

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Marija R. Čarapić

**RAZVOJ HROMATOGRAFSKIH METODA
ZA ODREĐIVANJE SADRŽAJA,
STEPENA ČISTOĆE I RETENCIONI
KARAKTERISTIKA ZIPRASIDONA
PRIMENOM EKSPERIMENTALNOG
DIZAJNA**

doktorska disertacija

Beograd, 2015.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Marija R. Čarapić

**DEVELOPMENT OF
CHROMATOGRAPHIC METHODS FOR
DETERMINATION OF ZIPRASIDONE
CONTENT, RELATED SUBSTANCES
AND RETENTION CHARACTERISTICS
USING EXPERIMENTAL DESIGN**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

MENTORI:

dr sc. Danica Agbaba, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

dr sc. Katarina Nikolić, docent
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

dr sc. Bojan Marković, docent
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

dr sc. Živoslav Lj. Tešić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija je urađena u Nacionalnoj kontrolnoj laboratoriji Agencije za lekove i medicinska sredstva Srbije i na Katedri za farmaceutsku hemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu.

Želela bih da izrazim posebnu i najtopliju zahvalnost i poštovanje svom mentoru prof. dr Agbaba Danici na velikom znanju i iskustvu koje mi je prenosila, kao i na slobodi koju sam imala u radu, dragocenim savetima i idejama, nesebičnoj pomoći i podršci u mom naučno-istraživačkom radu.

Izuzetnu zahvalnost dugujem i svom mentoru doc. dr Katarini Nikolić na svemu što me je naučila, na ogromnoj pomoći, strpljenju, savetima, bodrenju i dragocenom vremenu i trudu koji mi je posvetila u svim fazama izrade i pisanja doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem doc. dr Bojanu Markoviću na ogromnoj stručnoj pomoći i korisnim savetima u tumačenju i interpretaciji rezultata u delu istraživanja koje se odnosi na LC-MS eksperimente.

Zahvaljujem se dr Adamu Smolinskom na stručnoj pomoći u delu istraživanja koji se odnosi na PCA i HCA analize.

Zahvaljujem se prof. dr Živoslavu Tešiću na svesrdnoj pomoći i korisnim savetima tokom završne izrade doktorske disertacije.

Posebno se zahvaljujem svojim ćerkama Mili i Maši, suprugu Milanu, sestri Mileni i roditeljima Snežani i Radomiru za strpljenje, svu ljubav i podršku koju su mi pružili, zato ovu doktorsku disertaciju posvećujem njima.

**RAZVOJ HROMATOGRAFSKIH METODA ZA ODREĐIVANJE
SADRŽAJA, STEPENA ČISTOĆE I RETENCIONI
KARAKTERISTIKA ZIPRASIDONA PRIMENOM
EKSPERIMENTALNOG DIZAJNA**

REZIME

Ziprasidon je novi atipični antipsihotik, derivat benzoizotiazol piperazinilindolona koji se koristi u tretmanu šizofrenije i akutnim manijačnim epizodama povezanim sa bipolarnim poremećajima. Primarno deluje kao antagonista serotoninских i dopaminskih receptora, i kao inhibitor preuzimanja noradrenalina. Ziprasidon ima jedinstven profil vezivanja za receptore što doprinosi terapijskim efektima i slabije izraženim neželjenim dejstvima.

U ovoj doktorskoj disertaciji izvršen je razvoj i optimizacija metoda reverzno-fazne tečne hromatografije za određivanje sadržaja i retencionh karakteristika ziprasidona i njegovih nečistoća (I-V) različite polarnosti primenom više metoda eksperimentalnog dizajna. Izvršeno je ispitivanje kvantitativnog odnosa strukture i retencije analiziranih jedinjenja u sistemu reverzno-fazne tečne hromatografije pod visokim pritiskom - RP-HPLC (*Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography*) i formiran je QSRR (*Quantitative Structure Retention Relationship*) model na osnovu kojeg je moguće predvideti retenciju novih derivata ziprasidona. U toku optimizacije RP-HPLC metode detektovana je *nepoznata nečistoća* čija je struktura karakterisana masenom spektrometrijom.

Optimizacija RP-HPLC-UV metode je izvršena u dve faze: optimizacijom mobilne faze i ispitivanjem selektivnosti RP stacionarnih faza, pri odabranim eksperimentalnim uslovima, u odnosu na ziprasidon i njegove nečistoće. Ispitan je uticaj temperature stacionarne faze, pH, koncentracije pufera i organskog modifikatora na rezoluciju i faktore selektivnosti kritičnih parova. Optimalni hromatografski uslovi za razdvajanje složene smeše ispitivanih supstanci su dobijeni primenom linearne regresione metode parcijalno najmanjih kvadrata - PLS (*Partial Least Squares*) i

nelinearne metode veštačkih neuronskih mreža sa višeslojnim perceptronom - ANN-MLP (*Artificial Neural Network - Multilayer Perceptrons*). Određene su RP stacionarne faze posebno selektivne za efikasno razdvajanje ziprasidona i strukturno sličnih jedinjenja primenom analize osnovnih komponenti - PCA (*Principal Component Analysis*) i analize hijerarhijskog grupisanja – HCA (*Hierarchical Clustering Analysis*).

Primenom linearnih (PLS) i nelinearnih statističkih metoda (ANN-MLP) formirani su QSRR modeli kojima su definisani kvantitativni odnosi između retencije i hemijske strukture derivata ziprasidona u RP-HPLC sistemu. Najznačajniji molekularni deskriptori u QSRR modelima opisuju retencijske karakteristike ispitivanih jedinjenja. Poređenjem validacionih parametara QSRR modela regresioni PLS-QSRR model se pokazao kao pouzdaniji u odnosu na ANN –QSRR.

PLS-QSRR modelom je predviđeno retenciono vreme deset (TS1-TS10) derivata ziprasidona (pratećih organskih nečistoća, metabolita i potencijalnih degradacionih proizvoda) u RP-HPLC sistemu. Na osnovu dobijenih rezultata predložene su dve potencijalne strukture za *nepoznatu nečistoću*, a jedna od njih (TS1) je potvrđena karakterizacijom tripl kvadrupolskim masenim analizatorom čime je eksperimentalno utvrđena tačnost predviđanja PLS-QSRR modela.

Razvijena je brza i osetljiva metoda tačne hromatografije pod ultravisokim pritiskom sa masenom detekcijom - UPLC-MS-MS (*Ultra Performance Liquid Chromatography Tandem Mass-Spectrometry*) za ispitivanje ziprasidona i nečistoća I-V uz istovremenu mogućnost karakterizacije nepoznatih nečistoća. Primenom PLS metode, hromatografske funkcije odgovora – CRF (*Chromatographic Response Function*) i eksponencijalne hromatografske funkcije – CEF (*Chromatographic Exponential Function*) ispitan je uticaj hromatografskih faktora (pH, temperatura stacionarne faze, protoka mobilne faze) na hromatografsko ponašanje ispitivanih supstanci i *nepoznate nečistoće* u UPLC-MS-MS sistemu i odabrani su optimalni uslovi za njihovo razdvajanje i brzo određivanje. Optimizacijom UPLC-MS-MS metode postignuto je razdvajanje *nepoznate nečistoće* od ostalih i posebno je praćen njen mehanizam fragmentacije. Na osnovu vrednosti m/z za molekularni jon i predloženog mehanizma fragmentacije predložena je najverovatnija struktura *nepoznate nečistoće*.

Optimizovane metode (RP-HPLC-UV i RP-UPLC-MS-MS) su validirane tj. ispitana je specifičnost, selektivnost, linearnost, tačnost, preciznost, određeni su robusnost i limiti kvantifikacije i detekcije.

Ključne reči: ziprasidon, RP-HPLC-UV, RP-UPLC-MS-MS, QSRR, PLS, ANN-MLP, PCA, HCA, CRF, CEF.

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutska hemija

UDK broj: 615.21:543.544.5:001.891.54(043.3)

DEVELOPMENT OF CHROMATOGRAPHIC METHODS FOR DETERMINATION OF ZIPRASIDONE CONTENT, RELATED SUBSTANCES AND RETENTION CHARACTERISTICS USING EXPERIMENTAL DESIGN

ABSTRACT

Ziprasidone is a novel atypical antipsychotic drug, benzisothiazol piperazinyl indolone derivative, which is used for the treatment of schizophrenia and for the acute maniac or mixed episodes associated with bipolar disorder. Primarily, it acts through the serotonergic and dopaminergic receptor antagonism, but also as an inhibitor of the norepinephrine reuptake. Ziprasidone has a unique human receptor binding profile which may be related to its clinical effectiveness with a low propensity for side effects.

In the framework of this doctoral dissertation, development and optimization of reversed phase liquid chromatographic methods for determination of ziprasidone content, related substances and retention characteristics of ziprasidone and its impurities (I-V), significantly different in polarity, were performed with use of several methods of experimental design. Quantitative Structure Retention Relationships (QSRR) of these compounds in RP-HPLC system were performed and appropriate mathematical QSRR models able to predict retention of new ziprasidone derivatives were developed. During the optimization of the RP-HPLC method, an *unknown impurity* has been detected, which was successfully characterized with use of tandem mass spectrometry.

Optimization of the RP-HPLC-UV method was performed in two stages: optimization of mobile phase and investigation of selectivity of RP columns under selected experimental conditions towards ziprasidone and its five main impurities and the *unknown impurity*. The influence of different chromatographic factors (buffer pH, column temperature, buffer and organic modifier concentration) on the resolution and selectivity factors of critical peak pairs were investigated. The optimal chromatographic conditions for the separation of complex mixture of investigated substances were obtained with use of the Partial Least Square (PLS) regression analysis and non-linear

statistical method Multi Layer Perceptron Artificial Neural Networks - ANN-MLP. The RP-columns selective for the efficient separation of ziprasidone and its structurally related compounds were defined by use of the Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Clustering Analysis (HCA).

Linear (PLS) and non-linear (ANN-MLP) methodologies have been applied to build the QSRR models, which define quantitative relationships between the chemical structure and the retention of the investigated compounds in the RP-HPLC system. The most significant molecular descriptors in the selected QSRR models describe the retention behaviour of the investigated compounds. Validation parameters of the QSRR models indicated on the PLS-QSRR model as significantly better than the ANN-QSRR model.

The developed PLS-QSRR model was used to predict separation of ten (TS1-TS10) ziprasidone derivatives (organic impurities, metabolites and potential degradation products) in RP-HPLC system. Based on the obtained results, the PLS-QSRR model proposed two structures as potential for *unknown impurity*, and one of them (TS1) was confirmed by UPLC-MS-MS (*Ultra Performance Liquid Chromatography Tandem Mass-Spectrometry*) study. These results have confirmed the high prediction potential of the created QSRR model.

Rapid and sensitive UPLC-MS-MS method was developed for simultaneous quantification of the ziprasidone and its five impurities, and also for characterization of an *unknown impurity*. The influence of chromatographic factors (pH, column temperature, flow rate of mobile phase) on the chromatographic behaviour of the substances and *unknown impurity* in the UPLC system was investigated with use of PLS method, Chromatographic Response Function (CRF) and Chromatographic Exponential Function (CEF). Based on the result of the study the optimal conditions for separation and rapid quantitation of ziprasidone and its components were defined. Very good separation of unknown impurity from other compounds enabled successful investigation of its fragmentation mechanism. Structure of unknown impurity was finally proposed based on *m/z* ratio of precursor ion and elucidated fragmentation mechanism.

Both developed methods (RP-HPLC-UV and RP-UPLC-MS-MS) were successfully validated for selectivity, sensitivity, linearity, precision, accuracy and robustness.

Keywords: ziprasidone, RP-HPLC-UV, RP-UPLC-MS-MS, QSRR, PLS, ANN-MLP, PCA, HCA, CRF, CEF.

Scientific field: Pharmacy

Narrow scientific field: Pharmaceutical chemistry

UDK number: 615.21:543.544.5:001.891.54(043.3)

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
1.1. NOVI ANTIPSIHOTIK DRUGE GENERACIJE – ZIPRASIDON	2
1.1.1. Definicija, etiologija, receptori i neurotransmiteri u šizofreniji	2
1.1.2. Farmakoterapija šizofrenije	4
1.1.2.1. Prva generacija (tipičnih) antipsihotika.....	5
1.1.2.2. Druga generacija (atipičnih) antipsihotika	5
1.1.3. Ziprasidon – mehanizam dejstva, terapijske indikacije i metabolizam.....	6
1.1.4. Struktura i farmaceutsko-hemijske osobine ziprasidona	11
1.1.5. Farmaceutsko-hemijska čistoća ziprasidona	13
1.1.6. Analitičke metode za ispitivanje ziprasidona.....	18
1.2. PRIMENA EKSPERIMENTALNOG DIZAJNA U ISPITIVANJU HROMATOGRAFSKOG PONAŠANJA ZIPRASIDONA I NJегоVIH NEČISTOĆA.....	24
1.2.1. Metoda parcijalnih najmanjih kvadrata.....	27
1.2.2. Veštačke neuronske mreže.....	30
1.2.3. Analiza osnovnih komponenti	33
1.2.4. Analiza hijerarhijskog grupisanja	36
1.2.5. Hromatografske funkcije.....	39
1.3. KVANTITATIVNI ODNOSI STRUKTURE I RETENCIJE (QSRR) DERIVATA ZIPRASIDONA.....	41
1.3.1. Formiranje modela	44
1.3.1.1. Molekulski deskriptori	44
1.3.1.2. Statističke metode za izbor molekulskih dekriptora i formiranje QSRR modela.....	47
1.4. VALIDACIJA MODELA	49

2. CILJ RADA	53
3. EKSPERIMENTALNI DEO	55
3.1. OPREMA, HEMIHALIJE I RAČUNARSKI PROGRAMI	56
3.1.1. Oprema.....	56
3.1.2. Hemikalije.....	57
3.1.3. Računarski programi	58
3.2. PRIPREMA RASTVORA ZA OPTIMIZACIJU RP-HPLC METODE	59
3.2.1. Priprema rastvora ispitivanih supstanci	59
3.2.2. Priprema mobilnih faza	60
3.3. PRIPREMA RASTVORA ZA VALIDACIJU RP-HPLC METODE	61
3.3.1. Priprema rastvora za ispitivanje selektivnosti metode.....	61
3.3.2. Priprema rastvora za ispitivanje linearnosti metode	61
3.3.3. Priprema rastvora za ispitivanje limita detekcije i limita kvantifikacije .	62
3.3.4. Priprema rastvora za ispitivanje tačnosti metode.....	62
3.3.5. Priprema rastvora za ispitivanje preciznosti metode.....	63
3.3.6. Priprema mobilnih faza za ispitivanje robusnosti	63
3.3.7. Hromatografski uslovi.....	63
3.4. PRIPREMA RASTVORA ZA OPTIMIZACIJU RP-UPLC METODE	63
3.4.1. Priprema rastvora ispitivanih supstanci	63
3.4.2. Priprema mobilnih faza	65
3.5. PRIPREMA RASTVORA ZA VALIDACIJU RP-UPLC METODE	65
3.5.1. Priprema rastvora za ispitivanje selektivnosti metode.....	65
3.5.2. Priprema rastvora za ispitivanje linearnosti metode	65
3.5.3. Priprema rastvora za ispitivanje limita detekcije i limita kvantifikacije..	66
3.5.4. Priprema rastvora za ispitivanje tačnosti metode.....	66
3.5.5. Priprema rastvora za ispitivanje preciznosti metode.....	66

3.5.6. Priprema mobilnih faza za ispitivanje robusnosti	67
3.5.7. Hromatografski uslovi.....	67
3.6. METODE EKSPERIMENTALNOG DIZAJNA KORIŠĆENE U ISPITIVANJU RP-HPLC HROMATOGRAFSKOG PONAŠANJA ZIPRASIDONA I NJEGOVIH NEČISTOĆA.....	68
3.6.1. Optimizacija mobilne faze	69
3.6.2. Ispitivanje selektivnosti RP stacionarnih faza	69
3.7. METODE EKSPERIMENTALNOG DIZAJNA KORIŠĆENE U ISPITIVANJU RP-UPLC HROMATOGRAFSKOG PONAŠANJA ZIPRASIDONA I NJEGOVIH NEČISTOĆA.....	71
3.8. QSRR STUDIJA DERIVATA ZIPRASIDONA.....	72
3.8.1. Optimizacija konformacije ispitivanih jedinjenja	72
3.8.2. Izračunavanje molekulskih deskriptora	72
3.8.3. Statističke metode korišćene za formiranje QSRR modela	73
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	75
4.1. RAZVOJ I OPTIMIZACIJA RP-HPLC METODE ZA ODREĐIVANJE ZIPRASIDONA I NJEGOVIH NEČISTOĆA.....	76
4.1.1. Preliminarna ispitivanja	76
4.1.2. Optimizacija hromatografskih uslova.....	84
4.1.2.1. Optimizacija mobilne faze.....	84
4.1.2.1.1. Metoda parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS) u modelovanju RP-HPLC sistema za ispitivanje ziprasidona i njegovih nečistoća.....	84
4.1.2.1.2. Veštačke neuronske mreže (ANN) u modelovanju RP-HPLC sistema za ispitivanje ziprasidona i njegovih nečistoća.....	96

4.1.2.2. Određivanje selektivnosti RP stacionarnih faza u odnosu na ziprasidon i njegove nečistoće.....	108
4.1.2.2.1. Analiza osnovnih komponenti (PCA) pri određivanju selektivnosti RP stacionarnih faza u odnosu na ziprasidon i njegove nečistoće.....	112
4.1.2.2.2. Analiza hijerarhijskog grupisanja (HCA) pri određivanju selektivnosti RP stacionarnih faza u odnosu na ziprasidon i njegove nečistoće.....	119
4.2. VALIDACIJA RP-HPLC METODE ZA ODREĐIVANJE ZIPRASIDONA I NJEGOVIH NEČISTOĆA.....	124
4.3. QSRR STUDIJE DERIVATA ZIPRASIDONA	134
4.3.1. QSRR analiza	135
4.3.2. Primena QSRR modela za predviđanje retencije Test set jedinjenja.....	144
4.4. KARAKTERIZACIJA NEPOZNATE DEGRADACIONE NEČISTOĆE PRIMENOM MASENE SPEKTROSKOPIJE	147
4.4.1. Optimizacija uslova na masenom detektoru	147
4.4.2. Fragmentacija ziprasidona i njegovih nečistoća.....	150
4.5. RAZVOJ I OPTIMIZACIJA UPLC METODE ZA ODREĐIVANJE ZIPRASIDONA I NJEGOVIH NEČISTOĆA.....	162
4.5.1. Preliminarna ispitivanja	163
4.5.2. Optimizacija hromatografskih uslova	168
4.5.2.1. Metoda parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS) u modelovanju RP-UPLC sistema za ispitivanje ziprasidona i njegovih nečistoća.....	168
4.5.2.2. Hromatografska funkcija odgovora- CRF i eksponencijalna hromatografska funkcija - CEF u modelovanju RP-UPLC sistema za ispitivanje ziprasidona i njegovih nečistoća.....	175

4.6. VALIDACIJA RP-UPLC METODE ZA ODREĐIVANJE ZIPRASIDONA I NJEGOVIH NEČISTOĆA.....	181
5. ZAKLJUČAK	190
6. LITERATURA.....	194
7. PRILOZI.	216
8. BIOGRAFIJA.....	225

LISTA SKRAĆENICA:

ACN – acetonitril

AHC - *Agglomerative Hierarchical Clustering* (aglomerativna hijerarhijska analiza)

ANN - *Artificial Neural Network* (veštačke neuronske mreže)

AP - antipsihotik

BCS - *Biopharmaceutics Classification System*

BDD - *boron-doped diamond electrodes*

BP - *Back Propagation*

CAD - *Collision Activated Dissociation* (sudarom aktivirana disocijacija)

CD – ciklodekstrin

CEF - *Chromatographic Exponential Function* (eksponencijalna hromatografska funkcija)

CRF - *Chromatographic Response Function* (hromatografska funkcija odgovora)

CV - *Cross Validation*

DFT - *Density Functional Theory*

E_{coll} – kolizijska energija

EPS - ekstrapiramidalni sindrom

FDA - *Food and Drug Administration*

FIA - *Flow Injection Analysis*

GA - *Genetic Algorithm*

GC - *glassy carbon electrodes*

GPCR – *G protein-coupled receptor*

HBA - *Hydrogen Bond Acceptor* (broj akceptora vodikove veze)

