeno je da su manje osetljiva i najčešće se izvode na elektrodama od zlata i platine [7], staklastog ugljenika [8], ugljenične paste [9] i drugih ugljeničnih elektroda [10, 11] koje mogu biti specijalno modifikovane i aktivirane [12].

Prvi radovi koji su se bavili određivanjem metoksiimino cefalosporina u biološkom materijalu predstavljali su in-vitro određivanja. Tako su standardni rastvori cefalosporina dodavani u urin, pa su cefiksim (CK) i CP određivani u kiseloj sredini [13], a CF u nanomolarnim koncentracijama, određen je uz dugotrajnu akumulaciju u trajanju od 5 do 14 minuta [14]. U novije vreme analize traju kraće i postižu se veće osetljivosti određivanja [15], a ispitivanja se vrše in-vivo iz biološkog materijala kao što je urin, plazma, serum ili cerebrospinalna tečnost [16-18]. U većini slučajeva ova ispitivanja zahtevaju prethodnu ekstrakciju ili hromatografsko razdvajanje cefalosporina iz biološkog materijala [19, 20].

Cefalosporini se primarno izlučuju preko bubrega. Njihovo vreme poluživota iznosi nekoliko časova, a veći deo unete doze (i do 60%) izlučuje se putem urina u neizmenjenom obliku, dok se ostatak metaboliše u aktivne ili neaktivne metabolite [21]. CF naprimer, pod dejstvom enzima esteraze deesterifikuje se do aktivnog metabolita DCF, koji je takođe elektrohemijski aktivan i može se određivati elektroanalitičkim metodama direktno iz urina, istovremeno sa predlekom CF [22].

U ovom radu predstavljen je mehanizam redukcije i istaknuta je pojava specifične adsorpcije metoksiimino cefalosporina na površini živine elektrode, kao osnovnih preduslova za korišćenje adsorptivnih tehnika za kvantitativno određivanje cefalosporina. Sumirani su rezultati određivanja četiri metoksiimino cefalosporina metodom adsorptivne „striping” diferencijalne pulsne voltametrije. Neki od njih određeni su in-vitro dodatkom u uzorak urina, dok su ostali određeni in-vivo iz urina, a u svim slučajevima bez ikakve prethodne pripreme uzorka, što predstavlja znatan doprinos jednostavnosti i brzini primene ove metode.

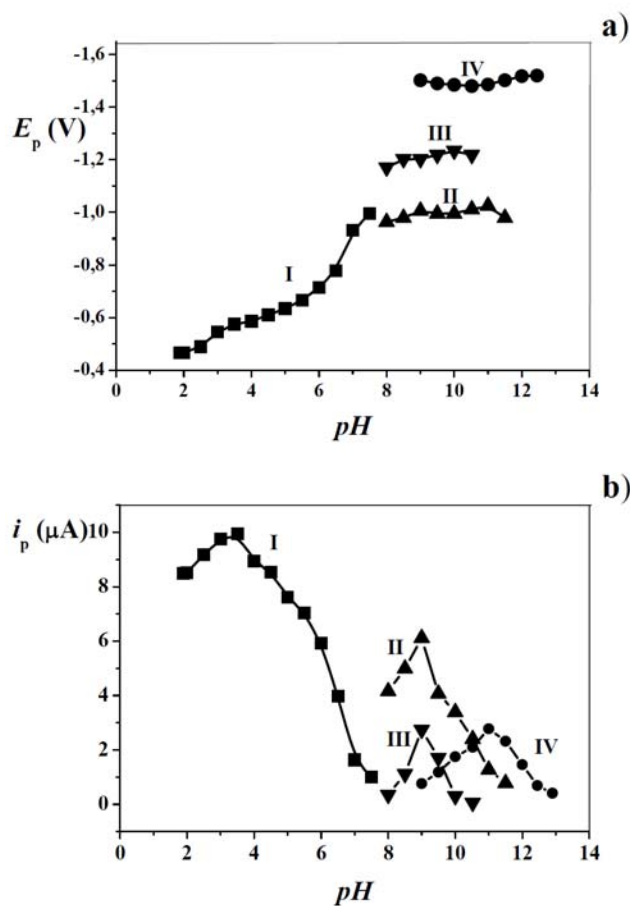
### Redukcija metoksiimino cefalosporina na površini živine elektrode

Metoksiimino grupa ( $\begin{matrix} R' \\ | \\ >C=N-OCH_3 \\ | \\ R \end{matrix}$ ) u molekulima cefalosporina (Tabela I), podleže redukciji na kapljućoj živinoj elektrodi (KŽE) i stacionarno živinoj elektrodi (SŽE), dajući polarografske talase, tj. voltametrijske pikove u širokoj pH oblasti (2 – 12) [22-26]. U kiseloj i neutralnoj sredini cefalosporini daju jedan dobro izražen pik (I) koji se sa porastom pH razdvaja u dva (II i III). U alkalnoj sredini,  $pH \geq 10$ , javlja se novi pik (IV) na negativnim potencijalima  $E \sim -1,5V$ . Osim navedenih voltametrijskih pikova svi cefalosporini, pa tako i metoksiimino cefalosporini, pokazuju pik koji je posledica dvo-elektronske redukcije nezasićene C=C veze u dihidrotiazinskom ciklusu. Ova redukcija odigrava se u kiseloj sredini na negativnim potencijalima koji su veoma bliski redukciji  $H^+$ -jona iz osnovnog elektrolita, pa stoga nije povoljna za kvantitativna određivanja.

**Tabela I** Cefalosporini određeni AdSDPV metodom  
**Table I** Cephalosporins determined using AdSDPV

Opšta struktura	Cefalosporin	-R <sub>1</sub>	-R <sub>2</sub>
	Cefpodoksim proksetil (CP)		
	Cefotaksim (CF)		-H
	Dezacetil cefotaksim (DCF)		-H
	Cefetamet (CEF)		-H

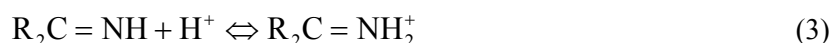
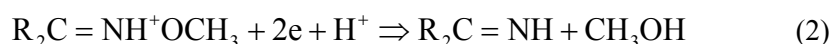
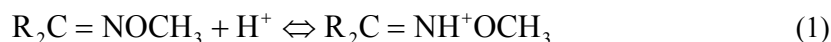
Na slici 1 predstavljen je uticaj pH sredine na položaj, tj. potencijal i visinu pika redukcije metoksiimino grupe na primeru CP [24] kao predstavnika ispitivanih cefalosporina. Pomeraj potencijala pika ka negativnijim vrednostima sa porastom pH ukazuje da protonacija reaktivnog dela molekula prethodi transferu elektrona [27, 28], a pojava maksimuma na svim krivama zavisnosti intenziteta struje od pH upućuje na zaključak da je adsorpcija na površini elektrode izražena na datim vrednostima pH. Analizom uticaja pH i brzine promene potencijala, utvrđeno je da elektrodni proces redukcije na živinoj elektrodi predstavlja ireverzibilan, difuziono kontrolisan proces, uz jako izraženu adsorpciju na određenim pH vrednostima [28].



Slika 1. Uticaj pH na a) potencijal i b) struju DPV pika  $1 \cdot 10^{-5}$  M CP u BR puferu

Figure 1. Influence of the pH on the DPV peak: a) potential, b) current of  $1 \cdot 10^{-5}$  M CP in BR buffer

Mehanizam redukcije metoksiimino grupe odvija se u dva stupnja [29, 30]. U prvom stupnju se protonuje azot N–OCH<sub>3</sub> grupe (1), posle čega dolazi do raskidanja N–O veze uz utrošak dva elektrona (2), gradeći imin koji se dalje protonuje (3) i redukuje u drugom dvo-elektronskom stupnju do odgovarajućeg amina (4).



Pojava jednog četvero-elektronskog pika u kiseljoj sredini (pik I slika 1) posledica je bliskih vrednosti potencijala redukcije oksima i intermedijarnog imina. Nasuprot tome, javlja se razdvajanje na dva dvo-elektronska pika (pH 7-11), jer se redukcija oksima odvija na potencijalima koji su nešto pozitivniji od potencijala redukcije odgovarajućeg imina. U alkalnoj sredini (pH ≥ 10) redukuje se neprotonovani oblik metoksiimino grupe i promena pH ne utiče na ovu redukciju.

### Adsorpcija na površini živine elektrode

Adsorpcija metoksiimino cefalosporina na površini živine elektrode utiče na proces elektoredukcije. Pojava adsorpcije zapažena je ranije i kod drugih cefalosporina; konjugovane kiseline ovih jedinjenja koje nastaju u blizini elektrode, adsorbuju se na površini elektrode pri potencijalima između 0,0 V i -0,2 V, a desorbuju pri potencijalima od -1,0 V do -1,2 V. Ovo je potvrđeno polarografijom sa naizmničnom strujom [31-33], cikličnom voltametrijom [20, 34, 35] i diferencijalno pulsnom polarografijom [5, 20]. Poređenjem faradejske i nefaradejske komponente naizmnične struje primećeno je da se redukovani oblik adsorbuje slabije od oksidovanog. Konjugovane kiseline, koje se redukuju pri pH ≥ 10 (slika 1 pik IV), ne pokazuju gotovo nikakvu adsorpciju [5, 31, 33].