HBD - *Hydrogen Bond Donor* (broj donora vodikove veze)

HCA - *Hierarchical Clustering Analysis* (analiza hijerarhijskog grupisanja)

HESI - elektrosprej jonizacija na povišenoj temperaturi

HOMO - *Highest Occupied Molecular Orbital* (najviša popunjena molekulska orbitala)

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* (tečna hromatografija pod visokim pritiskom)

HPTLC – *High Performance Thin Layer Chromatography* (visoko efikasna tankoslojna hromatografija)

ICH - *International Conference on Harmonisation*

LC-MS-MS – *liquid chromatography - tandem mass spectrometry* (kuplovana tečna hromatografija sa maseno-masenom spektrometrijom)

LOD – limit detekcije

LOO-CV - *Leave-One-Out Cross Validation*

LOQ – limit kvantifikacije

LUMO - *Lowest Unoccupied Molecular Orbital* (najniža nepopunjena molekulska orbitala)

LV - latentna varijabla

MLP - *Multilayer Perceptrons* (višeslojni perceptron)

MLR - *Multilinear Regression* (multilinearna regresija)

MR – Molarna refraktivnost

MS - *Connolly Molecular Area* (molekulska površina)

NP-HPLC - normalno fazna tečna hromatografija pod visokim pritiskom

NRI - *Noradrenaline Reuptake Inhibitor*

PC - *Principal Component* (osnovna komponenta)

PCA - *Principal Component Analysis* (analiza osnovnih komponenti)

PLS - *Partial Least Squares* (metoda parcijalnih najmanjih kvadrata)

PRESS - *Predicted Residual Sum of Squares* (predviđene rezidualne sume kvadrata)

PSA - *Polar Surface Area* (površina polarnog dela molekule)

QSAR - *Quantitative Structure Activity Relationships* (kvantitativni odnosi strukture i aktivnosti)

QSPR - *Quantitative Structure Property Relationship* (kvantitativni odnosi strukture i osobina)

QSRR - *Quantitative Structure Retention Relationships* (kvantitativni odnosi strukture i retencije)

RMSEE - *Root Mean Square Error of Estimation* (srednja kvadratna greška procene)

RMSEP - *Root Mean Square Error of Prediction* (srednja kvadratna greška predviđanja)

RP - HPLC - reverzno-fazna tečna hromatografija pod visokim pritiskom

Rs – rezolucija

RSD - relativna standardna devijacija

SAS - *Connolly Accessible Area* (površina dostupna rastvaraču)

SBE β CD - *sulfobutylether- β -cyclodextrin*

SD - standardna devijacija

SIM - *Selective Ion Monitoring*

SRM - *Selected Reaction Monitoring*

SSRI - *Selective Serotonin Reuptake Inhibitor*

SSTo – *Total Sum of Square* (ukupna suma kvadrata)

TDM - *Therapeutic Drug Monitoring*

TEA - trietanolamin

TIC - *Total Ion Chromatogram*

TL - *Tube Lens*

TLC - *Thin Layer Chromatography* (tankoslojna hromatografija)

t_R - retenciono vreme

TTC - *Threshold of Toxicological Concern*

UPLC – *Ultra Performance Liquid Chromatography* (tečna hromatografija pod ultra visokim pritiskom)

UPLC-MS-MS - kuplovana tečna hromatografija pod ultra visokim pritiskom sa maseno-masenom spektroskopijom

UV - spektrofotometrija u ultraljubičastoj oblasti

VIP - *Variable Importance in the Projection*

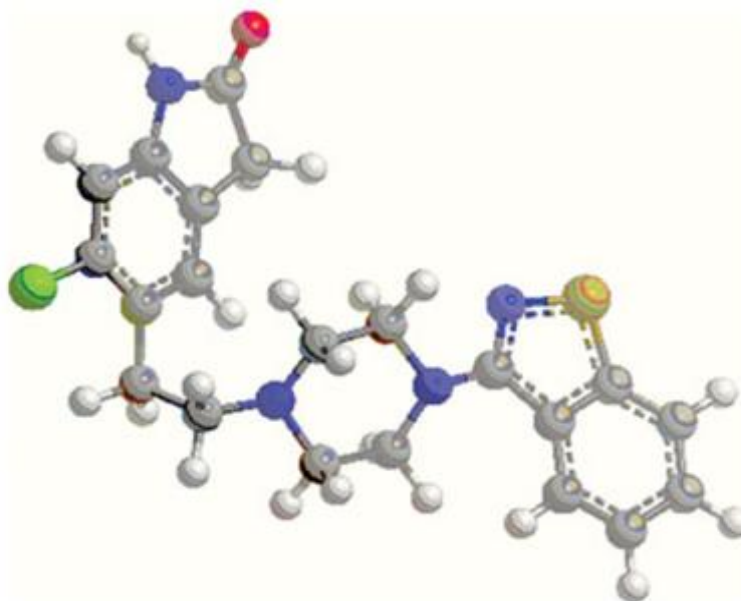
VIS - spektrofotometrija u vidljivoj oblasti

α – faktor selektivnosti

1. UVOD

1.1. NOVI ANTIPSIHOTIK DRUGE GENERACIJE – ZIPRASIDON

Ziprasidon je antipsihotik (AP) nove generacije, derivat benzoizotiazol piperazinilindolona, koji ima strukturne karakteristike hibridne molekule, antipsihotika iz grupe butirofenona i trazodonu sličnog antidepresiva [1]. Nastao je modifikacijama strukture hemijski srodnog antipsihotika tiospirona [2].



Slika 1. Hemijska struktura ziprasidona

Ziprasidon-hidrochlorid se kao oralna formulacija (kapsule) koristi od 2001. godine kada je kao peti atipični AP odobren od strane Američke agencije za hranu i lekove (*Food and Drug Administration*, FDA) u terapiji šizofrenije. Brzo-delujuća intramuskularna injekcija ziprasidon-mezilata je bila prva formulacija atipičnog AP za parenteralnu upotrebu u terapiji akutnih maničnih epizoda ili mešanih epizoda kod pacijenata koji boluju od šizofrenije. Ova parenteralna formulacija ziprasidona je odobrena 2002. godine od strane FDA, dok je 2006. godine odobrena oralna suspenzija ovog antipsihotika.

1.1.1. Definicija, etiologija, receptori i neurotransmiteri u šizofreniji

Definicija šizofrenije je nastala pre oko 100 godina od strane nemačkog psihijatra Emil Kraepelina, a savremena definicija potiče iz Dijagnostičkog i statističkog priručnika za mentalne poremećaje (DSM-IV-TR) [3]. Dijagnostički kriterijum za

šizofreniju je prisustvo karakterističnih simptoma (dva ili više od navedenih) tokom jednog meseca, ili kraće ako su lečeni. *Pozitivni simptomi* šizofrenije su: pogrešna procena stvarnosti - sumanutost, vizuelne ili zvučne halucinacije, neobičan i nepovezan govor, dezorganizovano ili katatono ponašanje, dok *negativni simptomi* obuhvataju: slabljenje ili gubitak niza afektivnih i motivacijskih funkcija (gubitak motivacije, interesovanja, oskudan govor, smetnje u pamćenju, nesposobnost doživljavanja zadovoljstva). Vremenom se javlja i socijalna disfunkcija u jednoj ili više oblasti, npr. rad, međuljudski odnosi ili briga o samome sebi. Kontinuirani znakovi poremećaja javljaju se tokom najmanje 6 meseci. Prema DSM-IV-TR parametrima oko 1% svetske populacije boluje od šizofrenije.

Etiologija nastanka šizofrenije nije u potpunosti razjašnjena [1], ali je poznato nekoliko faktora koji dovode do nastanka ove bolesti:

- Genetski faktori – aktuelni epidemiološki dokazi ukazuju da je različita individualna sklonost ka šizofreniji uzrokovana malim do umerenim efektima alela na više gena [4].
- Faktori sredine – istraživanja su fokusirana na prenatalne i perinatalne faktore rizika za oštećenje mozga (npr. akušerske komplikacije, epidemija gripa, neuhranjenost, inkompatibilnost Rh faktora).
- Interakcije genetskih i faktora sredine – ovi faktori su povezani najviše inflamatornim procesima, tj. medijatorima inflamacije – citokinima (mogu izazvati neurodegenerativne promene).
- Neuroanatomska hipoteza podrazumeva povećani volumen moždanih komora.
- Oksidativni stres – nastaje usled poremećene ravnoteže između produkcije slobodnih radikala i efikasnosti antioksidativnih enzima kod pacijenata obolelih od šizofrenije [5]. Pojedini atipični AP (olanzapin, aripiprazol i ziprasidon) su pokazali antioksidativno (neuroprotektivno) dejstvo *in vitro*.
- Neurohemijske promene – promene u dopaminergičkoj transmisiji u mozgu (**dopaminska hipoteza**) proučavaju se više od 30 godina. Smatra se da bolest nastaje kao posledica povećanja dopaminergičke neurotransmisije, a ovu hipotezu podržava činjenica da većina AP deluje tako da je smanjuje. Međutim, nedavne studije su pokazale da su svi AP koji se koriste na klinikama inverzni agonisti ili parcijalni agonisti D₂ tipa dopaminskih receptora i da se biohemijski i klinički efekti ne mogu objasniti jednostavnom blokadom D₂ receptora. Uvođenje novih *atipičnih antipsihotika*

koji pored interakcije sa dopaminskim receptorima deluju i na adrenergičke i serotoninске receptore ukazuje da šizofrenija podrazumeva znatno kompleksnije promene u odnosu na dopaminsku hipotezu.

Dopaminski receptori. Postoji pet vrsta dopaminskih receptora koji funkcionalno pripadaju familiji G-protein receptora (engl. *G protein-coupled receptor* - GPCR) i klasifikovani su kao D₁ tip (D₁ i D₅) i D₂ tip (D₂, D₃, D₄). Smatra se da bi razvoj veoma selektivnih lekova za D₃ podtip receptora, sa prioritonom *limbičkom antidopaminergičkom aktivnošću* (emocije, ponašanje, pamćenje) i sa oskudnom aktivnošću na *ekstrapiramidalnim bazalnim ganglijama nigrostriatuma* (lokomotorna koordinacija), verovatno smanjio neurološki poremećaj pokreta - ekstrapiramidalni sindrom (EPS) koji je neželjeno dejstvo terapije antipsihoticima. Tipični AP deluju u oba moždana regiona na D₂ tipu receptora. Prema dopaminskoj hipotezi povećana dopaminergička transmisija doprinosi pozitivnim simptomima šizofrenije [6].

Pored D₂ tipa pre- i postsinaptičkih receptora u nastanak oboljenja su uključeni i drugi receptori kao što su: adenoziński (A₂) [7], histaminski (H₁) [8], i serotoninски [9], koji mogu da moduliraju sintezu i oslobađanje dopamina, kao i adrenergički (α₂) receptori koji smanjuju oslobađanje noradrenalina u limbičkoj strukturi hipokampusа. Pozitivan efekat u terapiji šizofrenije ostvaruju lekovi koji pored dejstva na dopaminske D₂ receptore deluju i na serotoninске receptore. Pokazano je da je 5-HT_{2A} antagonizam ili inverzni agonizam, 5-HT_{2C} agonizam i odsustvo dejstva na 5-HT_{2B} optimalna kombinacija za postizanje antipsihotičkog efekta [10].

1.1.2. Farmakoterapija šizofrenije

Najviše korišćeni lekovi u terapiji šizofrenije su AP odnosno neuroleptici. Uslov za dejstvo je prisustvo tercijarne amino grupe na specifičnoj udaljenosti od aromatičnog prstena kako bi došlo do interakcije protonovane amino grupe ili aromatičnog prstena sa dopaminskim odnosno serotoninским receptorima. Na osnovu mehanizma dejstva neuroleptici se dele na:

- **Tipične** tj. antipsihotike “**prve generacije**”- relativno snažni antagonisti D₂ tipа dopaminskih postsinaptičkih receptora, sa veoma izraženom sklonošću ka ekstrapiramidalnim neželjenim dejstvima (EPS) s obzirom na blokadu D₂ receptora u nigrostrijatumu.

- **Atipične**, antipsihotike “**druge generacije**”- koji deluju i na druge receptore ili imaju dodatno dejstvo u odnosu na D₂ postsinaptičku blokadu. Imaju slabije izražen afinitet za D₂ receptore i u manjoj meri izazivaju poremećaje kretanja (EPS).

Nedavne studije pokazuju da je razlika između prve i druge generacije AP, kao i između AP druge generacije u vrsti i intenzitetu neželjenih efekata.

1.1.2.1. Prva generacija (tipičnih) antipsihotika

Terapija AP prve generacije koristi pacijentima obolelim od šizofrenije ili drugih psihičkih bolesti kod kojih se manifestuje uznemirenost, agresivno i impulsivno ponašanje, i oštećeno rasuđivanje. Pozitivni simptomi se bolje leče ovim AP (umiruju, stabilizuju raspoloženje, imaju antihalucinogeni efekat), dok se lečenje negativnih simptoma bolje postiže atipičnim AP. Osnovna podela tipičnih AP je na sledeće terapijske grupe:

- derivati fenotiazina (hlorpromazin, tioridazin, mesoridazin, flufenazin)
- derivati tioksantena (tiotiksen, flupentiksol, zuklopentiksol)
- derivati butirofenona (haloperidol, spiperon, trifluoperidol, droperidol)
- derivati difenilbutilpiperidina (pimozid, penfluoridol, fluspirilen)
- derivati benzamida (sulpirid, amisulpirid, remoksipirid)

Ekstrapiramidalni sindrom (EPS) se smatra najozbiljnijim neželjenim efektom i javlja se kod 30-50% pacijenata koji primaju standardne doze ovih neuroleptika, a nastaje u toku prve do osme nedelje terapije. EPS podrazumeva sledeće simptome: akutna distonija (mišićne kontrakcije/grčeve), akatizija (telesni nemir), parkinsonizam (tremor i ukočenost mišića), a kod pacijenata sa produženom upotrebom tradicionalnih AP javlja se tardivna diskinezija (nevoljni pokreti npr. lica, usana-grimase, jezika, očnih kapaka, ekstremiteta, trupa). EPS može da utiče na smanjenje komplijanse ili nastavka korišćenja lekova, čime se povećava mogućnost ponovnog javljanja simptoma bolesti [6].

1.1.2.2. Druga generacija (atipičnih) antipsihotika

Mehanizam dejstva. Smatra se da efikasnost ovih lekova potiče od interakcije sa serotoninским 5-HT_{2A} i dopaminskim D₂ receptorima. Takođe, deluju i na serotoninским 5-HT_{1A}, 5-HT₆ i/ili 5-HT₇, adrenergičkim α_1/α_2 , muskarinskim (M₁, M₅)

i/ili histaminskim H_1 receptorima u mozgu, što se smatra da ima psihoterapijski efekat kod negativnih simptoma [11,12]. Uvedeni su u terapiju 1990. godine i prvi klinički primenjen bio je derivat dibenzodiazepina, klozapin. Neuroanatomske i neurofiziološke interakcije između dopaminergičkog i serotonininskog sistema i saznanje da nekoliko benzazepinskih AP ima visok afinitet za $5-HT_{2A}$ dovele su do zaključka da je kombinovani antagonizam $D_2/5HT_{2A}$ potreban za efikasno dejstvo leka u šizofreniji. Kombinovanjem hemijskih struktura potentnih D_2 antagonista iz grupe benzamida (npr. remoksipirid), sa hemijskim strukturama $5HT_{2A}$ antagonista, derivata benzoizotiazolilpiperazina (npr. tiospiron), dobijena je struktura 3-(4-piperidinil)-1,2-benzoizoksazola odnosno **3-(4-piperazinil)-1,2-benzoizotiazola** koja je prisutna u $5HT_{2A}/D_2$ antagonistima risperidonu odnosno **ziprasidonu**. Atipični AP se prema strukturi dele na:

- triciklične antipsihotike, derivate benzazepina sa sedmočlanim prstenom u sredini: dibenzodiazepini (klozapin), dibenzoksazepini (loksapin, amoksapin), tienobenzodiazepini (olanzapin), dibenzotiazepini (kvetiapin) i srodni analozi derivati dibenzoksepina (asenapin)
- derivate benzoizoksazola (risperidon, paliperidon, iloperidon)
- derivate benzoizotiazola (tiospiron, ziprasidon, lurazidon)

U terapiji atipičnim AP postoji rizik od pojave *metaboličkog sindroma* što podrazumeva gojaznost, povišenu insulinsku rezistenciju, hiperlipidemiju i rizik za razvoj kardiovaskularnih bolesti i dijabetesa tip II. Mehanizam nastanka ovih metaboličkih neželjenih efekata nije poznat, ali se pretpostavlja da nastaju usled interakcije sa serotoninским $5-HT_{2C}$ i/ili histaminskim H_1 receptorima (antagonizam ili inverzni agonizam) [10,13-15].

1.1.3. Ziprasidon – mehanizam dejstva, terapijske indikacije i metabolizam

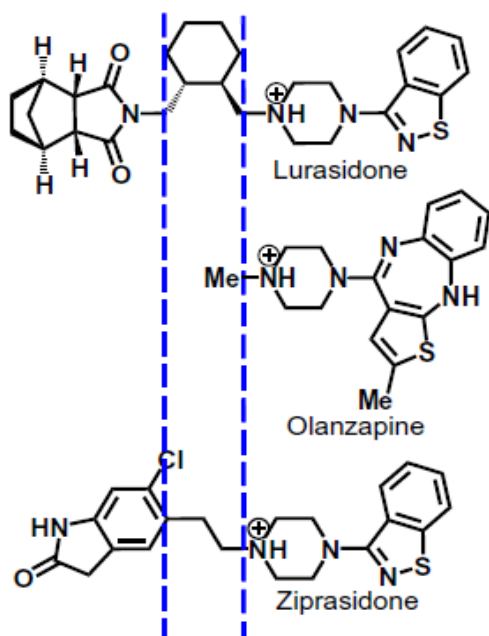
Mehanizam dejstva. Ziprasidon je jedan od najlipofilnijih AP i u velikom procentu prolazi krvno-moždanu barijeru, ali mehanizam transporta nije poznat. Farmakokinetičke studije su pokazale da je 99% leka vezano za proteine plazme i da ne postoji značajna korelacija između koncentracije slobodnog leka u plazmi i mozgu [16].

Ziprasidon ima jedinstven profil vezivanja za receptore [17,18] što dovodi do terapijskih efekata kod pozitivnih, negativnih i afektivnih simptoma šizofrenije, sa

ujedno slabije izraženim neželjenim dejstvima (EPS, smanjenje kognitivnih funkcija, gojaznost, skoro bez uticaja na nivoe glukoze, masti i prolaktina) [2,19]. Ziprasidon pokazuje snažan antagonizam na 5HT_{2A} (1000 puta veći nego za D₂), 5HT_{2C}, 5HT_{1D}, 5HT_{1A} i D₂ receptorima, kao i na adrenergičkim α_1/α_2 i histaminskim H₁ receptorima. Ovaj lek deluje kao selektivni inhibitor preuzimanja serotonina (engl. *Selective Serotonin Reuptake Inhibitor*, SSRI) i inhibira serotoninski transportni sistem, a takođe inhibira i preuzimanje noradrenalina (engl. *Noradrenaline Reuptake Inhibitor*, NRI) [20]. Uprkos značajnoj aktivnosti na 5HT_{1C} i H₁ receptorima ziprasidon ne dovodi do značajnog povećanja telesne mase, koncentracije triglicerida i holesterola u krvi ili do drugih metaboličkih promena [6,16,19,21].

Vršeno je ispitivanje selektivnosti i tipova interakcija lurazidona sa D₂, H₁ i M₁ receptorima u odnosu na ziprasidon i olanzapin različitim kompjuterskim metodama i prikazano je da je zajednička specifična interakcija za ziprasidon i receptore D₂ i H₁ tzv. *soni most* između pozitivno naelektrisanog tercijarnog azota piperazina i karboksilne grupe asparaginske kiseline, a da se veći afinitet ziprasidona za H₁ receptore u odnosu na lurazidon tumači prisustvom fleksibilnog i nevoluminoznog etilenskog mosta i planarnom strukturom 6-hloro-2-indolinona (Slika 2.) [22].