Kako je voltometrija metoda koja se zasniva na redukciji na stacionarnoj elektrodi i pri brzinama promene potencijala koje su veće u poređenju sa polarografijom, poznato je da pojava adsorpcije više utiče na oblik voltametrijskog pika u odnosu na izgled polarografskog talasa. Simetričan oblik voltametrijskih pikova CP, CF, DCF i CEF, prvi je pokazatelj da su ovi

cefalosporini adsorbovani na površini živine elektrode. Osim toga, izraženi maksimumi na krivama koje predstavljaju zavisnost intenziteta struje pika od pH (slika 1b), potvrđuju da je na datim pH vrednostima adsorpcija najizraženija. Sa slike 1b vidi se da je u slučaju CP adsorpcija najjača na pH 3,5 i 9,0; dok kod ostalih ispitivanih lekova ove vrednosti variraju u opsegu jedne do dve pH jedinice, što je predstavljeno u tabeli II.

**Tabela II** Uslovi za određivanje cefalosporina u urinu AdSDPV metodom  
**Table II** Conditions for AdSDPV determination of cephalosporins in urine

Cefalo sporin	pH	$\frac{\Delta i_p}{\Delta v}$ ( $\mu A V^{-1} s$ )	Amplituda (mV); širina naponskog pulsa (ms); brzina promene potencijala (mV/s)	$E_{akum}$ (V)	$t_{akum}$ (s)
CP	3,5	65,8	– 100 mV; 20 ms; 200 mV/s	–0,1	80
	9,0	42,3		–0,3	50
CF	2,8	17,4	– 50 mV; 20 ms; 20 mV/s	–0,1	30
	9,3	4,9	– 25 mV; 20 ms; 100 mV/s	–0,1	30
DCF	2,8	16,3	– 50 mV; 20 ms; 20 mV/s	–0,1	15
	9,3	3,9		–0,1	15
CEF	2,0	13,7	– 100 mV; 20 ms; 200 mV/s	–0,3	60
	8,4	3,6		–0,2	120

Jedan od najpouzdanijih kriterijuma za ispitivanje uticaja adsorpcije na proces elektoredukcije je ispitivanje zavisnosti intenziteta struje ciklovoltametrijskog pika od brzine promene potencijala,  $i_p = f(v)$ . Ukoliko sistem pokaže linearan oblik ove zavisnosti, proces je kontrolisan adsorpcijom, a što je nagib dobijene prave veći, adsorpcija je izraženija. U tabeli II, predstavljene su vrednosti eksperimentalno dobijenih nagiba za neke metoksiimino cefalosporine, odakle se vidi da najizraženije adsorpcione karakteristike pokazuje CP, kao i da u svim slučajevima ona dominira u kiseljoj sredini.

Zapažene razlike posledica su specifične adsorpcije i orijentacije ovih molekula na površini živine elektrode. Utvrđeno je da cefalosporini sa voluminoznijim supstituentom u C7 položaju, pokazuju izraženiju adsorpciju: svi navedeni molekuli u C7 položaju poseduju 2-aminotiazolil radikal za koji se pretpostavlja da se ko-planarno orijentiše na površini žive. Adsorpciji u kiseloj sredini doprinosi i prisustvo  $NH_3^+$  grupe na tiazolovom ciklusu koja je za površinu žive vezana elektrostatičkim silama u oblasti negativnih potencijala. Prisustvo elektron donora, kao što su azot i kiseonik u bočnom lancu, povećava adsorpciju metoksiimino cefalosporina jer dolazi do povećanja elektronske gustine na tiazolovom ciklusu usled prisustva slobodnog elektronskog para ovih hetero atoma.

Supstituenti  $R_1$  i  $R_2$  u C3 položaju pokazuju manji doprinos adsorpciji, u odnosu na C7 supstituent, ali upravo razlika u strukturi ovih supstituenata dovodi do razlike u adsorpcionim osobinama navedenih cefalosporina. Kao što je već rečeno, voluminoznija struktura i prisustvo kiseonika kao elektron donora povećava adsorpciju CP i CF u odnosu na DCF i CEF.

### **Određivanje niskih koncentracija primenom voltametrije sa akumulacijom**

Voltametrija sa akumulacijom ili adsorptivna „striping” diferencijalno pulsna voltametrija (AdSDPV) je elektroanalitička tehnika koja omogućava povećanje osetljivosti određivanja za dva do tri reda veličine u odnosu na klasičnu voltametriju bez akumulacije, a da se pri tome ne gubi na preciznosti.

Postupak izvođenja AdSDPV tehnike je veoma jednostavan: u troelektrodnu elektrohemijsku ćeliju, u kojoj se nalazi osnovni elektrolit oslobođen kiseonika kontinuiranim propuštanjem azota, dodaje se ispitivani uzorak. Radnoj Hg-elektrodi saopštava se potencijal akumulacije ( $E_{akum}$ ) na kome se u toku perioda akumulacije ( $t_{akum}$ ), uz stalno mešanje rastvora, adsorbuje ispitivani uzorak. Po završetku ovog procesa elektrodepozicije nastupa druga faza – „striping”, u kojoj se potencijal menja ka negativnijim vrednostima, pri čemu se akumulirani materijal redukuje i na taj način rastvara i vraća u rastvor. Ova metoda može se primeniti samo ukoliko se ispitivani molekul adsorbuje na površini živine elektrode. U slučaju metoksiimino cefalosporina ovaj kriterijum je zadovoljen, a samoj primeni metode prethodi određivanje optimalnih eksperimentalnih uslova kao što su: amplituda i širina naponskog pulsa, brzina promene potencijala, veličina živine kapi i kao najvažnije, potencijal i vreme akumulacije. Neki od ovih parametara navedeni su u tabeli II.

Rezultati kvantitativnog određivanja CP, CF, DCF i CEF u puferском sistemu dali su veoma dobre rezultate [22-26]. Najčešće, linearnost je postignuta u oblasti koncentracija od  $1 \cdot 10^{-8}$  do  $1 \cdot 10^{-7}$  M, ali u pojedinim slučajevima kao kod CF oblast linearnosti je šira. Najbolje rezultate pokazao je CP u kiseloj sredini sa granicom detekcije (limit of detection, LOD) od  $6,3 \cdot 10^{-9}$  M i granicom određivanja (limit of quantification, LOQ)  $2,1 \cdot 10^{-8}$  M, a najslabije CEF (LOD =  $2,52 \cdot 10^{-8}$  M i LOQ =  $8,4 \cdot 10^{-8}$  M). Metoda se pokazala osetljivija za sve metoksiimino cefalosporine u kiseloj u odnosu na alkalnu sredinu. Navedeni rezultati u skladu su sa adsorpcionim karakteristikama ispitivanih cefalosporina, jer je adsorpcija izraženija što je veći nagib prave zavisnosti intenziteta struje ciklovoltametrijskog pika od brzine promene potencijala, a vrednosti  $\Delta i_p / \Delta v$  (date u tabeli II) najveće su za CP, a najmanje za CEF.

### **Primena AdSDPV za određivanje cefalosporina u humanom urinu**

Metoda AdSDP voltimetrije za određivanje metoksiimino cefalosporina koja je postavljena u puferским sistemima, primenjena je za određivanje navedenih cefalosporina i u urinu koji je prethodno oslobođen proteina taloženjem u prisustvu metanola i centrifugiranjem u trajanju od 25 min pri 3900 rpm, nakon čega je supernatant filtriran kroz  $0,2 \mu\text{m}$  membranske filtre i razblažen 100 puta.

Metoda kalibracione krive primenjena je za određivanje CP, CF, DCF i CEF u uzorcima urina u koje su sukcesivno dodavane određene količine ovih lekova. U tabeli III predstavljeni su parametri određivanja koji obuhvataju oblast koncentracija i statističke podatke dobijene regresionom analizom. Dobri korelacioni koeficijenti ( $R \geq 0,99$ ) ukazuju na linearnost kalibracionih dijagrama. Kao i u puferovanim sistemima, tako i u uzorcima urina sa dodatim cefalosporinima, najveću osetljivost (najniže LOD i LOQ vrednosti) AdSDPV metoda je pokazala pri određivanju CP, što je u saglasnosti sa najizraženijom adsorpcijom ovog antibiotika, a zatim slede CF, DCF i na kraju CEF. Ponovljivost metode dala je vrednosti RSD u opsegu od 1,4% za CF u kiseloj sredini do 4,5% za određivanje CEF u alkalnoj sredini. Ispitivanje preciznosti metode u uzorcima urina kojima su dodati cefalosporini u koncentraciji od  $0,3 \mu\text{g/ml}$  dalo je vrednosti relativne standardne devijacije, RSD, u opsegu od 2,1% za CF do 6,3% za DCF.