TM1/2/7 interakcije TM3/6/5 interakcije



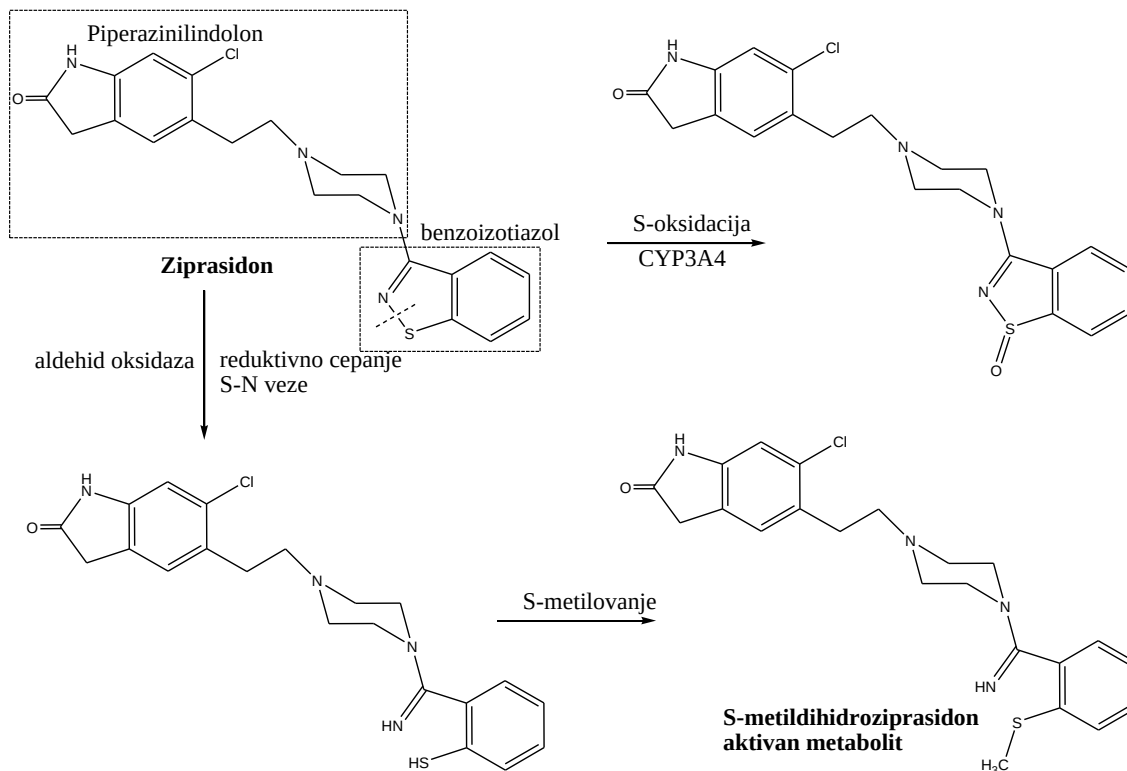
Slika 2. Strukture lurazidona, olanzapina i ziprasidona i interakcije sa vezujućim mestima ispitivanih receptora [22]

Terapijske indikacije i doziranje. Ziprasidon se koristi u terapiji šizofrenije, akutno maničnih ili mešovitih epizoda koje su povezane sa bipolarnim poremećajima (sa ili bez psihotičnih karakteristika) [23,24]. Efikasan je kod pozitivnih simptoma šizofrenije zahvaljujući antagonizmu na D₂ receptorima, a blokadom 5-HT_{2A} i 5-HT_{2C} i aktivacijom 5-HT_{1A}, kao i zahvaljujući SSRI i NRI dejstvu, doprinosi ublažavanju negativnih simptoma. Ziprasidon se koristi kao sedativ kod dece. U dozama od 5-20 mg/dan se pokazao kao bezbedan i efikasan lek za tik poremećaje kod dece od 7 do 16 godina [25].

Ziprasidon se kod pojedinih stanja primenjuje za drugačije terapijske indikacije u odnosu na odobrene (*off-label*), npr. za terapiju održavanja kod bipolarnih poremećaja, anksioznost, unipolarnu depresiju, demenciju, hiperaktivnost - smanjenje pažnje, autizam i posttraumatski stresni poremećaj [26]. Smatra se da u terapiji unipolarne depresije i za anksiozne poremećaje ziprasidon može biti efikasan u nižim dozama [27,28]. Novija istraživanja na modelima miševa su ukazala na zaštitni efekat ziprasidona u kombinaciji sa benzodiazepinima (midazolam) u prevenciji napada i smrti usled akutnog trovanja kokainom [29,30]. Potvrđeno je i *neuroprotektivno* dejstvo ziprasidona *in vitro*, jer smanjuje formiranje slobodnih radikala [5], kao i *in vivo* kod pacova usled smanjenja neuronske apoptoze u hipokampusu i povećanja proliferacije hipokampalnih i neuralnih stem ćelija [31].

Metabolizam. Na osnovu biofarmaceutskog sistema klasifikacije (engl. *Biopharmaceutics Classification System*, BCS) ziprasidon pripada klasi II jedinjenja – visoke permeabilnosti i slabe rastvorljivosti. Oralna bioraspoloživost ziprasidona je 60% i ona se može povećati kada se uzima sa hranom. U prisustvu hrane resorpcija ziprasidona je povećana i do dva puta usled povećanja rastvorljivosti [32]. Brojne studije su pokazale da apsorpcija ziprasidona zavisi od vremena između doziranja i uzimanja hrane, kao i od količine unetih kalorija (više od 500 kcal, nezavisno od unosa masti) [33]. Primena sa hranom ima najveći uticaj na odgovarajuću resorpciju u cilju postizanja optimalne i dozno-zavisne bioraspoloživosti [34]. Poluvreme eliminacije ($t_{1/2}$) ziprasidona je oko 6h. Metaboliše se intenzivno u jetri i nastali metaboliti se izlučuju uglavnom putem fecesa (oko 66%) i urina (oko 20%), a mali deo se eliminiše nepromenjen (< 5%) [35,36]. Identifikovana su 4 glavna metabolička puta ziprasidona [37]:

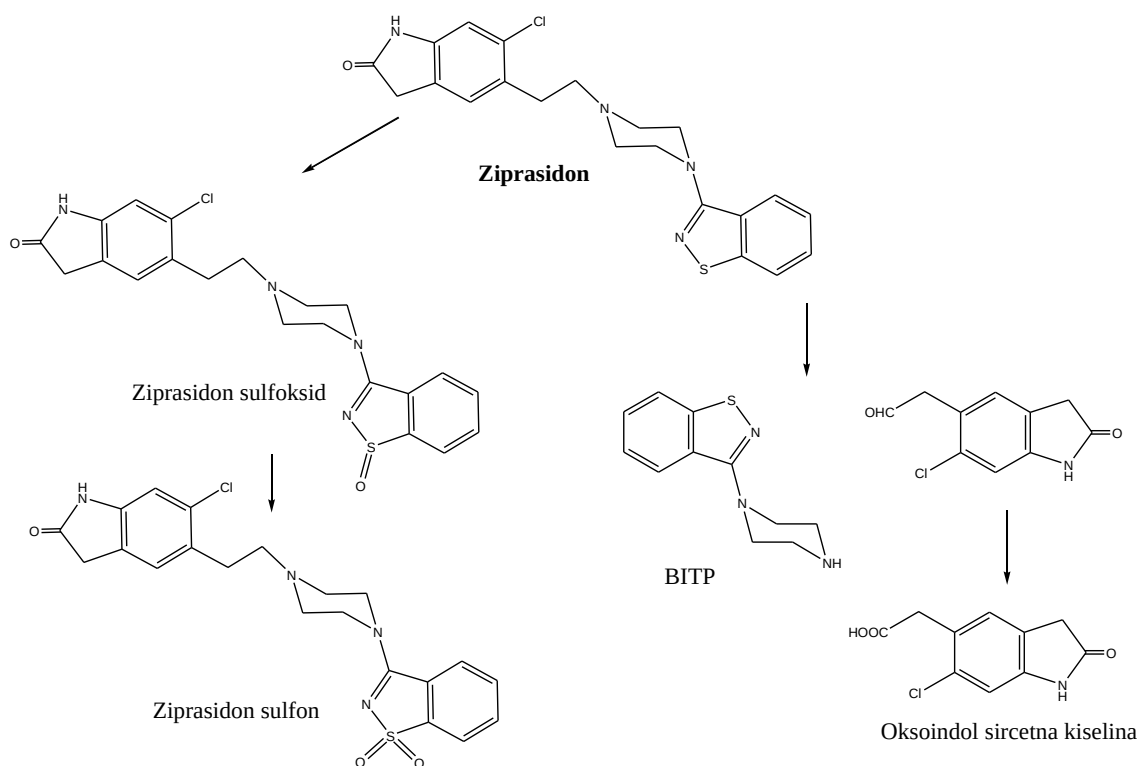
- Dejstvom *aldehid oksidaze* (cepanje S-N veze) i *tiometiltransferaze* (S-metilovanje) nastaje aktivan metabolit *S-metildihidroziprasidon*. Oko 66% leka se metaboliše ovim putem (Slika 3.).



Slika 3. Glavni metabolički putevi ziprasidona [1]

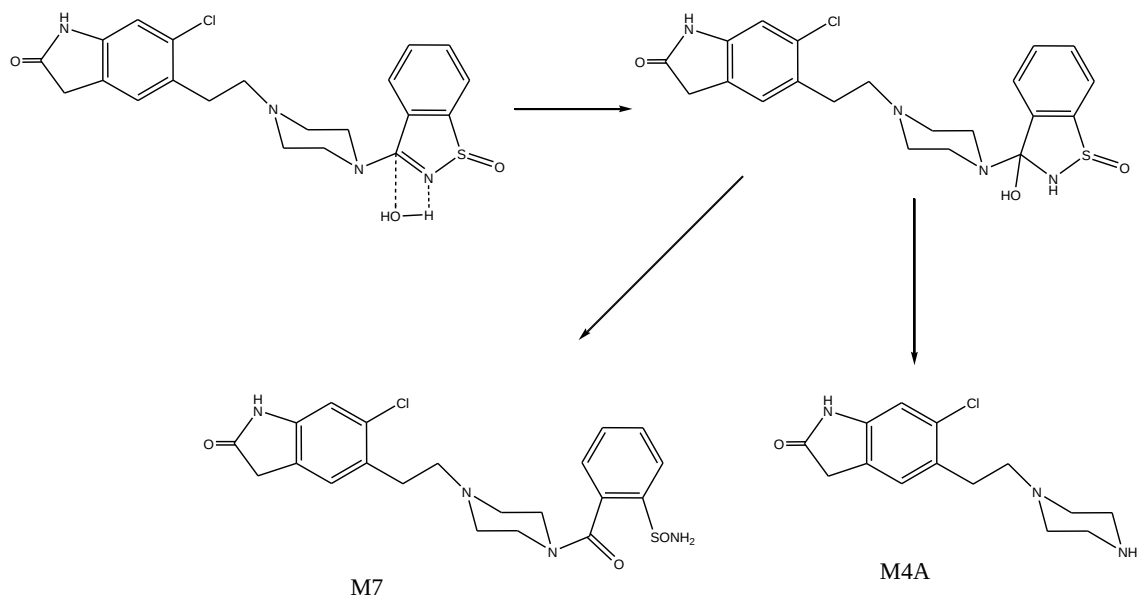
- Dejstvom enzima *CYP3A4* dolazi do oksidacije sumpora pri čemu nastaju *ziprasidon sulfoksid* i *sulfon* koji su glavni metaboliti u serumu i nemaju dejstvo (Slika 3. i 4.).

- Dejstvom enzima *citohrom P450* i to izoforme *CYP3A4* dolazi do oksidacije α C-atoma. Cepa se veza i zmeđu α C-atoma i tercijarnog azota piperazina (N-dealkilovanje) pri čemu nastaju *aldehid* i *benzoizotiazol-3-il-piperazin (BITP)*. Aldehyd se dejstvom *aldehid oksidaze* ili *CYP* enzima oksiduje do *oksoindol sirćetne kiseline* što je prikazano na Slici 4. [38].



Slika 4. Metabolički putevi ziprasidona u humanim mikrozomima jetre (CYP3A4) [38]

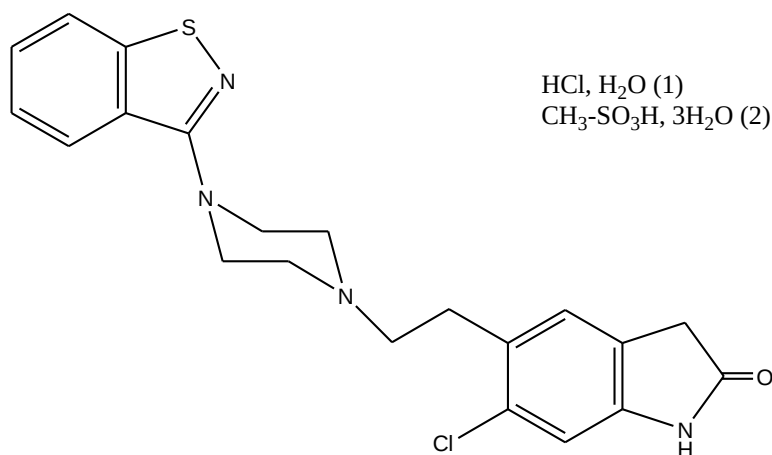
- Adicijom vode na C=N vezu nastaje struktura intermedijera - karabinoldiamina i dolazi do oksidacije sumpora kada nastaje metabolit - M7 ili do N-dearilacije benzoizotiazol piperazinske strukture kada nastaje - M4A, što je prikazano na Slici 5.



Slika 5. Predloženi mehanizam nastanka metabolita M4A i M7 [37]

1.1.4. Struktura i farmaceutsko-hemijske osobine ziprasidona

Ziprasidon je derivat benzoizotiazol piperazina i hemijski predstavlja 5-[2-[4-(1,2-benzoizotiazol-3-il)-piperazin-1-il]etil]-6-hloro-1,3-dihidro-2*H*-indol-2-on. Slaba je baza (pK_a oko 6,7) koja se javlja u obliku belih kristala i pripada grupi lipofilnih lekova ($c \log P = 3,6$) [39]. Obzirom na građenje intramolekulskih vodoničnih veza i $\pi - \pi$ interakcije, ziprasidon pokazuje tendenciju za kristalizacijom. Kao posledica toga ziprasidon je gotovo nerastvoran u vodi (oko 0,3 $\mu\text{g/mL}$ na 25°C) [40]. Teško je rastvoran u dimetilsulfoksidu, dimetiformamidu, acetonitrilu, etanolu, tetrahidrofuranu i etilacetatu. pK_a vrednosti dve jonizujuće grupe ziprasidona su 8,4 i 13,3. Temperatura topljenja ziprasidona je 226°C [41,42]. Ziprasidon ne poseduje asimetrični centar pa je optički neaktivna, ahiralna molekula što je sa aspekta farmaceutske hemije značajno jer podrazumeva odsustvo stereoselektivnosti i konfiguracione nestabilnosti tj. mogućnosti inverzije - nastanka stereoisomernih nečistoća. U Evropskoj farmakopeji [43] je oficinalan u obliku dve soli ziprasidon-hidrohlorid, monohidrat (**1**) i ziprasidon-mezilat, trihidrat (**2**), a u Američkoj farmakopeji [44] kao hidrohlorid, monohidrat (**1**). Hemijska struktura obe soli ziprasidona je predstavljena na Slici 6., a molekulske formule i mase su $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{OS}$, H_2O , $M_r = 467,4$ (**1**), odnosno $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{ClN}_4\text{O}_4\text{S}_{2,3}$, H_2O , $M_r = 563,1$ (**2**). Obe soli pokazuju polimorfne osobine.

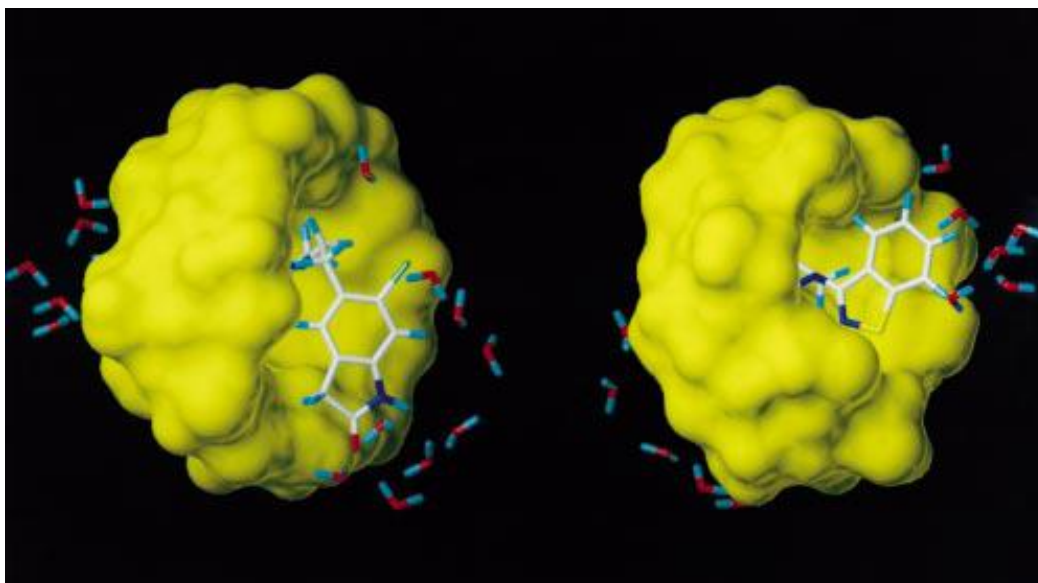


Slika 6. Strukturna formula ziprasidona ($\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{ClN}_4\text{OS}$, $M_r = 412,94$)

Ziprasidon-hidrohlorid, monohidrat je prašak bele ili svetlo roze boje. Gotovo je nerastvoran u vodi (80 $\mu\text{g/mL}$ na 25°C računato na ziprasidon bazu [45]), teško rastvoran u metanolu i metilenhloridu [43]. Ima visoku temperaturu topljenja, od

300°C do 304°C [46,47]. Ziprasidon-hidrohlorid, monohidrat se javlja u dva polimorfna oblika A i B. Polimorf A je termodinamički stabilnija i željena forma zastupljena u kapsulama. Postoje i anhidrovani derivati polimorfa A i B, oni su metastabilni i lako prelaze u monohidrate, sem ako se ne održava niska vlažnost sredine. Ove dve forme se jasno razlikuju na osnovu karakterizacije difrakcijom X-zracima. Ravnotežne studije rastvorljivosti su pokazale da je rastvorljivost forme B slična formi A (veoma malo rastvorna u vodenoj sredini) [32].

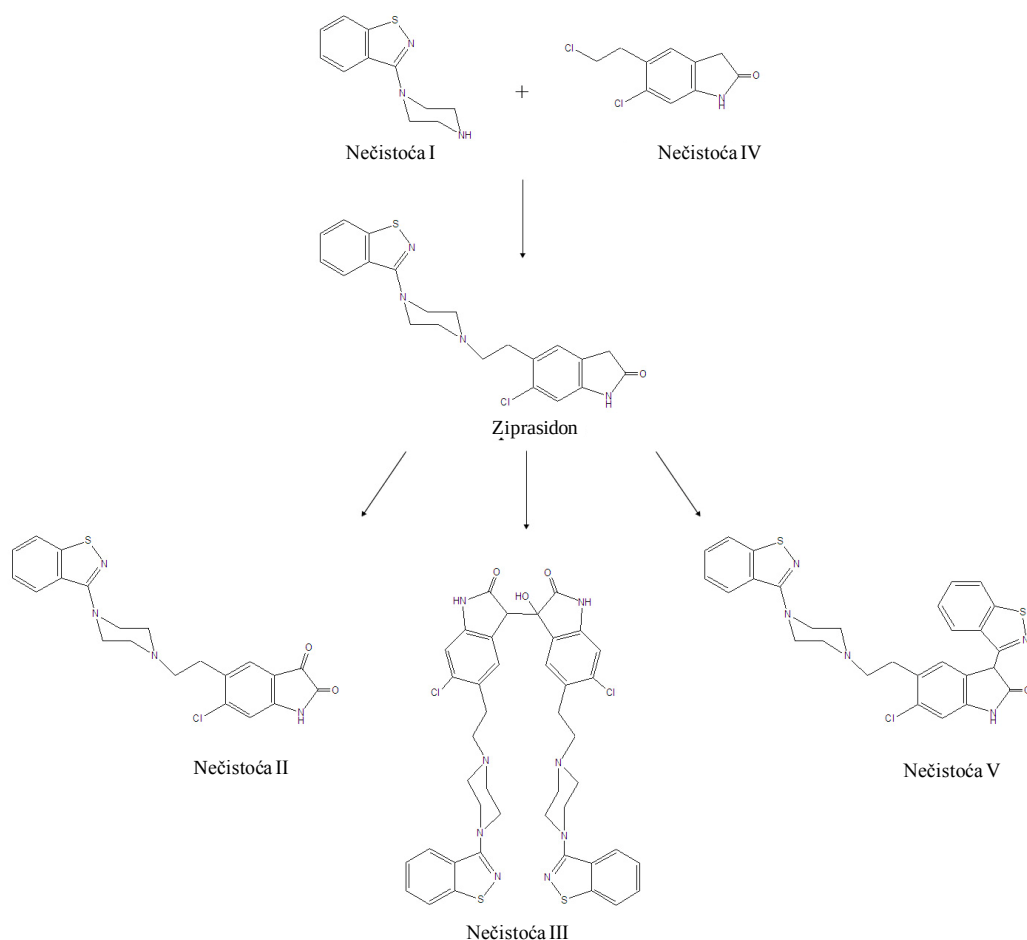
Ziprasidon-mezilat, trihidrat je prašak bele ili skoro bele boje. Vrlo teško rastvoran u vodi (1000 µg/mL na 25°C računato na ziprasidon bazu [45]), teško rastvoran u metanolu, gotovo nerastvoran u acetonitrilu [43]. pH zasićenog rastvora je 2,5 - 2,9. S obzirom na slabu rastvorljivost, parenteralna formulacija - prašak za rastvor za injekcije, razvijena je kao kompleks ziprasidon-mezilata i sulfobutiletar-β-ciklodekstrina (engl. *sulfobutylether-β-cyclodextrin*, SBEβCD) jer se kompleksiranjem povećava rastvorljivost leka u vodi. Ziprasidon-mezilat formira kompleks sa SBEβCD u stehiometrijskom odnosu 1:1. Ispitivanja konformacije ziprasidona u kompleksu sa ciklodekstrinima (CD) su pokazala da se hidrofobna benzoizotiazol grupa orijentiše ka udubljenju CD i da je glavno povezivanje sa CD preko vodonika na položaju C₄ benzoizotiazolskog prstena. CD je predstavljen sa površinom dostupnom rastvaraču (*Connolly*), a oko svakog atoma ziprasidona je molekul vode (3,0 Å) (Slika 7.). Na Slici 7. je prikazano da je vodonik na položaju C₄ benzoksindola u udubljenju CD, a da je vodonik na položaju C₇ benzoksindola okrenut ka hidrofilnom rastvaraču. To je u skladu sa tumačenjem da su deo strukture ziprasidona supstituisane hlorom i laktam grupa okrenuti ka rastvaraču i slobodni da grade vodonične veze [42].



Slika 7. Prikaz tipičnog kompleksa ziprasidon-mezilata i CD na osnovu Monte Carlo simulacije [42] (prednji i zadnji prikaz)

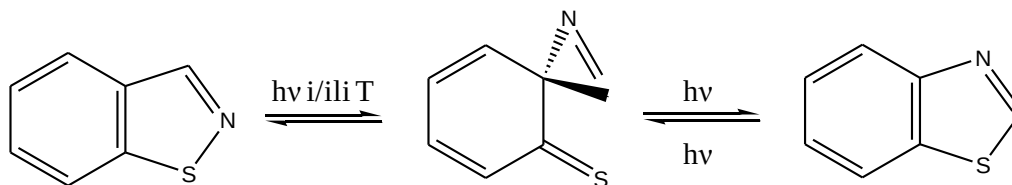
1.1.5. Farmaceutsko-hemijska čistoća ziprasidona

Nečistoće koje se mogu javiti u ziprasidonu mogu se podeliti u četiri grupe: sintetske nečistoće, degradacioni proizvodi, rezidualni rastvarači i neorganske nečistoće. Prisustvo degradacionih proizvoda može da utiče na hemijske, farmaceutske i toksikološke osobine preparata ziprasidona i da promeni njegovu bioraspoloživost i terapijske efekte, pa je preporuka ICH smernica (*International Conference on Harmonisation*) identifikacija i kvantifikacija svih nečistoća, prisutnih u farmaceutskom proizvodu sa novom aktivnom supstancom u količini većoj od 0,1%, i ispod ovog nivoa za nečistoće sa jakim farmakološkim ili toksičnim dejstvom [48]. Ziprasidon značajno podleže degradaciji u baznoj sredini i znatno manje dejstvom temperature [49,50]. Ispitivane nečistoće ziprasidona su predstavljene na Slici 8.



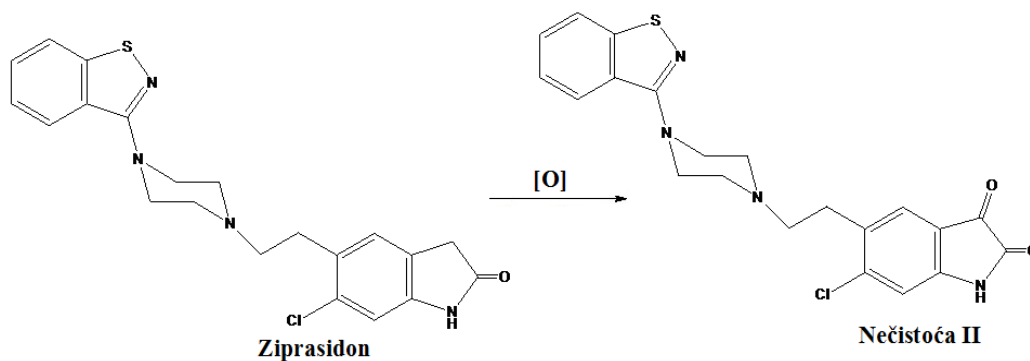
Slika 8. Hemijska struktura ziprasidona i ispitivanih nečistoća

Ziprasidon nastaje kuplovanjem 3-(1-piperazinil)-1,2-benzoizotiazola (**nečistoća I**) sa 6-hloro-5-(2-hloroetil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-on (**nečistoća IV**), pa su ove dve polazne supstance poznate kao sintetske nečistoće [51]. Prekursori (I i IV) se mogu pojaviti kao zaostale nečistoće u sirovini i retko u farmaceutskim oblicima. Reaktivnost i nestabilnost molekule ziprasidona potiče od dve funkcionalne grupe: benzoizotiazola i od enola na α -C atomu 2-indolinona. Ziprasidon i sintetski prekursor I (nečistoća I) podležu fotodegradaciji u rastvorima zbog benzoizotiazola koji izomerizuje u odgovarajući benzotiazol preko intermedijera azirina mehanizmom nukleofilne supstitucije (Slika 9.) [51].



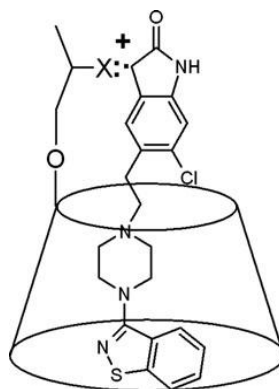
Slika 9. Predloženi mehanizam fotoizomerizacije benzizotiazola u benzotiazol [51]

Da struktura enola na α -C atomu doprinosi nestabilnosti molekule potvrđuju strukture degradacionih nečistoća II, III i V. **Nečistoća II** (5-[2-[4-(1,2-benzizotiazol-3-il)-1-piperazinil]etil]-6-hloro-1,3-dihidro-2H-indol-2,3-dion) je proizvod oksidacije ziprasidona na α -C atomu oksoindol ketonske strukture (Slika 10.). Nečistoća II je detektovana u rastvorima kompleksa ziprasidona sa različitim derivatima CD, a najviše kod CD sa negativno naelektrisanim bočnim grupama (npr. SBE β CD), pa je ziprasidon za intramuskularnu primenu formulisan kao liofilizat [40].



Slika10. Reakcije degradacije ziprasidona do 5-[2-[4-(1,2-benzizotiazol-3-il)-1-piperazinil]etil]-6-hloro-1,3-dihidro-2H-indol-2,3-diona (nečistoća II) [40]

Pretpostavlja se da je oksidativna degradacija ziprasidona u kompleksu sa CD u rastvorima katalizovana elektronima bočnih lanaca CD tj. stvaranjem intermedijernog slobodno radikalskog katjona koji je stabilizovan grupama donorima elektrona (Slika 11.).



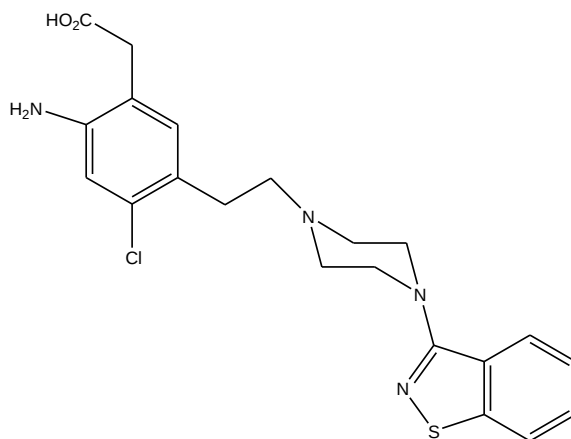
Slika 11. Prikaz potencijalne interakcije bočnog lanca CD-a sa ziprasidonom [40]

Nečistoća III, dimer (5,5'-bis[2-[4-(1,2-benzoizotiazol-3-il)-1-piperazinil]etil]-6,6'-dihloro-1,1',3,3'-tetrahidro-3-hidroksi-[3,3'-bi-2H-indol]-2,2'-dion) nastaje kao proizvod reakcije kuplovanja ziprasidona i nečistoće II.

Nečistoća V (3-(1,2-benzoizotiazol-3-il)-5-[2-[4-(1,2-benzizotiazol-3-il)-1-piperazinil]etil]-6-hloro-1,3-dihidro-2H-indol-2-on) u odnosu na ziprazidon poseduje dodatnu benzoizotiazol grupu na α -C atomu. Nečistoća V je glavni degradacioni proizvod koji nastaje u supstanci ziprasidon-mezilat, trihidrat u čvrstom stanju na sobnoj temperaturi pod dejstvom dnevne svetlosti [52]. Naime, pretpostavlja se da pod dejstvom svetlosti dolazi do formiranja slobodnih radikala i do adicije benzoizotiazola na α -C atomu ziprasidona.

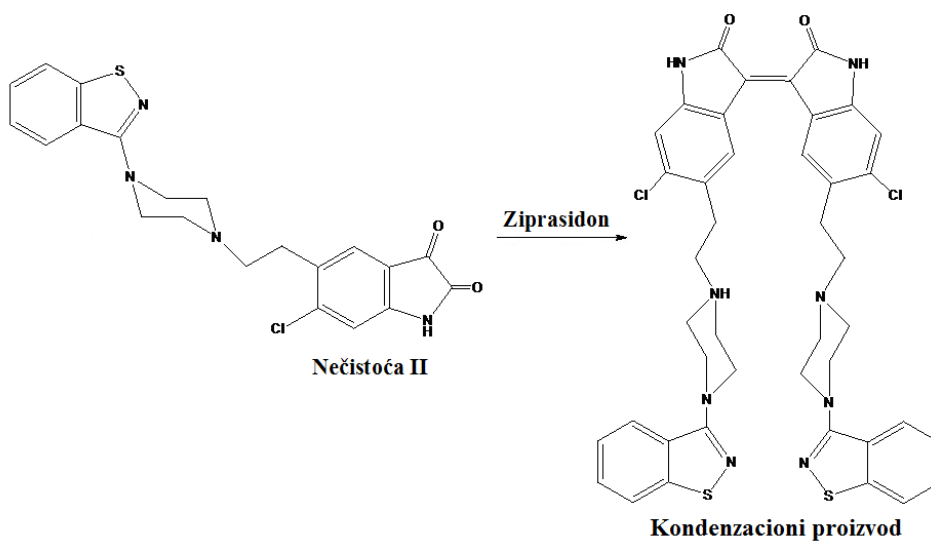
Prisustvo piperazinske strukture kod ziprasidona i nečistoća I, II, III i V ukazuje na bazne osobine ovih jedinjenja usled prisustva tercijarnog amina piperazina koji je povezan alifatičnim lancem sa indolinom. Sintetski prekursor tj. nečistoća IV jedina ne sadrži piperazinsku strukturu. Benzilhalidna funkcionalna grupa u strukturi nečistoće IV se može smatrati odgovornom za genotoksične osobine ovog jedinjenja koje ima karakteristike alkilujućeg agensa i potencijalni je mutagen [53]. Za kontrolu potencijalnih genotoksičnih nečistoća potrebno je razviti pouzdane i veoma osetljive visokoefikasne analitičke metode sa osetljivim i selektivnim modovima detektora za njihovu detekciju i kvantifikaciju [54]. Takođe, trebalo bi da maksimalno dozvoljeni limit genotoksične nečistoće u aktivnoj supstanci bude takav da ne predstavlja rizik po pacijente kod kliničkih ispitivanja, npr. TTC vrednost (engl. *Threshold of Toxicological Concern*, TTC) [55].

Nečistoće I, II, III i V su specificirane u monografijama Evropske farmakopeje obe soli ziprasidona kao nečistoće A, B, D i E. Pored njih specificirana je i nečistoća C (2-[2-amino-5-[2-[4-(1,2-benzoizotiazol-3-il)piperazin-1-il]etil]-4-hlorofenil] sirćetna kiselina, Slika 12.) tj. ziprasidon otvoreni prsten (*ziprasidone open ring, USP 35*). Ova nečistoća je degradaciona i za razliku od ziprasidona ima otvoren indolski prsten. U literaturi je navedeno da bi do cepanja indolskog prstena moglo doći u kiseloj i baznoj sredini na povišenoj temperaturi [56].



Slika 12. Strukturna formula nečistoće C (Ph. Eur.)

U kompleksima ziprasidona sa CD u rastvoru pored nečistoće II, nastaje i kondenzacioni proizvod, reakcijom aldolne kondenzacije ziprasidona i nečistoće II što je prikazano na Slici 13 [40].



Slika 13. Mehanizam nastanka kondenzacionog proizvoda [40]

1.1.6. Analitičke metode za ispitivanje ziprasidona

Ziprasidon pripada grupi lipofilnih lekova čija se resorpcija povećava i do dva puta u prisustvu hrane. S obzirom na lošu komplijansu pacijenata koji boluju od šizofrenije (poglavlje 1.1.3.), novijim istraživanjima ispituju se različite tehnologije solubilizacije kako bi se eliminisao efekat hrane jer se smatra da će se povećanjem rastvorljivosti povećati i resorpcija ziprasidona. Kod ispitivanja rastvorljivosti novih formulacija ziprasidona najviše je zastupljena metoda tečne hromatografije sa masenom i UV detekcijom. Ispitivanje koncentracije ziprasidona u rastvorima nagrađenih inkluzionih kompleksa ziprasidon-mezilat-SBE β CD vršeno je metodom tečne hromatografije pod visokim pritiskom (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) sa UV detekcijom na stacionarnoj fazi Waters Puresil C18 ($t=40^{\circ}\text{C}$), uz izokratsko eluiranje (60% 0,05 M KH_2PO_4 pufer : 40% metanol) i pri protoku od 2 mL/min, i UV detekciji na 229nm. Ispitivana je i rastvorljivost različitih soli ziprasidona u vodenom i SBE β CD rastvorima poznatih koncentracija. So mezilata je pokazala najveću rastvorljivost u SBE β CD rastvorima i zato je odabrana za parenteralnu formulaciju ziprasidona [42].

Ispitivana je rastvorljivost amorfних inkluzionih kompleksa ziprasidon-mezilata i CD, nanosuspenzije ziprasidon baze (nanokristala) i mikroniziranih kristala (*jet-milled*) ziprasidon-hidrohlorida obavijenih polimerom koji sprečava precipitaciju. Sadržaj rastvorenog ziprasidona u prvoj formulaciji u 50 mM fosfatnom puferu na pH 4,0 i 7,4 je određivan HPLC metodom na stacionarnoj fazi Zorbax Rx C8, na temperaturi od 40°C , uz izokratsko eluiranje (0,05 M KH_2PO_4 :ACN – 55:45), pri protoku od 1 mL/min i UV detekciji na 317 nm. Ispitivanje permeabilnosti tj. brzine transporta kroz mikroporoznu polipropilensku membranu treće formulacije vršeno je merenjem koncentracije leka u funkciji vremena pomoću normalno fazne (NP) HPLC-UV metode (stacionarna faza Zorbax SB-CN (4.6 mm x 150 mm, 5 μm), $t=25^{\circ}\text{C}$, mobilna faza 16,3/83,7 (60/40 dekanol/dekan)/izopropanol, protok 1,2 mL min⁻¹, UV detekcija 230 nm). Retenciono vreme (t_R) ziprasidona je bilo 2,6 minuta. Metoda kuplovane tečne hromatografije sa maseno-masenom spektrometrijom (engl. *Liquid Chromatography - tandem mass spectrometry*, LC-MS-MS) je korišćena za ispitivanje uporedne farmakokinetike razvijenih formulacija rastvorljivih oblika ziprasidona u stanju gladovanja i komercijalno dostupnih Geodon[®] kapsula [46].

Ispitivanje rastvorljivosti čvrste nanokristalne disperzije ziprasidon-hidrohlorida vršeno je *in vitro* testom permeabilnosti (brzine transporta) kroz mikroporoznu polipropilensku membranu prethodno opisanom NP-HPLC-UV metodom [46], i *in vivo* u paralelnoj studiji sa komercijalno dostupnim Geodon[®] kapsulama (kristalni ziprasidon-hidrohlord, monohidrat) na kratkonogim psima u stanju gladovanja i sitosti [32].

Metodom tečne hromatografije pod ultra visokim pritiskom (engl. *Ultra Performance Liquid Chromatography*, UPLC) je ispitivana brzina rastvorljivosti kristalnih i amorfni oblika ziprasidon baze i ziprasidon-hidrohlorida dobijenih mlevenjem na niskoj temperaturi (*cryomilling* procesom). Pokazano je da je brzina rastvaranja amorfni oblika istih supstanci znatno veća u odnosu na kristalni. Takođe, UPLC metodom je potvrđena značajna degradacija kristalnih oblika na njihovim temperaturama topljenja. Korišćena je ACQUITY UPLC BEH fenil stacionarna faza (50 x 2,1 mm, 1,7 µm), t=25°C, uz gradijentno eluiranje (0min /15% ACN – 5min/80% ACN) sa protokom od 0,5 mL/min. Mobilna faza B je voda pH 2,0 podešena ortofosfornom kiselinom. Detekcija je vršena na talasnoj dužini od 229 nm. Pouzdanost metode je dokazana parametrima validacije [47].

Rastvorljivost 12 različitih soli ziprasidona u vodi je ispitivana HPLC-UV metodom. Korišćena je YMC Pack Pro C18 (50 x 4.6 mm, 5 µm) stacionarna faza (t=40°C) sa mobilnom fazom 0,1% rastvor mravlje kiseline u vodi i 0,1% mravlje kiseline u ACN, uz varijabilni gradijent i protok od 1mL/min. Detekcija je vršena na talasnoj dužini od 229 nm. Najveću rastvorljivost od svih do sada ispitivanih soli pokazala je kristalna so ziprasidon-malat i to polimorf C (14 puta veću nego ziprasidon-hidrohlord u kapsulama) i veliku kinetičku stabilnost, pa se smatra da je dobar kandidat za dalji farmaceutski razvoj [41].

Nekoliko studija opisuje određivanje sadržaja ziprasidona u doziranim oblicima i sirovini. Opisan je razvoj i validacija *stability-indicating* HPLC metode sa UV detekcijom na 230 nm. Razdvajanje degradacionih produkata nastalih u studijama forsirane degradacije (kisela i bazna hidroliza, oksidacija, fotoliza i termalna degradacija) na aktivnoj supstanci vršeno je na stacionarnoj fazi YMC Pack ODS-A C18 (250mm x 4,6 mm, 5µm) pri izokratskom eluiranju (smeša TEA i fosfatnog pufera,

pH 3,0 : ACN : metanol, 53:15:32 (v/v/v)). U radu nije prikazana strukturna karakterizacija degradacionih produkata [50].