Robustnost metode potvrđena je ispitivanjem uticaja malih promena nekih od najvažnijih eksperimentalnih parametara na odgovor sistema, tj. na „recovery” vrednost. Menjane su vrednosti pH, potencijala i vremena akumulacije, amplitude i širine naponskog pulsa, veličine živine kapi i brzine promene potencijala. Najizraženiji uticaj na fluktuacije struje pokazali su



potencijal akumulacije i pH, ali nisu prelazile vrednost 4,6% koliko je dobijeno za DCF.

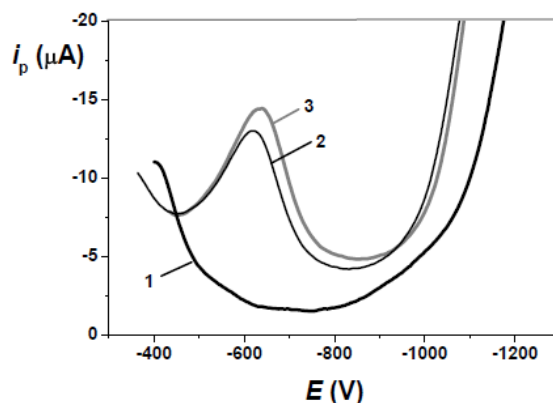
**Tabela III** Statistički parametri određivanja cefalosporina u urinu  
**Table III** Statistic parameters for cephalosporin determination in urine

Cefalo sporin	pH	E <sub>p</sub> (V)	Linearni opseg koncentracija (M)	Regresiona jednačina y (μA), x (M)	S <sub>a</sub>	S <sub>b</sub>	R	SD (μA)	LOD (M)	LOQ (M)
CP	3,5	-0,50	2·10 <sup>-8</sup> – 2·10 <sup>-7</sup>	y = -0,1000 + 3,114·10 <sup>6</sup> x	0,0077	8,27·10 <sup>4</sup>	0,9982	0,0066	7,4·10 <sup>-9</sup>	2,4·10 <sup>-8</sup>
	9,0		1·10 <sup>-7</sup> – 2·10 <sup>-6</sup>	y = -0,0041 + 3,416·10 <sup>5</sup> x	0,0062	5,43·10 <sup>5</sup>	0,9987	0,0117	5,4·10 <sup>-8</sup>	1,8·10 <sup>-7</sup>
CF	2,8	-0,60	8·10 <sup>-8</sup> – 1·10 <sup>-6</sup>	y = 0,0010 + 8,880·10 <sup>4</sup> x	0,0008	1,26·10 <sup>3</sup>	0,9994	0,0011	2,6·10 <sup>-8</sup>	8,8·10 <sup>-8</sup>
	9,3		8·10 <sup>-7</sup> – 6·10 <sup>-7</sup>	y = 0,0014 + 1,458·10 <sup>4</sup> x	0,0013	3,27·10 <sup>3</sup>	0,9990	0,0014	2,6·10 <sup>-7</sup>	8,7·10 <sup>-7</sup>
DCF	2,8	-0,23	2·10 <sup>-7</sup> – 2·10 <sup>-6</sup>	y = 0,0203 + 1,370·10 <sup>5</sup> x	0,0037	2,26·10 <sup>4</sup>	0,9984	0,0094	8,1·10 <sup>-8</sup>	2,7·10 <sup>-7</sup>
	9,3		5·10 <sup>-7</sup> – 6·10 <sup>-7</sup>	y = 0,0113 + 2,331·10 <sup>4</sup> x	0,0011	6,50·10 <sup>4</sup>	0,9981	0,0123	1,4·10 <sup>-7</sup>	4,7·10 <sup>-7</sup>
CEF	2,0	-0,55	5·10 <sup>-7</sup> – 1·10 <sup>-5</sup>	y = 0,0113 + 2,302·10 <sup>4</sup> x	0,0024	1,61·10 <sup>4</sup>	0,9996	0,0062	3,1·10 <sup>-7</sup>	1,0·10 <sup>-6</sup>
	8,4		1·10 <sup>-6</sup> – 1·10 <sup>-5</sup>	y = -0,0385 + 1,700·10 <sup>5</sup> x	0,0191	1,03·10 <sup>4</sup>	0,9932	0,0210	3,4·10 <sup>-7</sup>	1,1·10 <sup>-6</sup>

S<sub>a</sub> Standardna devijacija odsečka.