Razvijena je brza jednostavna *stability-indicating* HPLC metoda (vreme izvođenja analize 10 min) za određivanje ziprasidon-hidrohlorida i njegovih nečistoća. Razdvajanje je postignuto na kratkoj YMC Pack Pro C18 stacionarnoj fazi (50 x 4.6 mm, 5 μ m), na t od 40°C uz gradijentno eluiranje (mobilna faza A: rastvor 0,05% v/v fosforne kiseline u vodi, i B: ACN) pri protoku od 1 mL min⁻¹. Talasna dužina detekcije je 220 nm, t_R ziprasidona oko 4,9 min [49].

Razvijena je i validirana HPLC-UV metoda za određivanje sadržaja ziprasidon-hidrohlorida u sirovini i kapsulama. Korišćena je Phenomex C18 stacionarna faza (250 x 4,6mm, 5 μ m) i izokratsko eluiranje (mobilna faza: 0,02M KH₂PO₄ (pH 3) : metanol : ACN, 40:30:30 (v/v/v)), pri protoku od 1,5 mL min⁻¹. Ziprasidon je detektovan na t_R 3,37 min na talasnoj dužini od 219 nm [57].

Razvijene su dve metode, HPLC i metoda tankoslojne hromatografije (engl. *Thin Layer Chromatography*, TLC) za određivanje ziprasidona u aktivnoj supstanci i u kapsulama. Koncentracija ziprasidona je određivana u nekoliko rastvora sa različitim koncentracijama laboratorijskih smeša poznatih degradacionih proizvoda kojima je dodata poznata koncentracija ziprasidona i dobijeni su zadovoljavajući rezultati za tačnost obe metode. Kod prve metode (HPLC-UV) razdvajanje je postignuto na Lichrosorb RP C18 stacionarnoj fazi uz mobilnu fazu voda:ACN:fosforna kiselina (76:24:0,5 v/v/v), pri protoku 1,5 mL min⁻¹, na sobnoj temperaturi. TLC metoda se zasniva na razdvajanju supstanci na aluminijumskoj ploči silika gela 60F₂₅₄ (20x20 cm) sa mobilnom fazom hloroform:metanol:glacijalna sirćetna kiselina (75:5:4,5 v/v/v). Kod obe metode očitavanje signala je vršeno sa UV detekcijom, kod HPLC na 229 nm, a kod TLC na denzitometru na 247 nm. Obe metode su validirane. Vreme izvođenja HPLC analize je oko 50 min, a t_R ziprasidona je 19,14 min [58].

Brza izokratska reverzno fazna (RP) HPLC-UV (229 nm) metoda je razvijena i validirana za određivanje ziprasidon-hidrohlrid, monohidrata u kapsulama. Hromatografsko razdvajanje je postignuto za 2 minuta na stacionarnoj fazi Zorbax SB C8 (50 x 4.6 mm, 3.5 μ m), na t od 40°C, sa mobilnom fazom pufer pH 3,0 (fosfatni pufer i 0,2% TEA) i metanol u odnosu 45:55, a t_R ziprasidona je bilo 1,2 min. Metoda je

validirana, a studijama forsirane degradacije na aktivnoj supstanci dokazano je da je metoda *stability-indicating* [59].

Ispitivana je stabilnost ziprasidona u uslovima stres studija, u kompleksima sa različitim derivatima CD u rastvoru i u čvrstom stanju, kao i u razblaženom rastvoru praška za rastvor za injekcije sa komercijalno dostupnim sirupima. Pod uslovima stres studija stabilnost ziprasidon-hidrohlorida je ispitivana UPLC-UV metodom sa detekcijom na 254 nm, pri protoku od 0,2 mL min⁻¹. Korišćena je Acquity UPLC BEH C18 stacionarna faza (100 x 2,1mm, 1,7µm) i gradijentno eluiranje (mobilna faza A (0,01M amonijum-acetat pufer, pH 5,0) i B (ACN)). Za identifikaciju degradacionih nečistoća korišćen je LC-MS-MS uređaj. Metoda je validirana i vreme izvođenja UPLC analize je 8 min, a t_R ziprasidona 3,3 min [60].

Za ispitivanje uticaja različitih derivata CD na brzinu degradacije ziprasidona u kompleksu sa CD u rastvoru i u čvrstom stanju, korišćene su dve HPLC metode. Kod obe metode razdvajanje je postignuto na stacionarnoj fazi Waters Symmetry C18 (150 x 3.9 mm, 5 µm) pri protoku mobilne faze od 1 mL/min uz UV detekciju na 229 nm. Za degradant I mobilna faza je pufer (0,05 M KH₂PO₄), pH 3,0 : metanol (60:40 (v/v)); stacionarna faza i mobilna faza su grejane na 40°C. Za degradant II mobilna faza je 0,1 M 1-oktansulfonska kiselina/0,025 M KH₂PO₄ pufer/ACN/metanol (50/42/8, v/v/v) pH 3,0, a temperatura stacionarne faze i mobilne faze 35°C [40].

Stabilnost ziprasidona je praćena u rastvorima sirupa, koji su čuvani pod različitim uslovima, *stability-indicating* validiranom HPLC-UV metodom. Sirupi su pravljani razblaživanjem rastvorenog praška za rastvor za injekcije (20 mg/mL) odgovarajućim komercijalno dostupnim sirupom bez šećera i alkohola. Ispitivanja su vršena u različitim vremenskim intervalima. Metoda je modifikacija već publikovane metode (Agilent C18 stacionarna faza, 100 x 4.5 mm, t 40°C, izokratsko eluiranje (45% ACN : 55% 0,01 M fosfatni pufer, pH 7,99), detekcija na 317 nm) [58]. Ziprasidon se eluiro na t_R 5,46 minuta. Fizička i hemijska stabilnost je pokazana u toku 2 nedelje kada se sirup čuva u frižideru (t=5°C) [61].

Analiza ziprasidona je vršena i drugim tehnikama, npr. visoko efikasnom tankoslojnom hromatografijom (engl. *High Performance Thin Layer Chromatography* HPTLC), spektrofotometrijski, spektrofotometrijski, metodom kapilarne elektroforeze, elektrohemijski, potenciometrijski. Opisano je određivanje sadržaja ziprasidon-

hidrohlorid, monohidrata u tabletama i aktivnoj supstanci na HPTLC stacionarnoj fazi silika gela 60F₂₅₄, sa mobilnom fazom *n*-butanol:dimetilsulfoksid:glacijalna sirćetna kiselina (8,1:1,2:0,7). Denzitometrijsko određivanje je vršeno na 254 nm. Hromatogram je razvijen za oko 30 min, a R_f vrednost ziprasidona je 0,64 [62]. Na istoj stacionarnoj fazi sa mobilnom fazom benzen : etilacetat : metanol : glacijalna sirćetna kiselina (4,0:1,0:0,5:0,1 v/v/v/v) i na talasnoj dužini detekcije od 277 nm razvijena je i validirana HPTLC metoda u iste svrhe. U ovoj metodi korišćeni su interni standardi amoksicilin i gatifloksacin [63].

Dve HPTLC metode, NP i RP, su razvijene i validirane za analizu ziprasidona u kapsulama. Za NP-HPTLC metodu korišćeni su sledeći uslovi: stacionarna faza - HPTLC silika gel F₂₅₄ i mobilna faza- heksan:dioksan:propilamin (1:9:0,4, v/v/v), a za RP stacionarna faza: RP8 F₂₅₄ i mobilna faza tetrahidrofuran:fosfatni pufer, pH 9,0 (5:5, v/v). Obe stacionarne faze su nakon razvijanja skenirane na videodenzitometru na 254 nm. Preciznost i tačnost metoda je poređena sa rezultatima kontrolne metode na klasičnom denzitometru na 243 nm. NP-HPTLC metoda je korišćena za ispitivanje stabilnosti ziprasidona u rastvorima [64].

Ziprasidon u kapsulama je određivan spektrofotometrijskom metodom koja se zasniva na merenju prirodne fluorescencije ziprasidona u acetatnom puferu pH 4,5 na 398 nm posle ekscitacije na 315 nm. Metoda je validirana i ispitana je stabilnost ziprasidona nakon studija forsirane degradacije. Takođe, metoda je iskorišćena za ispitivanje kinetike alkalne, kisele i oksidativne degradacije leka [56].

Za određivanje ziprasidon-hidrohlorida u sirovini, kapsulama i tabletama korišćene su spektrofotometrijske UV metode. Razvijene su tri spektrofotometrijske metode za određivanje ziprasidona u sirovini i kapsulama, gde je za spektrofotometriju nultog reda apsorbancija merena na 315 nm, za derivativnu spektrofotometriju drugog reda na 295,6 nm, i u opsegu između 319 – 309 nm kod spektrofotometrije nultog reda merena je površina ispod pika maksimuma apsorbancije [65]. Ziprasidon je određen u sirovini i kapsulama u rastvoru pufera pH 7,4 na talasnoj dužini apsorbancije od 318nm [66]. Spektrofotometrijsko određivanje ziprasidon-hidrohlorida u inkluzionim kompleksima sa CD na 317 nm vršeno je pri ispitivanju rastvorljivosti dve formulacije brzo rastvorljivih tableta [67]. Određivanje ziprasidona u vidljivom delu spektra (VIS) vršeno je sa nekoliko metoda, kada je apsorbancija obojenih rastvora merena nakon

derivatizacije odgovarajućim reagensima: metode A i B, na 509 nm (A- gvožđe(III)-hlorid i 1,10 fenantrolin i B- gvožđe(III)-hlorid i 2,2'-bipiridil) [68]; tri metode, na 540 nm (p-hloranilinska kiselina), na 580 nm (limunska kiselina i anhidrid sirćetne kiseline) i na 470 nm (amonijum-molibdat i kalijum-tiocijanat) [69]; na 490 nm merena je apsorbanacija nakon ekstrakcije leka u organski sloj boje TPooo u prisustvu 0,1N HCl [70]. Opisane su i tri metode indirektnog spektrofotometrijskog određivanja ziprasidona, nakon reakcije ziprasidona sa reagensima, i određivanjem viška reagensa [71].

Određivanje ziprasidona u kapsulama vršeno je i metodom kapilarne elektroforeze. Analiza je izvođena sa formijatnim puferom na pH 3,0 jer na višim pH dolazi do smanjenja rastvorljivosti leka usled deprotonacije što se odražavalo na izgled elektroferograma. Vreme izvođenja analize je samo 3 minuta. Kao interni standard korišćen je lidokain-hidrohlorid. Metoda je validirana i primenjena je za analizu komercijalnih kapsula različitih proizvođača [72].

Opisano je elektrohemijsko određivanje ziprasidona u kapsulama i serumu nakon precipitacije proteina sa ACN. Mehanizam njegove oksidacije ispitivan je na boriranoj dijamantskoj elektrodi (engl. *boron-doped diamond electrodes*, BDD) i elektrodi staklastog ugljenika (engl. *glassy carbon*, GC) sa više tehnika voltametrije: cikličnom, diferencijalno pulsnom, derivativnom linearnom i voltametrijom sa pravouganim impulsima. BDD elektroda je pokazala odlične rezultate za elektrooksidaciju i određivanje ziprasidona. Predložen je mehanizam oksidacije ziprasidona na indolu i piperazinu jer se na BDD elektrodi javljaju dva jasno definisana anodna pika. Linearni odgovor je dobijen u acetatnom puferu na pH 5,5 za prvi pik, a za drugi u 0,1 M H₂SO₄ sa BDD elektrodom za diferencijano pulсну i voltametriju sa pravouganim impulsima i pokazana je tačnost i preciznost metoda [73].

Za potenciometrijsko određivanje ziprasidona u doziranim oblicima i biološkim tečnostima razvijena je nova jon-selektivna elektroda. Elektroda sadrži plastificiranu polimernu membranu koja se zasniva na ziprasidon-tetrafenilborat jonoizmenjivaču. Elektroda je pokazala stabilan odgovor u metanolno-vodenom rastvoru za koncentraciju ziprasidona 3×10^{-6} M sa brzim odgovorom (manje od 20 s). Takođe, pokazana je dobra selektivnost prema ziprasidonu u odnosu na uobičajena organska i neorganska jedinjenja i nekoliko supstanci sa farmakološkom aktivnošću. Elektroda je uspešno

validirana i primenjena za određivanje ziprasidona u doziranim oblicima, humanom urinu i serumu [74].

Zbog navedenih neželjenih dejstava ziprasidona i povećane resorpcije u prisustvu hrane (poglavlje 1.1.3.), neophodna je jednostavna i pouzdana analitička metoda za terapijsko praćenje leka (engl. *Therapeutic Drug Monitoring*, TDM) u biološkim tečnostima kod pacijenata, kako bi se terapija personalizovala, optimizovala, i smanjila neželjena i toksična dejstva. Opisano je nekoliko HPLC metoda sa UV [75,76], masenom [77-80] i fluorescentnom detekcijom [81] za određivanje ziprasidona u biološkim tečnostima i za ispitivanje bioraspoloživosti različitih formulacija ziprasidona [32,39,46].

Terapija šizofrenije često podrazumeva simultanu primenu dva ili više AP kako bi se postigla željena kontrola simptoma. Ovi lekovi su često povezani sa istraživanjima iznenadnih smrti s obzirom na visok stepen suicida kod pacijenata sa psihičkim poremećajima, pa su u literaturi zastupljene i metode za istovremeno određivanje više AP u biosredini, ali i AP u smeši sa drugim psihotropnim lekovima [82-89].

Prema oficinalnim monografijama ziprasidona u Evropskoj 8.1 [43] i Američkoj Farmakopeji 35 [44] ispitivanje stepena čistoće opisano je dvema HPLC-UV metodama, za više (A,B,C) i manje polarne nečistoće (D,E), a određivanje sadržaja posebnom HPLC metodom. Takođe, samo dvema metodama je opisano određivanje ziprasidona i nečistoća i to HPLC-UV metodom [49] i UPLC-UV metodom [60] u sirovini ziprasidona, ali nijedna metoda nije obuhvatila svih 5 ispitivanih glavnih nečistoća (v. poglavlje 1.1.5.) i njihovo određivanje u sirovini i farmaceutskim oblicima.

1.2. PRIMENA EKSPERIMENTALNOG DIZAJNA U ISPITIVANJU HROMATOGRAFSKOG PONAŠANJA ZIPRASIDONA I NJEGOVIH NEČISTOĆA

Izvođenje velikog broja eksperimenata radi analiziranja uticaja jednog ili više faktora (nezavisno promenljive) na rezultat ispitivanja (zavisno promenljiva) se pokazalo kao veoma neefikasna i skupa procedura. U poslednje tri decenije se poseban akcenat stavlja na razvoj matematičkih, informatičkih i statističkih metoda za odabir i analizu relativno malog broja optimalnih eksperimenata, koji će dati najviše relevantnih informacija za razvoj nove analitičke metode [90,91]. Eksperimentalni dizajn

predstavlja metodologiju planiranja i izvođenja minimalnog broja eksperimenata u cilju dobijanja najvažnijih informacija o ispitivanom analitičkom sistemu [92]. U cilju povećanja efikasnosti u toku razvoja nove analitičke metode potrebno je unapred definisati korake eksperimenta:

- cilj eksperimenta (odgovor sistema) i šta se želi postići (npr. minimalan, maksimalan odgovor itd.),
- odabrati faktore i nivoe ispitivanja,
- izabrati adekvatan tip eksperimentalnog dizajna ,
- izabrati optimalnu metodu za analizu dobijenih rezultata [91].

Eksperimentalni dizajn ne obuhvata samo predloženu eksperimentalnu metodologiju već i matematičke metode pomoću kojih će eksperimentalni podaci biti analizirani.

Početna faza svakog istraživanja obično podrazumeva određivanje eksperimentalnih faktora koji imaju značajan uticaj na ponašanje sistema (*screening*), koji se zatim detaljnije ispituju. Sledeća faza je optimizaciona kada se izabrani faktori ispituju na više nivoa (najmanje tri). Cilj je da se optimizuju promenljive koje imaju značajan uticaj na ponašanje sistema.

Sprovođenje eksperimentalnog dizajna zasniva se na opštoj teoriji sistema, po kojoj je sistem ograničena celina koja se sastoji iz tri dela: ulaza (eng. *inputs*), izlaza (eng. *outputs*) i transformacija koje se među njima dešavaju.

Ulazi su nezavisne promenljive koje mogu, ali i ne moraju, imati uticaja na sistem i mogu biti označeni kao promenljive ili faktori. Nezavisno promenljive su kvalitativne (npr. tip stacionarne faze, rastvarača itd.) ili kvantitativne (npr. pH mobilne faze, protok, temperatura stacionarne faze itd.) veličine koje mogu preuzeti jednu od beskonačnog broja ponuđenih vrednosti, dok se faktori definišu kao promenljive koje utiču na određeni rezultat ili proces, odnosno imaju uticaja na sistem. Potrebno je odabrati nivo faktora tj. osetljiv opseg faktora eksperimenta gde je iskustvo analitičara od presudnog značaja.

Izlazi su veličine na koje može, ali i ne mora, da utiče sistem i mogu biti kvalitativni i kvantitativni. Izlazi na koje sistem ima uticaja su zavisno promenljive i nazivaju se odgovori sistema. Odgovori sistema moraju biti takvi da se mogu izraziti brojčanim vrednostima.

Transformacija predstavlja vezu između faktora i odgovora sistema. Matematička funkcija koja opisuje ponašanje sistema i povezuje nivoe faktora i nivoe odgovora sistema naziva se funkcija odgovora ili matematički model [93,94]. Matematički modeli mogu biti najjednostavniji - linearni model ili polinom prvog reda, logaritamske funkcije, polinom drugog reda ili interakcioni model, kvadratni modeli koji mogu opisati i nelinearne veze između faktora i odgovora sistema jer sadrže kvadratne članove (npr. $b_{11}x_1^2, b_{22}x_2^2 \dots b_{kk}x_k^2$).

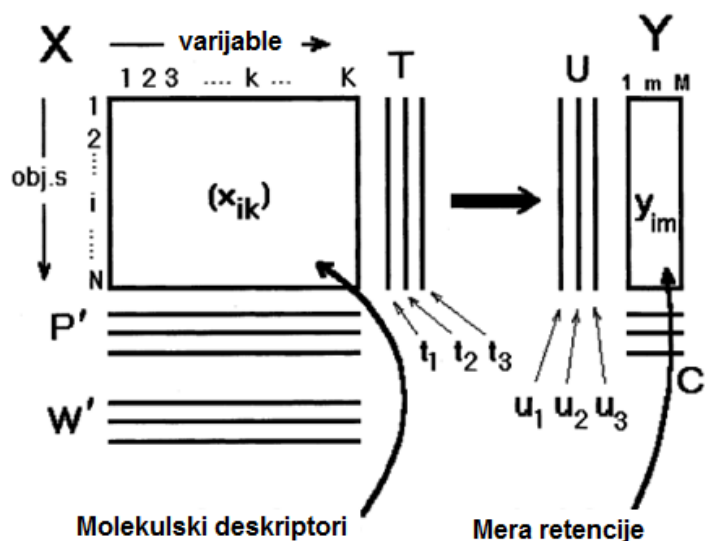
U odnosu na broj varijabli koji se analizira postoji dve vrste pristupa, tj. metoda. Univarijantne metode su analize kojima se opisuju veze između jedne zavisne varijable i jedne ili više nezavisnih varijabli i tu se koristi uglavnom regresiona analiza. Multivarijantne metode ispituju nekoliko zavisnih varijabli (više od dve) istovremeno i predstavljaju skup statističkih metoda koje simultano analiziraju višedimenziona merenja [95]. Podaci se predstavljaju u formi matrice, gde kolone predstavljaju različite ispitivane osobine, a redovi kombinaciju osobina jednog posmatranja (analiziranog sistema) [91]. Teži se pronalaženju komponenti (eng. *latent variable*) koje najbolje opisuju strukturu originalnih varijabli, kao i pronalaženju matematičke zavisnosti između komponenti sistema kako bi se ta struktura mogla opisati i objasniti.

U formiranim matematičkim modelima je značaj nezavisno promenljivih za model opisan vrednošću dodeljene težine (*weights*) odnosno koeficijenta. Koeficijenti u polinomima mogu biti pozitivni ili negativni, što ukazuje da li su faktor i odgovor sistema u direktnoj ili obrnutoj srazmeri, a značajnost nezavisno promenljive se procenjuje na osnovu vrednosti njegovog koeficijenta. Značajnost koeficijenata se može proceniti preko površine odgovora sistema. Ovi 3D grafici omogućavaju bolji pregled optimalnih vrednosti ispitivanih faktora, značajni su u prikazivanju veze između zavisnih i nezavisnih varijabli kao i u proceni robusnosti odgovora sistema [93,96].

Za hemometrijsku analizu hromatografskog ponašanja jedinjenja ziprasidona primenjeno je više metoda eksperimentalnog dizajna: metode multivarijantne analize (metoda parcijalnih najmanjih kvadrata- PLS, analiza osnovnih komponenti - PCA, analiza hijerarhijskog grupisanja - HCA), nelinearna statistička metoda - veštačke neuronske mreže – ANN, hromatografska funkcija odgovora (CRF) i eksponencijalna hromatografska funkcija (CEF).

1.2.1. Metoda parcijalnih najmanjih kvadrata

Metoda parcijalnih najmanjih kvadrata (engl. *Partial Least Squares*, PLS) je linearna regresiona metoda koja povezuje dve matrice podataka, X i Y. Kod obe matrice (X, Y) redove čine eksperimenti (N, i-posmatranja). Kod matrice X kolone su nezavisne varijable (K, k-faktora), koje mogu biti molekulski deskriptori ili eksperimentalni uslovi. Kod matrice Y kolone su zavisne varijable (M, m-odgovora sistema). Dimenzije ovih matrica su X (N x K) i Y (N x M) (Slika 14.). PLS vrši transformaciju formiranih matrica u nekoliko komponenti (eng. *latent variable*) [97,98].

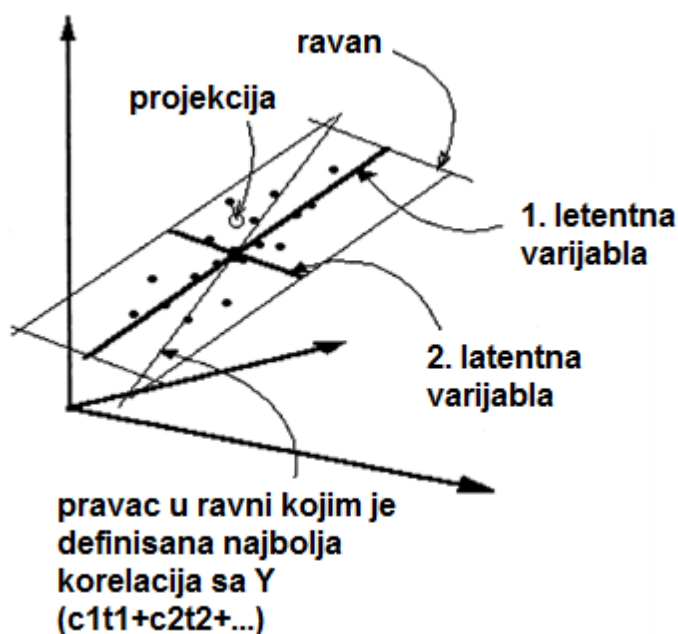


Slika 14. Podaci PLS analize organizovani u matrice [97]

PLS pristup uveo je *Herman Wold* 1975. godine za modelovanje kompleksnih setova podataka, organizovanih u matrice, na koje se nije mogla primeniti uobičajena regresiona analiza. Najveći značaj PLS regresije se ogleda u mogućnosti analize podataka koji su nepotpuni, podataka sa visokom interkorelacijom, matrica sa velikim brojem nezavisnih promenljivih (X), a daje mogućnost i istovremenog modelovanja nekoliko zavisnih promenljivih (Y), opisuje varijacije i zavisnih (Y) i nezavisnih (X) promenljivih. Takođe, ovom metodom se može dobiti model sa velikom tačnošću predviđanja i PLS omogućava veoma pouzdane studije kvantitativnog odnosa između strukture i osobina jedinjenja (engl. *Quantitative Structure Activity Relationships*, QSAR; *Quantitative Structure Retention Relationships*, QSRR) bez obzira na broj

molekula i molekulskih deskriptora za razliku od multilinearne regresije (engl. *Multilinear Regression*, MLR) [99,100].

Zadatak PLS modela je da opiše vezu između položaja analiziranih sistema u X- domenu nezavisnih varijabli i njihovog položaja u Y- domenu odgovora. Sa jednim odgovorom sistema ($M=1$) Y prostor je redukovao na jednodimenzioni vektor. Pre formiranja modela prvo je potrebno obraditi podatke određenom procedurom kako bi se svakoj varijabli (koloni) dodelila jednaka težina (*weight*) da podjednako doprinosi modelu (v. poglavlje 3.6.2.). Zatim se računa prva PLS komponenta tj. latentna varijabla (LV). PLS komponenta je linearna kombinacija originalnih x_k varijabli sa koeficijentima (w_{ka} , $a=1,2,\dots,A$). Projekcija i -eksperimenta na prvu PLS latentnu varijablu (LV1) daje rezultat t_{i1} , na drugu t_{i2} u X domenu, odnosno u_{i1} , u_{i2} u Y domenu itd.



Slika 15. Geometrijski prikaz PLS modela sa dve latentne varijable.

Rezultati svih eksperimenata na LV1 formiraju prvi X-vektor rezultata $\mathbf{t}_1$ i Y-vektor rezultata $\mathbf{u}_1$. LV1 sadrži najviše informacija o originalnim X-varijablama koje su važne za modelovanje i predviđanje odgovora sistema Y. Procena Y nakon uvođenja $\mathbf{t}_1$ se dobija množenjem vektora $\mathbf{t}_1$ sa koeficijentom Y-vektora (c_1), $\hat{Y}_{(1)} = c_1 \cdot \mathbf{t}_1$. Razlike između odmerene i vrednosti procenjene modelom se nazivaju rezidue ($Y - \hat{Y}_{(1)} = f_1$) i to je varijacija koja je ostala neobjašnjena modelom tj. prvom PLS komponentom (LV1). Rezidue ukazuju na kvalitet modela. Ako su vrednosti rezidua velike uvodi se druga

komponenta (LV2) – vektor $\mathbf{t}_2$ (u X domenu ortogonalan na $\mathbf{t}_1$), čime se poboljšava opisna moć modela. Sada se može ispitati kombinovan doprinos vektora $\mathbf{t}_1$ i $\mathbf{t}_2$ u modelovanju i predviđanju Y, $\hat{Y}_{(1)} = c_1 \cdot \mathbf{t}_1 + c_2 \cdot \mathbf{t}_2$. (Slika 15.).

Grafički prikaz projekcija analiziranih sistema u $\mathbf{t}_1/\mathbf{t}_2$ koordinatnom sistemu čini *tt* grafik za prvu i drugu PLS komponentu. Grafik *tt* pokazuje kako su X-prostor (X-uslovi) i odgovarajuće vrednosti raspoređeni jedni u odnosu na druge, tj. na devijacije (*outliers*) u X-podacima. Nivo tolerancije od 95% ili od 99% je definisan elipsom na grafiku pomoću *Hotelling's T²* opsega koji uzima u obzir sve komponente.

Grafički prikaz projekcija analiziranih sistema u $\mathbf{t}_1/\mathbf{u}_1$ koordinatnom sistemu čini *tu* grafik za prvu komponentu. Grafik *tu* pokazuje zavisnost između X i Y i koristi se za identifikaciju stepena zavisnosti između ispitivanih promenljivih, *outlier*-a u X, Y podacima, i u relaciji X i Y. Ovaj grafik daje vizuelnu korelaciju između X i Y prostora i pokazuje koliko korelacija odstupa od linearnosti tj. rasipanje oko prave linije. Takođe, ovaj grafik je koristan i za identifikaciju nelinearne korelacije (*curved*).

Kod PLS modela parametri koji su povezani sa varijablama su težine (*weights*), koeficijenti i VIP_k parametar (engl. *Variable Importance in the Projection*). Interpretacija PLS modela kada se prati jedan odgovor sistema ($M=1$) se vrši najčešće na osnovu izračunatih regresionih koeficijenata i VIP parametara.

Koeficijenti izražavaju vezu između svih uslova u modelu i Y varijabli i međusobno su zavisni, pošto su i varijable zavisne, i pomoću njih je jednostavniji pregled i interpretacija modela [98]. Koeficijenti se odnose na varijable čije su vrednosti centrirane i svedene na istu skalu. Veličina i znak koeficijenata definišu intenzitet uticaja svakog od uslova na model kao i njihove međusobne interakcije na posmatrani odgovor sistema. Veća vrednost koeficijenta znači i veći uticaj uslova na odgovor sistema. Ako koeficijent ima negativan predznak to znači da povećanje vrednosti posmatrane varijable dovodi do smanjenja vrednosti odgovora sistema, dok kod pozitivnog predznaka povećanjem vrednosti povećava se i odgovor sistema.

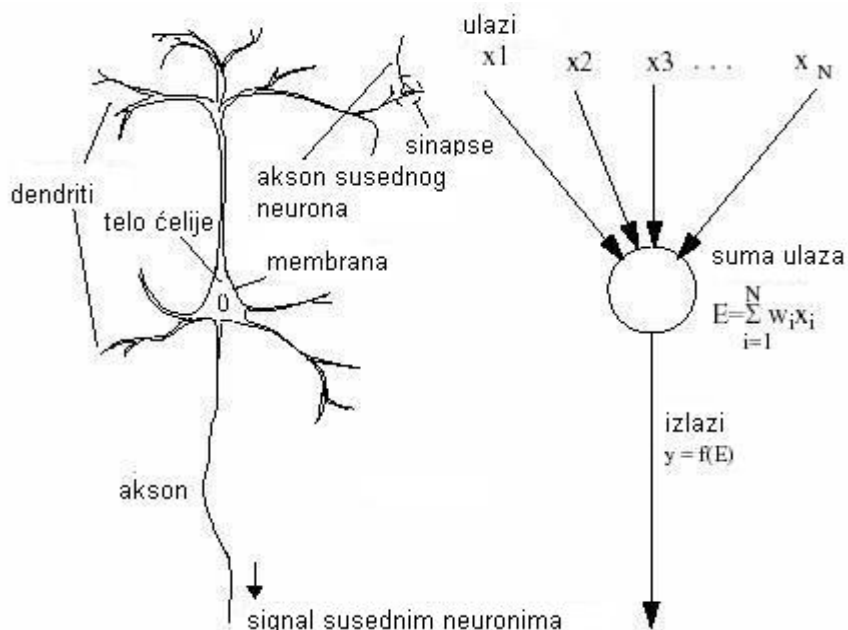
Prilikom PLS modelovanja, odgovarajući matematički program računa uticaj svakog uslova (X_k) na Y-odgovor u modelu i to je predstavljeno kao VIP_k parametar. To je parametar koji sumira važnost svake promenljive (X_k) za obe matrice, Y i X. Nezavisno promenljive X sa VIP vrednostima većim od 1 imaju najveći uticaj na formirani model. X varijable sa VIP parametrom u opsegu $1,0 > VIP > 0,5$ pokazuju

umeren uticaj, dok X-varijable sa VIP vrednostima manjim od 0,5 nisu relevantne za model [98]. Da bi se pokazao značaj različitih X- varijabli, VIP parametar i koeficijenti se najčešće predstavljaju grafički sa intervalima pouzdanosti za nivo značajnosti od 95%. VIP parametar se može koristiti za određivanje promenljivih koje imaju značajan uticaj na ponašanje sistema (*screening* faza) i u optimizacionoj fazi razvoja modela [101,102].

1.2.2. Veštačke neuronske mreže

Veštačke neuronske mreže (engl. *Artificial Neural Networks*, ANN) su matematički modeli dizajnirani da po ugledu na biološke neuronske sisteme imitiraju način na koji ljudski mozak obrađuje informacije [103]. Funkcije iz prirode koje ANN simulira su sposobnosti: 1) sticanja znanja kroz proces učenja na osnovu iskustva (ili obučavanjem), a ne programiranjem; 2) generalizacije (sposobnost predviđanja izlaza za ulaze koji nisu bili prisutni u toku obučavanja) i 3) donošenja zaključaka na osnovu stečenog iskustva [104].

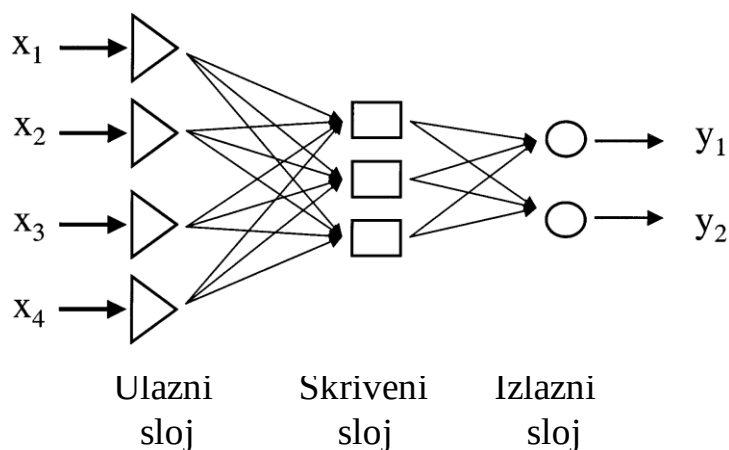
ANN se sastoje od više procesnih jedinica (neuroni ili čvorovi) koji su međusobno povezani, a veza je označena konekcionom snagom ili težinom (eng. *weights*). Svaki veštački neuron ima svoj težinski ulaz (*weighted input*), prenosnu funkciju (*transfer function*) i izlaz (*output*). Dolazeći signali (ulazi, $x_1, x_2, \dots, x_n$) pomnoženi težinskim vezama (*connection weights*, $w_1x_1, w_2x_2, \dots, w_nx_n$) se prvo saberu i dovode do aktivacije neurona $E = f(w_1x_1 + w_2x_2 + \dots + w_nx_n)$, a zatim aktivacioni signal prolazi kroz prenosnu funkciju stvarajući izlaz (*output*, y) za taj neuron [103]. Jasno se može uočiti paralela između veštačkog i biološkog neurona, čiji su osnovni delovi: dendriti (ulazi), telo (funkcija E), aksoni (izlazi), sinapse (spojevi, w_i predstavlja uticaj sinapsi) (Slika 16.).



Slika 16. Uporedni prikaz prirodnog i veštačkog neurona [105]

Prenosna funkcija - $y(E)$ daje nelinearni karakter mreži i naziva se i aktivaciona funkcija. Linearne funkcije su retke i nemaju široku primenu. Različite prenosne funkcije se koriste u ANN (npr. funkcija praga - *step*, u delovima linearna - *ramp*), a najčešće korišćena je sigmoidalna funkcija. Kod prenosne funkcije ukupan zbir se poredi sa određenim limitima, gde se signal u veštačkom neuronu generiše ako je suma veća od limita [106].

ANN topologija ili arhitektura predstavlja organizaciju veštačkih neurona u slojeve i povezivanje ovih slojeva odgovarajućim težinskim vezama. Iako sam neuron ima mogućnost izvođenja jednostavnih procesnih funkcija, moć ANN leži u povezivanju neurona u mrežu [107]. Veze između neurona mogu biti rekurentne (*feedback*) i nerekurentne (*feedforward*), a najčešće korišćena arhitektura nerekurentnih mreža su višeslojni perceptroni (engl. *Multilayer Perceptrons*, MLP). Neuroni su raspoređeni u više različitih slojeva od kojih je svaki neuron u jednom sloju povezan sa svim neuronima sledećeg sloja, dok između neurona istog sloja ne postoji povezanost. Signali se kroz ovakvu mrežu prenose samo u jednom smeru (*feedforward*) (Slika 17.).



Slika 17. Višeslojna nerekurentna mreža

ANN-MLP se označavaju brojem neurona u *ulaznom* sloju, zatim brojem neurona u *skrivenom* sloju i brojem neurona u *izlaznom* sloju (Slika 17., npr. 4-3-2). Broj neurona u *ulaznom* sloju srazmeran je broju faktora koji su od značaja za ponašanje nekog sistema npr. kod tečne hromatografije to bi bili: temperatura stacionarne faze, pH i koncentracija pufera itd. Broj neurona u *output* sloju predstavlja broj izlaznih parametara npr. retenciona vremena ispitivanih jedinjenja pri čemu je broj jedinjenja jednak broju neurona *izlaznog* sloja. Broj neurona u *skrivenom* sloju, kao i broj skrivenih slojeva zavisi od kompleksnosti problema i dizajna mreže i definiše se tokom faze treniranja i validacije kada je potrebno naći kompromisno rešenje jer veoma mali broj može da ometa proces učenja, a veoma veliki smanjuje prediktivne sposobnosti kroz pretreniranje mreže (*overtraining*) [103].

Nakon konstruisanja mreže određene arhitekture odvija se učenje mreže koje predstavlja modifikaciju težina veza (sinapsi) između neurona kako bi se razlika između stvarnog i mrežom predviđenog izlaza tj. greška mreže svela na minimum. Neuronske mreže uče na primerima. Jedan od najčešće korišćenih algoritama za učenje je algoritam propagacije greške unazad (engl. *back propagation*, *BP*) zbog čije efikasnosti je MLP-ANN tip mreže jedna od najvažnijih neuronskih struktura. Kod BP algoritma težina veze se uobličava u pravcu koji odgovara negativnom gredijentu greške određivanja (engl. *gradient descent*) [108]. U prvoj fazi signal ide od ulaza ka izlazu, a u sledećoj se modifikacija težina odvija od izlaza ka ulazu (engl. *backward*) odakle i naziv ovog algoritma za učenje. Ciklus obrade svih uzoraka iz trening seta s ciljem korekcije

vrednosti težina naziva se *epoha*. Treniranje mreže završava se kada nije moguće dalje smanjenje vrednosti greške, tj. kad se povećanjem broja epoha vrednost greške sa promenom vrednosti težina približava nuli. Ako se mreža suviše dugo optimizuje može doći do pretreniranja (*overtraining*). Pretrenirana mreža je suviše prilagođena trening setu, tako da joj se smanjuje tačnost predviđanja za test set (smanjuje se sposobnost generalizacije). Kada mreža daje željene izlaze, odgovarajuće sinaptičke težine se sačuvaju, i onda se mreža koristi za predviđanje rezultata za novi set ulaznih podataka koji nije korišćen u treniranju mreže (test set).

ANN metodologija se veoma razlikuje od standardnih statističkih metoda i predstavlja veoma korisnu tehniku za obradu podataka sa komplikovanim nelinearnim vezama kojih je mnogo u različitim farmaceutskim procesima i istraživanjima. Primena ANN ima širok opseg, od interpretacije analitičkih podataka (modeliranje farmaceutskih analiza u kontroli kvaliteta leka), QSRR studija, dizajniranja lekova (QSAR i molekulsko modelovanje), optimizacije proizvodnog procesa, pa do kliničke farmacije i biofarmacije (farmakokinetičko i farmakodinamičko modelovanje, *in vitro/in vivo* korelacije) [103].

1.2.3. Analiza osnovnih komponenti

Analiza osnovnih komponenti (engl. *Principal Component Analysis*, PCA) je hemometrijska veština pogodna za smanjenje dimenzije skupa podataka, koji se sastoji od velikog broja međusobno povezanih varijabli (multivarijantni tabelarni podaci), za bolju vizuelizaciju i interpretaciju podataka i za smanjenje eksperimentalne greške [109,110]. U PCA analizi osnovne podatke čine analizirani sistemi i varijable koji su u obliku matrice **X** (**m x n**), u kojoj su redovi **m**-analizirani sistemi, a kolone **n**-varijable. Ovom analizom se određuje veza između analiziranih sistema i varijabli, kao i između samih varijabli, ekstrahuju se najvažnije informacije iz skupa podataka, smanjuje se veličina skupa podataka zadržavanjem najvažnijih informacija, pojednostavljuje se opis skupa podataka i analiza strukture varijabli [111,112].