S<sub>b</sub> Standardna devijacija nagiba.

Specifičnost metode ogleda se u njenoj sposobnosti da detektuje samo ispitivan lek u prisustvu komponenata složenog biološkog materijala. Kako je urin elektrolit veoma složenog sastava, samim tim takav je i izgled njegovog AdSDP voltamograma, jer poseduje različite reduktabilne komponente. Izgled voltamograma urina složeniji je u slabo alkalnoj sredini u odnosu na kiselu, ali za određivanje metoksiimino cefalosporina od presudne je važnosti odsustvo pikova redukcije ovog elektrolita na potencijalima oko -0,5 V, na kome se prati redukcija cefalosporina nakon akumulacije na elektrodi, što potvrđuje izraženu specifičnost metode (slika 2, kriva 1).



**Slika 2. AdSDP voltamogrami: 1) urina – slepe probe; 2) uzorka realnog urina uzetog 60 min nakon intramuskularnog davanja CF; 3) realnog urina 2) uz standardni dodatak  $1 \cdot 10^{-6}$  M CF (pH 2,8;  $v=20$  mV/s;  $E_{akum} = -0,1$  V,  $t_{akum}=30$  s).**  
**Figure 2. AdSDP voltammograms of 1) blank urine sample; 2) real urine sample obtained 60 min after the intramuscular application of CF; 3) real urine sample after addition of  $1 \cdot 10^{-6}$  M CF (pH 2.8,  $v=20$  mV/s,  $E_{acc} = -0.1$  V,  $t_{acc}=30$  s).**

Osim navedenih in-vitro ispitivanja, AdSDPV metoda primenjena je i za in-vivo određivanja CF i DCF [22, 26] iz uzorka urina uzetog od pacijenata nakon intramuskularnog davanja leka. U bioanalitičkoj praksi, pri radu sa realnim uzorcima, jedan od primarnih ciljeva je skratiti i pojednostaviti proceduru pripreme uzorka. U slučaju voltametrijskog ispitivanja pokazalo se da ekstrakcija čvrstom fazom (solid phase extraction, SPE) kao metoda izolovanja cefalosporina iz urina nije neophodna. Vrednosti za „recovery” dobijene analizom ekstrahovanog uzorka i uzorka urina koji je bio samo razblažen, bile su približno iste i što je još važnije, u ispitivanim oblastima potencijala nije bilo strujnog odgovora iz kompleksnog sistema kakav je urin osim pikova redukcije ispitivanih cefalosporina (slika 2, kriva 2). Stoga je i priprema realnog uzorka podrazumevala taloženje proteina i razblaživanje, a poreklo prisutnih pikova potvrđeno je metodom standardnog dodatka (slika 2, kriva 3).

U slučaju in-vivo određivanja CF i DCF iz smeše [22] potvrđena je i dobra selektivnost metode, jer se CF i njegov aktivan metabolit DCF mogu

istovremeno određivati u realnom urinu s obzirom da daju dva dobro razdvojena voltametrijska pika koja se ne preklapaju ni nakon adsorpcije.

## **Zaključak**

Metoksiimino cefalosporini, redukuju se na površini živine elektrode u četvoroelektronskom ireverzibilnom procesu, uz jako izraženu adsorpciju na određenim pH vrednostima. Pojava specifične adsorpcije na površini živine elektrode, iskorišćena je za razvoj adsorptivnih voltametrijskih tehnika za kvantitativno određivanje metoksiimino cefalosporina.

Podaci predstavljeni u ovom radu potvrđuju da je primena adsorptivne „striping” diferencijalno pulsne voltametrije dala veoma dobre rezultate određivanja metoksiimino cefalosporina, kako in-vitro, tako i in-vivo uslovima. Metoda je validirana ispitivanjem određenih parametara kao što su osetljivost, ponovljivost, preciznost, robustnost, selektivnost i specifičnost. Rezultati određivanja ukazuju na visoku osetljivost i selektivnost AdSDPV metode, a ono što predstavlja poseban doprinos jesu jednostavnost i brzina izvođenja ove metode, pa se ona može primeniti za brzo praćenje individualne terapije kod pacijenata.

## **Zahvalnica**

Ovaj rad finansiran je od strane Ministarstva nauke Republike Srbije, projekat broj 142071.

## Literatura

1. Wilson CO, Gisvold. In: Delago JN, Remers WA . ed. Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry. Philadelphia New York London Hagerstown: Lippincott, Williams & Wilkins, 11<sup>ed</sup>, 2009.
2. El-Maali NA, Ali AMM, Ghandour MA. Electrochemical reduction and oxidation of two cephalosporin antibiotics: ceftriaxone and cefoperazone. *Electroanalysis* 1993; 5: 599-604.
3. Bernacca G, Nucci L, Pergola F. Polarographic behavior of the  $\beta$ -lactam antibiotic cefuroxime and study of the reduction mechanism in acidic media. *Electroanalysis* 1994; 6: 327-32.
4. Ogorevc B, Hudnik V, Gomiscek S. Polarographic analysis of some cephalosporin antibiotics. *Fresenius Z Anal Chem* 1988; 330: 59-64.
5. Fogg AG, Fayad NM, Burgess C, McGlynn A. Diferential pulse polarographic determiniom of cephalosporins and their degradation products. *Anal Chim Acta* 1979; 108: 205-11.
6. Altinoz S, Temizer A. Differential pulse adsorptive stripping voltammetric determination of ceftriaxone at a static mercury dropping electrode. *J Pharm Sci* 1990; 79: 351 – 53.
7. Avramov-Ivić M, Kapetanović V, Aleksić M, Zuman P. Electroreduction of cefetamet on mercury platinum and gold electrodes. *J Serb Chem Soc* 2000: 65; 47-53.
8. Dogan B, Golcu A, Dolaz M, Ozkan SA. Anodic oxidation of antibacterial drug cefotaxime sodium and its square wave and differential pulse voltammetric determination in pharmaceuticals and human serum. *Curr Pharm Anal* 2009; 5: 197-207.
9. Nigam P, Mohan S, Kundu S, Prakash R, Trace analysis of cefotaxime at carbon paste electrode modified with novel Schiff base Zn(II) complex. *Talanta* 2009; 77: 1426-31.
10. Ozkan SA, Uslu B, Zuman P. Electrochemical reduction and oxidation of the antibiotic cefepime at a carbon electrode. *Anal Chim Acta* 2002; 457: 265-74.
11. Majdi S, Jabbari A, Heli H, Yadegari H, Moosavi-Movahedi AA, Haghgoo S. Electrochemical oxidation and determination of ceftriaxone on a glassy carbon and carbon-nanotube-modified glassy carbon electrodes. *J Solid State Electrochem* 2009; 13: 407-16.
12. Yilmaz N, Biryol I. Anodic voltammetry of cefotaxime. *J Pharm Biomed Anal* 1998; 17: 1335-44.
13. Reddy TM, Sreedhar M, Reddy SJ. Voltammetric behavior of Cefixime and Cefpodoxime Proxetil and determination in pharmaceutical formulations and urine. *J Pharm Biomed Anal* 2003; 31: 811-18.
14. Ogorevc B, Krašna A, Hudnik V, Gomišček S. Adsorptive stripping voltammetry of selected cephalosporin antibiotics and their direct determination in urine. *Microchimica Acta* 1991; 103: 131-44.

15. Ozkan SA. Principles and techniques of electroanalytical stripping methods for pharmaceutically active compounds in dosage forms and biological samples. *Curr Pharm Anal* 2009; 5: 127-43.
16. El-Shaboury SR, Saleh GA, Mohamed FA, Rageh AH. Analysis of cephalosporin antibiotics. *J Pharm Biomed Anal* 2007;45: 1-19.
17. Xu Q, Yuan AJ, Zhang R, Bian X, Chen D, Hu X. Application of electrochemical methods for pharmaceutical and drug analysis. *Curr Pharm Anal* 2009; 5: 144-55.
18. Özkan SA, Uslu B, Aboul-Enein HY. Analysis of pharmaceuticals and biological fluids using modern electroanalytical techniques. *Crit Rev Anal Chem* 2003; 33: 155-81.
19. Barbosa AMJ, Trindade MAG, Ferreira VS. Cathodic stripping voltammetry determination of ceftiofur antibiotic in formulations and bovine serum. *Anal Lett* 2006; 39: 1143 – 58.
20. Altinoz S, Temizer A, Beksac S. Determination of ceftriaxone in biological material by differential-pulse adsorptive stripping voltammetry. *Analyst* 1990; 115: 873-4.
21. Patel KB, Nicolau DP, Nightingale CH, Quintiliani R. Comparative serum bactericidal activities of ceftizoxime and cefotaxime against intermediately penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Pharmacol* 1995; 22: 49-55.
22. Aleksić MM, Kapetanović V, Atanacković J, Jocić B, Zečević M. Simultaneous determination of cefotaxime and desacetylcefotaxime in real urine sample using voltammetric and high-performance liquid chromatographic methods. *Talanta* 2008; 77: 131-37.
23. Aleksić M, Milovanović Lj, Kapetanović V. Adsorptive stripping voltammetric determination of cefetamet in human urine. *J Pharm Biomed Anal* 2003; 32: 957-66.
24. Aleksić MM, Ilić M, Kapetanović V. Adsorptive properties of cefpodoxime proxetil as a tool for a new method of its determination in urine. *J Pharm Biomed Anal* 2004; 36: 899-903.
25. Aleksić MM, Kapetanović V. Voltammetric behavior and square-wave voltammetric determination of cefotaxime in urine. *J Electroanal Chem* 2006; 593: 258-66.
26. Zuman P, Kapetanović V, Aleksić MM. Recent developments in electroanalytical chemistry of cephalosporins and cefamycins. *Analytical Letters* 2000; 33: 2821-57.
27. Zuman P. *The Elucidation of Organic Electrode process*. New York: Academic Press, 1969: 20-4.
28. Zuman P. The use of polarography in the initial stages of investigations of mechanisms of organic electrode processes in aqueous solutions. *Sci Pap Univ Pardubice Ser A* 1999; 5: 5-71.