Analizirani sistemi mogu biti analitički uzorci, hemijska jedinjenja, vremenske tačke ili serije u procesu proizvodnje, eksperimenti u eksperimentalnom dizajnu itd. Da bi se okarakterisale osobine ispitivanog analitičkog sistema, mere se varijable koje mogu biti spektralni podaci (NIR, IR, UV, NMR itd.), hromatografski podaci (HPLC,

TLC, GC itd.), ili merenja senzora u procesu proizvodnje (protok, pritisak, temperatura). Ovakva matrica X bi se mogla predstaviti u n -dimenzionom grafikonu, što je grafički nemoguće. U PCA analizi polazna matrica X ($m \times n$), se dekomponuje u dve manje matrice S ($m \times fn$) i D ($n \times fn$) :

$$X (m \times n) = S (m \times fn) \cdot D' (n \times fn) + E (m \times n) \quad (1)$$

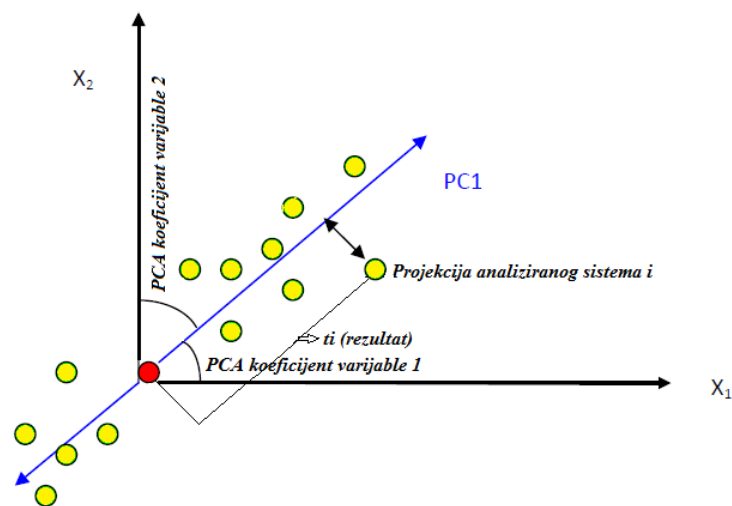
gde S predstavlja matricu rezultata, D matricu PCA koeficijenata varijabli, E je rezidualna matrica, i fn je broj osnovnih komponenti (eng. *Principal Components – PCs*). PCA analiza redukuje n promenljive na manje latentnih varijabli ili osnovnih komponenti (PCs) bez gubitka značajnih informacija u odnosu na originalne varijable [98]. PCs se mogu smatrati novim osama koje su nacrtane u originalnom n -dimenzionom prostoru varijabli i najbolja su aproksimacija podataka u smislu metode najmanjih kvadrata. Prva PC (PC1) objašnjava maksimalne varijanse iz seta podataka, a svaka sledeća se izdvaja tako da u maksimalnom iznosu obuhvata preostali deo ukupne varijanse koji nije obuhvaćen prethodno izdvojenim komponentama. Ukupna varijansa je suma varijansi svih originalnih varijabli. Deo te varijanse koji je objašnjen jednom osnovnom komponentom naziva se svojstvena vrednost ili latentni koren (engl. *eigenvalue*) i predstavlja sumu kvadratnih elemenata svakog svojstvenog vektora (w_{ij} , engl. *eigenvector*). To je zapravo procentualni udeo osnovnih komponenti u ukupnoj varijansi. Svojstvena vrednost (*eigenvalue*) je najveća u prvoj osnovnoj komponenti, a u svakoj sledećoj je manja.

Svake dve osnovne komponente određuju jednu ravan u n -dimenzionom prostoru varijabli. Najčešće se manjim brojem osnovnih komponenti (obično 2-5 PC) objašnjava najveći deo varijansi originalnih promenljivih što omogućava lakše razumevanje informacija sadržanih u podacima. PC su ortogonalne jedna na drugu, nekorelisane i nezavisne, čime se gubitak informacija svodi na najmanju moguću meru. Svaka PC prolazi kroz srednju vrednost varijabli. PC se dobijaju kao linearna kombinacija originalnih varijabli:

$$\begin{aligned} Z_1 &= w_{11}X_1 + w_{12}X_2 + \dots + w_{1p}X_p \\ Z_2 &= w_{21}X_1 + w_{22}X_2 + \dots + w_{2p}X_p \\ &\vdots \\ Z_p &= w_{p1}X_1 + w_{p2}X_2 + \dots + w_{pp}X_p \end{aligned} \quad (2)$$

gde su $Z_1, Z_2 \dots Z_p$, p osnovnih komponenata, w_{ij} su koeficijenti tj. konstante (engl. *weights*) j -te varijable za i -tu osnovnu komponentu ($i=1 \dots p$).

Svaki analizirani sistem $\mathbf{m}$ se može projektovati duž pravca PC. Na primer, ako je analizirani sistem X_i u originalnom skupu podataka koji sadrži 2 varijable određen odgovarajućim koordinatnim tačkama, $X_i = (X_1, X_2)$, u novom koordinatnom sistemu projekcija X_i duž pravca PC1 je nova vrednost tj. rezultat (engl. *score*) t_{i1} (Slika 18.).



Slika 18. Prikaz osnovne komponente –PC1 bivarijantnog skupa podataka

Tako se projekcijom analiziranih sistema na ravan koju čine dve osnovne komponente (npr. PC1 i PC2) dobijaju dve nove koordinatne vrednosti (rezultati), duž prve i druge osnovne komponente. Projekcijom svih analiziranih sistema na ovaj dvodimenzioni prostor moguće je vizuelizovati strukturu ispitivanih podataka, a grafički prikaz ovih projekcija se zove grafikon rezultata (engl. *score plot*). Analizirani sistemi koji su blizu imaju slične karakteristike u pogledu ispitivanih osobina, i suprotno.

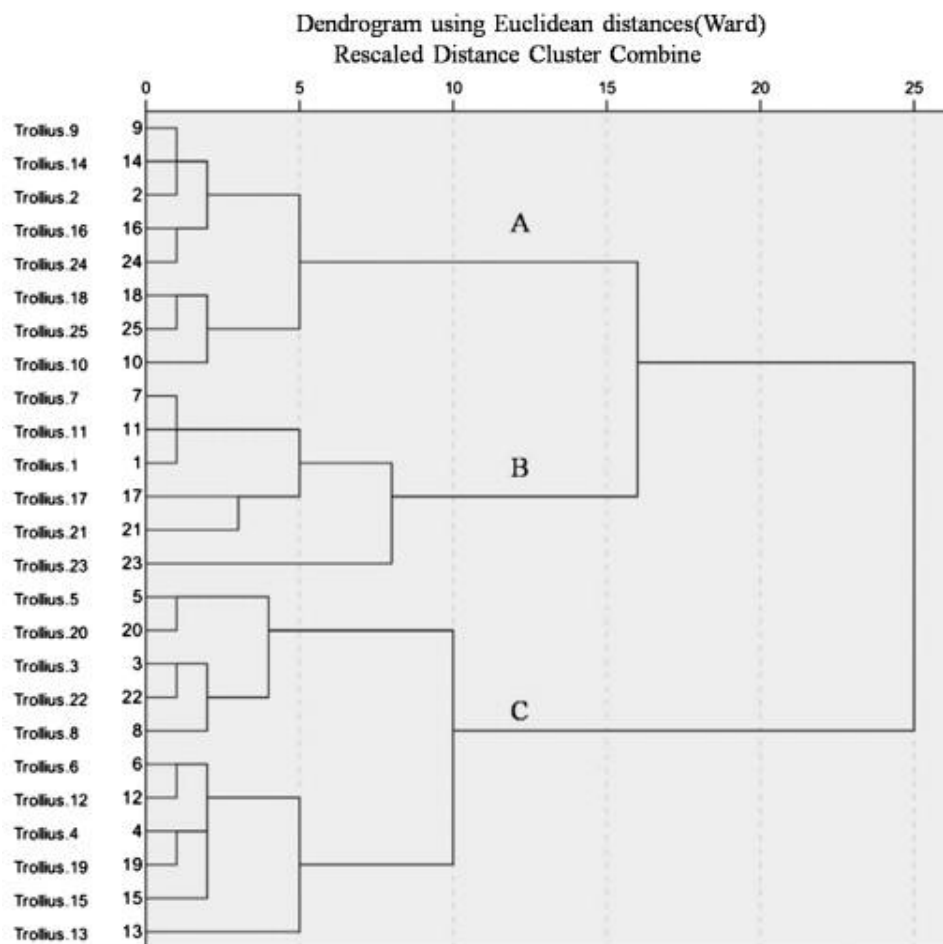
Konstante w_{ij} su svojstveni vektori (engl. *eigenvectors*), i geometrijski su sinusi i kosinusi uglova između novih osa tj. osnovnih komponenata i originalnih varijabli. Ove vrednosti se još nazivaju i PCA koeficijenti varijabli (engl. *loadings*) i oni su mera uticaja svake varijable na varijansu u osnovnoj komponenti. PCA koeficijenti (*loadings*) se koriste za interpretaciju značaja rezultata (velika ili mala korelacija) i načina (pozitivna ili negativna korelacija) na koji merene varijable doprinose rezultatima. Grafički prikaz projekcije PCA koeficijenata na dve osnovne komponente se zove grafikon PCA koeficijenata varijabli (eng. *loading plots*). Ovi grafikoni pokazuju koje

su varijable uticale na određen raspored analiziranih sistema u grafikonima rezultata, kao i kako su varijable međusobno povezane. Varijable koje doprinose sličnoj informaciji su grupisane zajedno i korelisane su pozitivno što znači, kada brojčana vrednost jedne raste ili opada, brojčana vrednost druge ima tendenciju da se menja na isti način. Kada su varijable negativno korelisane, one su pozicionirane na suprotnim stranama u odnosu na centar grafikona (nulta tačka) tj. dijagonalno su u suprotnim kvadrantima. Takođe, udaljenost od centra koordinatnog sistema daje odgovarajuću informaciju. Što su varijable udaljenije od centra, imaju veći uticaj na model tj. više utiču na izdvajanje analiziranih sistema sličnih karakteristika.

1.2.4. Analiza hijerarhijskog grupisanja

Analiza hijerarhijskog grupisanja (engl. *Hierarchical Clustering Analysis*, HCA) se može primeniti na multidimenzionalne skupove podataka, u cilju proučavanja sličnosti (ili razlika) analiziranih sistema u funkcionalnom prostoru varijabli, ili sličnosti promenljivih (varijabli) u funkcionalnom prostoru analiziranih sistema. Osnovni zadatak HCA analize je podela skupa analiziranih sistema (tj. varijabli) na grupe, tako da su varijacije znatno veće između nego unutar grupa [113-117].

Tabelarni podaci zapravo predstavljaju matricu (originalna matrica) gde su n - redovi analiziranih sistema i p - kolone varijabli ($n \times p$). Prvo se vrši izračunavanje udaljenosti svih jedinica međusobno kada se dobija tzv. izvedena matrica ($n \times n$), a zatim se grupe formiraju putem metoda spajanja (aglomerativna hijerarhijska analiza, engl. *Agglomerative Hierarchical Clustering*, AHC) ili razdvajanja (divizionna HCA). AHC je pristup koji se mnogo više primenjuje i grupe nastaju udruživanjem od grana drveta ka korenu (s leva na desno). Drugi način je divizionna metoda kada struktura nastaje deobom od korena ka granama (obrnuto) (Slika 19.). Grafički i matematički prikaz kompletne procedure grupisanja tj. prikaz grupa u obliku stabla povezivanja naziva se dendrogram. Indeksi grupisanih analiziranih sistema (ili varijabli) su prikazani na jednoj osi dendrograma, dok su na drugoj osi nanete vrednosti mere udaljenosti u svakom koraku iterativnog postupka povezivanja grupa. Čvorovi dendrograma predstavljaju grupe, a dužina grana rastojanje između njih. Raspored čvorova i grana čini topologiju drveta. Kraće dužine grana ukazuju na veću sličnost među analiziranim sistemima.



Slika 19. Hijerarhijsko drvo - dendrogram [118]

Postupak svake AHC analize karakteriše:

- određivanje mera sličnosti ili razlike (udaljenosti) između analiziranih sistema i
- izbor metode grupisanja za povezivanje analiziranih sistema (varijabli) u grupe

Mere sličnosti se koriste najčešće za grupisanje varijabli, a mere udaljenosti za grupisanje analiziranih sistema. Primenom ovih mera dobijaju se tzv. izvedene matrice ($n \times n$). Najčešće korišćena mera udaljenosti je Euklidova funkcija (engl. *Euclidean distance*):

$$d_{rs}^2 = \sum_{j=1}^p (x_{rj} - x_{sj})^2 \quad (3)$$

gde je d_{rs}^2 kvadrat Euklidove udaljenosti, x_{rj} vrednost analiziranog sistema x_r za varijablu x_j , a x_{sj} vrednost analiziranog sistema x_s za varijablu x_j . Varijable se obično standardizuju pre izračunavanja udaljenosti da bi svih p varijabli bilo u jednakom položaju (v. poglavlje 3.6.2.). Mera udaljenosti d_{rs}^2 predstavlja opšti element matrice (n

$x \times n$). Na osnovu ove matrice biraju se dve najbliže grupe i udružuju. Matrica se ponovo formira tako što se određuje rastojanje preostalih grupa i nove grupe. Postupak se ponovo ponavlja $n-1$ put (u prvom koraku ima n grupa, svaka ima po 1 element) sve dok se ne formira jedna grupa koja sadrži sve analizirane sisteme, kada se završava AHC analiza.

Najčešće korišćene metode grupisanja su: tri metode povezivanja (*linkage methods*): jednostruko (*single linkage*), potpuno (*complete linkage*), i prosečno povezivanje (*average linkage*); zatim metoda centroida (*centroid linkage*) i metoda minimalne sume kvadrata ili metoda varijanse (*Ward linkage*). Izbor metode grupisanja zavisi od vrste podataka i određene svrhe primene. Sve metode se zasnivaju na izvedenim matricama udaljenosti (razlika) ili sličnosti među analiziranim sistemima ($n \times n$) i razlikuju se prema načinu na koji se procenjuje udaljenost među grupama u sukcesivnim koracima.

Ward-ov metod se veoma često koristi jer je manje osetljiv na prisustvo nestandardnih vrednosti varijabli za dati analizirani sistem. Za svaku grupu računa se aritmetička sredina za svaku varijablu, a zatim se vrši izračunavanje kvadratne Euklidove udaljenosti za svaku varijablu od izračunate aritmetičke sredine. Dobijene kvadratne udaljenosti za sve članove grupe se sumiraju i spajaju se grupe čije je povećanje ukupne sume kvadrata (odstupanje od aritmetičke sredine varijabli) unutar grupe najmanje u odnosu povećanje sume kvadrata do koga je došlo udruživanjem bilo koje druge dve grupe na posmatranom nivou udruživanja [95].

Multivarijantne analize PCA i HCA često se zajedno koriste u farmaceutskim istraživanjima jer opisuju kompleksnu unutrašnju strukturu podataka i to njenim pojednostavljivanjem kroz redukciju podataka, na primer za: klasifikaciju i razlikovanje vrsta lekovitih biljaka po količini i kvalitetu aktivnih principa [118,119], za klasifikovanje i organizaciju hromatografskih parametara lipofilnosti određenih jedinjenja dobijenih u različitim hromatografskim sistemima [120]. PCA analiza se može koristiti i kao semi-kvantitativna metoda za ispitivanje kvantitativnog odnosa između strukture i retencije (QSRR) [121], ali i kao metoda za odabir najznačajnijih molekulskih deskriptora za QSRR model [122].

Obe statističke metode su u poslednje vreme našle primenu u karakterizaciji i identifikaciji sličnih stacionarnih faza u tačnoj hromatografiji u pogledu selektivnosti za

određenu grupu jedinjenja [123-126]. Ovaj pristup je od velikog značaja u kontroli nečistoća u sirovini aktivne supstance i gotovom proizvodu jer smanjuje vreme razvoja analitičke metode i daje mogućnost zamene stacionarnih faza npr. kod nedostatka stacionarne faze navedene u literaturi za određena jedinjenja ili kada se promene performanse stacionarne faze.

1.2.5. Hromatografske funkcije

Hromatografske funkcije prikazuju karakteristike hromatograma (rezolucija, vreme izvođenja analize) odgovarajućom broječanom vrednošću. Često se koriste u optimizaciji hromatografskih metoda [127]. Kvalitet hromatograma definiše više kriterijuma: rezolucija parova pikova, ukupno vreme analize i ujednačenost razdvajanja pikova.

Predloženo je nekoliko različitih hromatografskih funkcija za proces optimizacije [127-130]. Često se u optimizaciji vrši uporedna analiza više hromatografskih funkcija sa kvalitetom hromatograma jer nijedna funkcija nije tako dizajnirana da u potpunosti reflektuje sve potrebne karakteristike hromatograma [131].

Hromatografske funkcije pretežno imaju dva glavna cilja: da maksimalno poboljšaju rezoluciju i da što više smanje vreme izvođenja analize. Zato je bitno pažljivo odabrati optimalne vrednosti koeficijenata (težina) za ova dva parametra u funkcijama, definisati intervale ulaznih parametara kada se funkcija približava optimalnoj vrednosti. Na primer, hromatografska funkcija odgovora – CRF (engl. *Chromatographic Response Function*) je dizajnirana tako da optimalna metoda daje maksimalnu CRF vrednost, a za eksponencijalnu hromatografsku funkciju – CEF (engl. *Chromatographic Exponential Function*) optimalna metoda daje minimalnu CEF vrednost.

Hromatografsku funkciju odgovora - CRF je prvi uveo *Berridge* [128]:

$$CRF = \sum_{i=1}^L R_i + L^{w_1} - w_2 |T_A - T_L| - w_3 (T_1 - T_0) \quad (4)$$

gde je $\sum_{i=1}^L R_i$ suma rezolucija svih parova pikova, L – broj parova pikova, T_A – specificirano maksimalno prihvatljivo vreme analize, T_L – retenciono vreme poslednjeg pika, T_1 – retenciono vreme prvog pika, T_0 – specificirano minimalno retenciono vreme prvog pika, a w_1 , w_2 i w_3 – vrednosti koeficijenata – težina (engl. *weighting factors*) koje se biraju od strane analitičara u zavisnosti od značaja koji želi da dodeli određenom

parametru. Obično se podešavaju u opsegu od 0 do 3. Ova funkcija pored rezolucije između pikova i vremena izvođenja analize sadrži i deo koji se isključivo odnosi na broj pikova na hromatogramu i dodeljuje mu se određeni koeficijent (L^{w_1}).

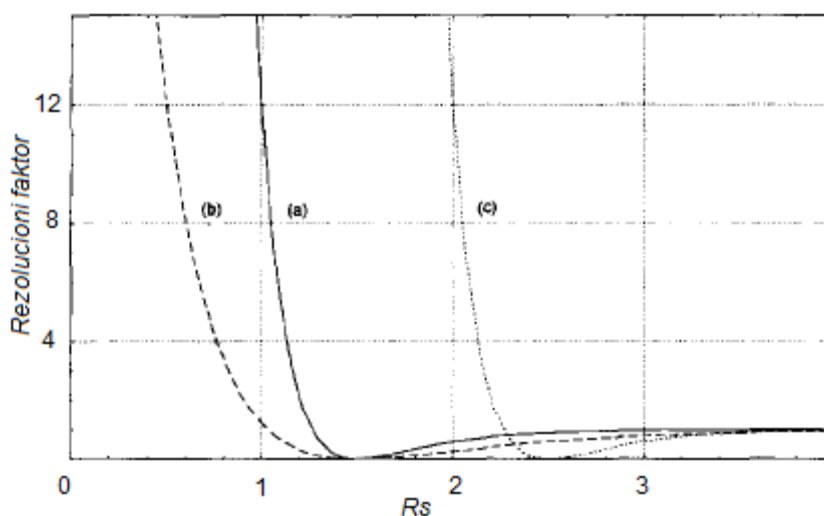
Na osnovu jednačine CRF može se zaključiti da sabiranje svih vrednosti rezolucija ΣRi doprinosi da manji uticaj na CRF vrednost imaju rezolucije nerazdvojenih ili slabo razdvojenih pikova u poređenju sa parovima pikova koji imaju visoke vrednosti rezolucije. Međutim, CRF vrednost je važan parametar u optimizaciji metode ako je funkcija fokusirana na nerazdvojene tj. parove pikova sa najnižim vrednostima rezolucije [132]. Tada se za sve hromatografske uslove u eksperimentalnom dizajnu računa kritična CRF vrednost (CRF-crit) gde se umesto parametra ΣRi , računa $\Sigma Rs-critical$ koji se odnosi samo na sumu rezolucija kritičnih parova. Iako odavno uvedena, CRF funkcija je jedan od osnovnih kriterijuma za određivanje kvaliteta hromatograma [133,134].