29. Kapetanović V, Aleksić M, Zuman P. Two step reduction of the O-methyloxime grouping in the antibiotic cefetamet. *J Electroanal Chem* 2001; 507: 263-9.
30. Aleksić M, Kapetanović V, Zuman P. Polarographic and voltammetric behavior of the antibiotic cefetamet: Reduction of the metoximino group. *Collect Czech Chem Commun* 2004; 69: 1429-42.
31. Erceg M, Kapetanović V, Sužnjević D, Dumanović D. Study of cephalexin and cefaclor adsorption at the mercury/solution interface by AC polarography. *Microchem J* 1997; 57: 73-80.
32. Hall DA, Berry DM, Schneider CJ. The electrochemistry of cephalosporin derivatives. Part II: Cephalotin, sodium salt. *J Electroanal Chem* 1977; 80: 155-70.
33. Kapetanović V, Aleksić M, Erceg M, Veselinović D. Electrochemical study of cefetamet-Na and its polarographic determination. *Il Farmaco* 2000; 55: 13-20.
34. Munoz E, Camacho L, Avila JL, Garcia-Blanco F. Cyclic and linear sweep voltammetry of cefazolin and cefmetazole: Electroanalytical applications. *Analyst* 1989; 114: 1611-15.
35. Munoz E, Avila JL, Perez Doctor J, Camacho L. The transfer coefficient of the electrochemical reduction of cephalosporins and cefamycins. *Electroanalysis* 1993; 5: 325-31.

# **Electrochemical behavior of methoxyimino cephalosporins and their *in-vitro* and *in-vivo* determination in urine by adsorptive stripping voltammetry**

**Mara M. Aleksic<sup>\*1</sup>, Vera Kapetanovic<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Physical Chemistry, <sup>2</sup>Institute of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Vojvode Stepe 450, 11000 Belgrade, Serbia

---

## **Summary**

In last two decades different electroanalytical methods are used for sensitive and selective determination of cephalosporins. In this paper the electrochemical behavior of methoxyimino cephalosporins, reduction mechanism and nature of the process at the mercury electrode surface is presented. Special attention is paid to the cephalosporin ability to adsorb on the electrode surface. Based on the methoxyimino cephalosporin specific adsorption on the mercury surface, the adsorptive stripping methods are established for determination of low concentration of these drugs in urine samples, both *in-vitro*, and *in-vivo*. Application of the adsorptive stripping differential pulse voltammetry (AdSDPV) for determination of cefpodoxime proksetile (CP), cefotaxime (CF), desacetylcefotaxime (DCF) and cefetamet (CEF) is summarized. The best sensitivity of *in-vitro* determination in urine was achieved for CP in acid solutions (LOD  $7.4 \cdot 10^{-9}$ M and LOQ  $2.4 \cdot 10^{-8}$ M), what is in accordance with its most pronounced adsorption properties, and followed by CF, DCF and CEF. *In-vivo* AdSDPV determination of CF and DCF is also presented. AdSDPV showed advantages over other analytical methods in simplicity of the sample preparation, and is even more sensitive and selective compared to other voltamperometric methods.

**Key words:** methoxyimino cephalosporins, reduction, adsorption, AdSDPV determination, urine.

---