Eksponencijalna hromatografska funkcija - CEF je novija funkcija u odnosu na CRF. Definisao ju je *Morris* [127] i mnogi autori je smatraju unapređenom verzijom funkcije:

$$CEF = \left[\left(\sum_{i=1}^{n-1} (1 - e^{a(R_{opt} - R_i)})^2 \right) + 1 \right] \left[1 + \frac{t_f}{t_{max}} \right] \quad (5)$$

gde je t_{max} – specificirano maksimalno prihvatljivo vreme analize, t_f – retenciono vreme poslednjeg pika, a – nagib faktora rezolucije, R_{opt} – optimalna vrednost rezolucije, R_i – rezolucija za i -ti par pikova, n – broj očekivanih pikova. Prvi deo jednačine u uglastoj zagradi se odnosi na rezolucioni faktor, a drugi na faktor vremena. Kod rezolucionog faktora dodaje se jedinica kako bi CEF funkcija razlikovala kvalitet hromatograma na osnovu vremena analize kada rezolucije dostignu optimalne vrednosti tj. kada je postignuto optimalno razdvajanje ispitivanih jedinjenja (npr. $R_{opt}=R_i$). Tako da CEF ima mogućnost isticanja važnosti rezolucije u odnosu na vreme analize ili obrnuto.

Vrednost a predstavlja nagib faktora rezolucije i to je parametar CEF funkcije čiju vrednost zadaje analitičar. Smanjenjem vrednosti a smanjuje se nagib krive, što znači da će promene u rezoluciji imati slabiji uticaj na vrednost funkcije. Time se smanjuje značaj faktora rezolucije u odnosu na vreme analize, i obrnuto (Slika 20.).



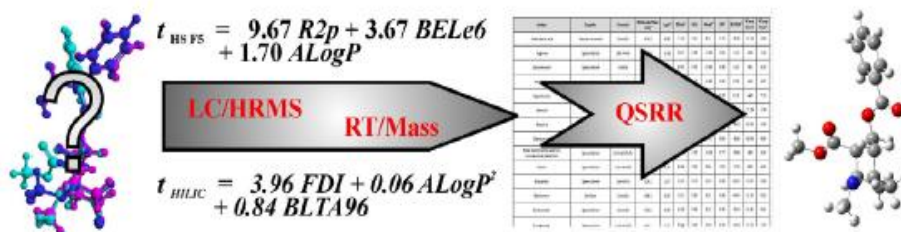
Slika 20. Grafik rezolucionog faktora u odnosu na rezoluciju za sledeće zadate vrednosti a i R_{opt} : a) $a=3$, $R_{opt}=1,5$; b) $a=1,5$, $R_{opt}=1,5$; c) $a=3$, $R_{opt}=2,5$ [127]

U postupku optimizacije UPLC metode za ispitivanje ziprasidona i njegovih nečistoća korišćene su hromatografska funkcija odgovora - CRF i eksponencijalna funkcija - CEF i vršena je njihova uporedna analiza u proceni kvaliteta hromatograma.

1.3. KVANTITATIVNI ODNOSI STRUKTURE I RETENCIJE (QSRR) DERIVATA ZIPRASIDONA

Reverzno-fazna tečna hromatografija (RP-LC) je jedna od najčešće korišćenih tehnika u separaciji smeša jedinjenja u farmaceutskim i biomedicinskim analizama. S obzirom na veliki broj dostupnih stacionarnih faza i na veliku raznovrsnost hromatografskih sistema i aditiva mobilne faze, izbor početnih uslova pri razvoju analitičke metode postaje sve teži. Da bi se prevazišao pristup “pokušaja i greške” i problem skupih i dugotrajnih eksperimenata, u poslednje dve decenije intenzivno se pristupilo razvoju matematičkih modela koji mogu da predvide hromatografsku retenciju na osnovu hemijske strukture jedinjenja [100]. Naime, uspostavljanjem kvantitativnih odnosa strukture i retencije (*engl. Quantitative Structure Retention Relationship*, QSRR) dobija se matematički model koji povezuje hromatografsku retenciju sa hemijskom strukturom jedinjenja tj. molekulskim deskriptorima ispitivane grupe jedinjenja (Slika 21. [135]). Hromatografska retencija u tačnoj hromatografiji se

može predstaviti brojčanom vrednošću kao retenciono vreme (t_R ili $\log t_R$) [136], faktor retencije (k ili $\log k$) [137] ili kao R_M vrednost [120].



Slika 21. Ilustracija QSRR modelovanja [135]

Prvi radovi iz QSRR oblasti koristili su metodologiju koja se primenjivala u studijama kvantitativnog odnosa strukture i biološke aktivnosti, takozvani *Hansch*-ov pristup primenjen na hromatografske podatke [138]. Za QSRR analizu neophodne su dve vrste ulaznih podataka:

- kvantitativno uporedivi retencioni podaci dovoljno velikog broja jedinjenja i
- niz različitih molekulskih deskriptora.

U osnovi svakog matematičkog modela koji povezuje karakteristike molekula sa molekulskim deskriptorima je empirijska matematička funkcija f :

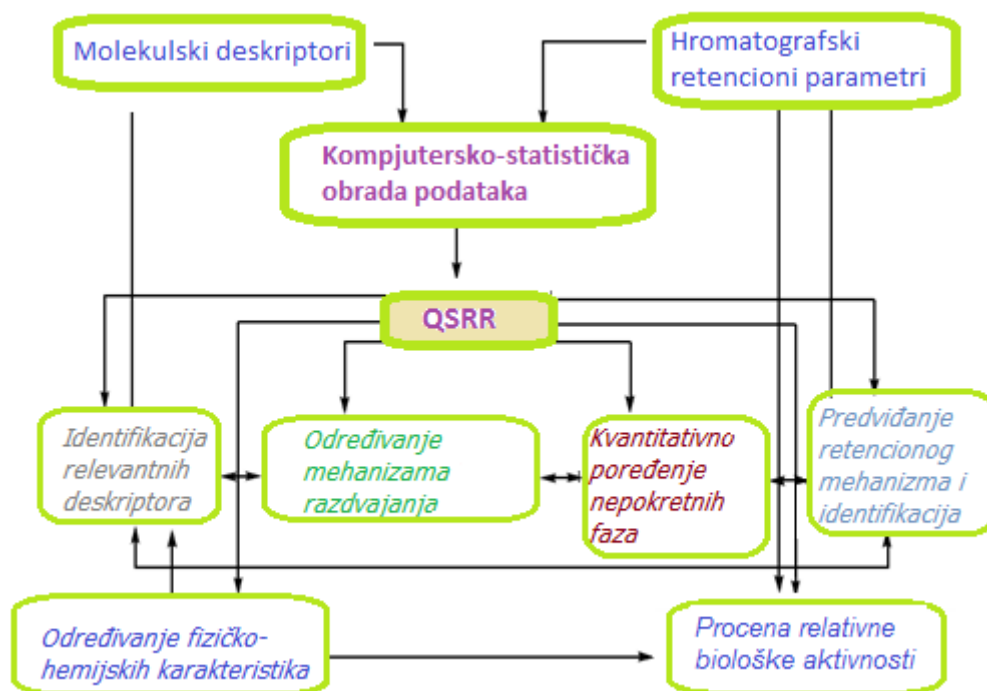
$$y = f(X_1, X_2, \dots, X_n). \quad (6)$$

U jednačini (6) y je zavisno promenljiva (eksperimentalno izmerena karakteristika), dok je (X) nezavisna promenljiva kojih može biti više i to su molekulski deskriptori. Matematička funkcija (6) treba da je takva da uz pomoć molekulskih deskriptora, u što je moguće većoj meri, opisuje eksperimentalno izmerenu karakteristiku. Pored retencije, eksperimentalno izmerena karakteristika može da bude i neka druga fizičko-hemijska osobina kada je reč o kvantitativnom odnosu strukture i osobina (engl. *Quantitative Structure Property Relationship*, QSPR), ili biološka aktivnost - kvantitativni odnosi strukture i aktivnosti (engl. *Quantitative Structure Activity Relationships*, QSAR). Sve ove funkcije predstavljaju oblast kompjuterskog istraživanja koja razvojem matematičkih modela uspostavlja matematičke korelacije između parametara hemijske strukture i odgovarajuće karakteristike jedinjenja.

Nekoliko osnovnih tipova QSRR analize se može primeniti. Najstariji tip QSRR-a uspostavlja korelaciju između retencionih parametara ($\log k / \log k_w$) i logaritma

particionog koeficijenta n-oktanol-voda ($\log P$) [139,140]. Drugi tip QSRR-a se zasniva na solvatohromnoj jednačini tj. solvatohromnim parametrima koji opisuju retenciju ($\log k$) u RP-LC sistemu (engl. *Linear Solvation Energy Relationships*, LSERs) [141,142]. Treći tip QSRR-a uspostavlja zavisnost između hromatografske retencije i strukturnih deskriptora dobijenih računarskom hemijom [138,143,144].

Metodologija i ciljevi QSRR studija su prikazani na Slici 22 [145].



Slika 22. Metodologija i ciljevi QSRR studija

Hemometrijskom obradom hromatografskih podataka može se dobiti sistematična informacija i o ispitivanom analitu i o stacionarnoj fazi. QSRR studija se može nazvati i QSPR studija jer se koristi za predviđanje određenih osobina seta podataka. QSRR studije mogu biti primenjene za:

- identifikaciju molekulskih deskriptora koji daju relevantnu informaciju o ispitivanoj supstanci i najviše utiču na retenciono ponašanje
- predviđanje retencije novih i identifikaciju nepoznatih jedinjenja
- razumevanje molekulskih mehanizama razdvajanja (retencije) u datom separacionom sistemu
- kvantitativno poređenje separacionih osobina pojedinih tipova hromatografskih stacionarnih faza

- brzu i efikasnu procenu složenih fizičko-hemijskih osobina molekula kao što su lipofilnost i konstante disocijacije i sl.
- predviđanje relativne biološke aktivnosti unutar serije srodnih supstanci [146]. Naime, QSPR modeli povezuju strukturno-zavisne osobine jedinjenja (fizičke karakteristike, npr. lipofilnost (logP, logD), aromatičnost, pK_a, rastvorljivost) sa farmokokinetičkim (FK) /farmakodinamskim (FD) parametrima npr. volumen distribucije leka, prolazak kroz krvno-moždanu barijeru, placentu, frakcija apsorbovanog leka, nevezanog leka u plazmi itd., i njihov značaj je u tome što se mogu koristiti za predviđanje FK/FD osobina novog kandidata leka slične strukture [147-150].

Veliki značaj QSRR analize je i u tome što su osnovni farmakokinetički i farmakodinamički procesi (resorpcija, distribucija, ekskrecija, i aktivacija receptora) slični procesima koji vladaju hromatografskom separacijom. Iste osnovne intermolekulske interakcije određuju ponašanje hemijskih jedinjenja i u biološkom i u hromatografskom okruženju [138].

1.3.1. Formiranje modela

Sam proces formiranja QSRR modela se vrši u nekoliko koraka:

- odabir molekulskog seta podataka za QSRR studiju i izbor i optimizacija dominantnih molekulskih/jonskih oblika pri odgovarajućoj pH vrednosti
- izračunavanje molekulskih deskriptora
- odabir molekulskih deskriptora tj. nezavisno promenljivih sa najvećim uticajem na zavisno promenljivu primenom odgovarajućeg statističkog metoda
- formiranje QSRR modela primenom linearnih i nelinearnih statističkih metoda
- validacija modela

1.3.1.1. Molekulski deskriptori

Molekulski deskriptori se mogu definisati kao numeričke vrednosti koje su krajnji rezultat logičke i matematičke procedure (primene nekog matematičkog algoritma) kojom se informacija o strukturi molekule prevodi u korisnu numeričku vrednost koja simbolično predstavlja određenu karakteristiku molekule. Navedena definicija opisuje *teorijske deskriptore*, a oni mogu biti i rezultat standardizovanog eksperimenta kada se klasifikuju kao *eksperimentalni deskriptori*. „Korisna“ numerička

vrednost u ovom kontekstu podrazumeva da dobijena vrednost može značajno doprineti boljem razumevanju molekulskih osobina i/ili da može biti korišćena u modelu za predviđanje osobina drugih molekula [100]. Primenuju se za modelovanje nekoliko različitih osobina u različitim oblastima kao što su: farmaceutska hemija, analitička hemija, fizička hemija, toksikologija, medicina, hemija životne sredine, i druge [151].

Molekul kao realan objekat sadrži sve hemijske informacije, a samo deo ove informacije može biti ekstrahovan eksperimentalnim merenjima. Molekulski deskriptori su brojevi kojima se mali deo informacija može dobiti na osnovu različitog predstavljanja hemijske strukture. Osnovna razlika između teorijskih i eksperimentalnih deskriptora je da ovi prvi nemaju statističku grešku, što nije slučaj kod eksperimentalnih deskriptora, a najveća prednost teorijskih je obično u smislu vremena, troškova i dostupnosti. Teorijski deskriptori koji se zasnivaju na fizičkim i fizičko-hemijskim teorijama pokazuju preklapanja sa nekim eksperimentalnim merenjima tj. deskriptorima (npr. neki kvantno-hemijski deskriptori, deskriptori molekulskih površina dostupni rastvaraču, volumenski) [152].

Broj strukturnih deskriptora koji se može izračunati za neko jedinjenje je praktično neograničen. Na primer, samo pomoću Dragon softvera koji se često koristi u ove svrhe, moguće je izračunati preko 4000 molekulskih deskriptora. Međutim, može se uvesti još hiljade novih deskriptora bez poboljšanja njihovog statističkog kvaliteta i fizičko-hemijskog značenja. Ovako izračunati deskriptori iz molekulske formule ili strukture su veoma privlačni jer mogu znatno da doprinesu kvalitetu formiranih modela, ali je pitanje da li oni nose stvarnu informaciju o osobinama jedinjenja ili su samo njegov simbolični prikaz. Dakle, sa hemijske tačke gledišta značajni su samo oni teorijski deskriptori koji se jasno mogu povezati sa retencijom, farmakokinetičkim parametrima, biološkom aktivnošću ili nekom drugom ispitivanom osobinom. [152,153].

Pored navedene podele na teorijske i eksperimentalne, postoji nekoliko načina za klasifikaciju deskriptora u grupe. Jedna od podela je na osnovu dimenzije, u kojoj je predstavljena molekula, iz koje se izračunavaju. U zavisnosti od načina prikazivanja molekule, teorijske deskriptore možemo podeliti na nulte-(0D), jedno-(1D), dvo-(2D), tro-(3D) i četvoro-(4D) dimenzionalne [152]:

- *0D-deskriptori (nulti)* su najjednostavniji, dobijaju se iz molekulske formule i nezavisni su od molekulske strukture, pokazuju hemijski sastav jedinjenja bez informacija o geometriji molekule (npr. neki konstitucionalni deskriptori: broj određenih atoma ($N_H = 1$, $N_{Cl} = 1$), bilo koja funkcija osobine atoma (atomska masa, naelektrisanje, *van der Waals*-ov radius), molekulska masa (M_r))
- *1D-deskriptori* predstavljaju molekul u vidu liste strukturnih molekulskih fragmenata. List mogu da budu parcijalni list fragmenata, funkcionalne grupe ili substituenti od interesa tako da ne zahtevaju potpuno poznavanje molekulske strukture. Primer ovih deskriptora su broj funkcionalnih grupa (amino grupa, estara, broj atoma donora H-veze itd).
- *2D-deskriptori* su topološki deskriptori (dvodimenzionalno predstavljanje molekule naziva se i topološko predstavljanje) i daju informacije o povezanosti atoma u molekuli uzimajući u obzir i tip veze i interakciju između atoma. Osetljivi su na veličinu molekula, oblik, račvanje molekula, cikličnost, ali takode daju informaciju o vrsti atoma i mnogostrukosti veza (Zagreb indeks, Balaban indeks, Randić indeks (R), Wiener indeks (W), Kier-ov indeks fleksibilnosti (Φ) itd.) [137].
- *3D-deskriptori* se računaju iz geometrijske ili trodimenzionalne strukture molekule (geometrijski deskriptori) i ne samo da opisuju povezivanje i tip veze između atoma, već i celokupnu prostornu konfiguraciju molekule. Za razliku od 2D-deskriptora nisu osetljivi na veličinu molekula, i stoga su primenljivi na veliki broj molekula veoma različitih struktura (3D MoRSE deskriptori, GETAWAY deskriptori, površinske osobine molekula, *van der Waals*ove zapremine i dr.),
- *4D-deskriptori* dobijaju se iz stereoelektronskog prikazivanja molekule ili prikazivanja u vidu rešetke. Oni su rezultat molekuskog predstavljanja koje se odnosi na molekulske osobine koje nastaju iz elektronske raspodele tj. interakcije ispitivanog molekula sa odgovarajućim probama (atomi ili atomske grupe, npr. molekul vode, metil grupa, vodonik) koje su postavljene u prostor oko molekule (npr. molekulska polja interakcija).

Klasifikacija deskriptora se može izvršiti i na fizičko-hemijske (logP), kvantno-hemijske (HOMO, LUMO, polarizabilnost), teorijske (topološki, geometrijski) itd.

Prednost fizičko-hemijskih deskriptora je što su oni jasno povezani sa retencijom, ali su često nedostupni ili usled pojednostavljivanja postupka obračunavanja pokazuju velike greške. Prednost kvantno-hemijskih deskriptora je što pružaju informaciju o mehanizmu retencije na molekulskom ili čak nižem nivou (submolekulskom), ali veza sa retencijom je vrlo slaba i nije ih lako izračunati. Treći tip deskriptora, teorijski (topološki, geometrijski) se lako računaju, ali ne mogu se uvek lako povezati sa retencijom [100]. Postoji i podela prema prirodi osobine koju deskriptori opisuju: lipofilnost (logP, logD), sposobnost građenja vodoničnih veza, elektronske osobine molekula (naelektrisanje, polarizabilnost, dipolni moment, različite vrste energije), sterne karakteristike, topološke osobine molekula (atomske veze u molekulu, veličina, simetrija, račvanje, oblik molekula), termodinamički deskriptori.

1.3.1.2. Statističke metode za izbor molekulskih deskriptora i formiranje

QSRR modela

Broj molekulskih deskriptora stalno raste, ali kada se vrši QSRR modelovanje određene grupe jedinjenja, realno je pretpostaviti da je samo mala grupa deskriptora ustvari povezana sa odgovarajućim eksperimentalnim rezultatom (odgovor sistema). [152]. Postoje dva glavna pristupa za izbor molekulskih deskriptora koji će biti ulazne promenljive za QSRR model. Prvi pristup je formiranje QSRR modela sa *a priori* odabranim malim setom molekulskih deskriptora na osnovu fizičko-hemijskih osobina molekula koje su poznate analitičaru. Kod drugog pristupa QSRR model se dobija iz inicijalno velikog seta deskriptora (stotine ili hiljade) od kojih se najbolji biraju pomoću odgovarajućih metoda za odabir promenljivih koje najviše utiču na posmatranu osobinu jedinjenja ili samom statističkom metodom kojom se vrši modelovanje [100]. Pošto kvalitet QSRR modela uglavnom zavisi od odabira molekulskih deskriptora iz velikog seta često višestruko korelisanih deskriptora, izbor metode kojom će se najznačajniji set deskriptora izdvojiti je osnova za formiranje odgovarajućeg modela.

Cilj metoda za izbor promenljivih je da poboljšaju interpretaciju modela (jednostavni modeli), odbace beznačajne efekte (da smanje šum odgovora), povećaju prediktivnost modela i da skrate vreme potrebno za formiranje modela. MLR [100,154] je najčešće korišćena tehnika, ali problem nastaje kada podaci sadrže više varijabli nego ispitivanih molekula, kada se koristi u kombinaciji sa genetičkim algoritmom (engl.

Genetic Algorithm, GA-MLR) [155,156] ili postupna MLR (*stepwise MLR*) analiza, gde se selekcija deskriptora unapred (*forward*) ponavlja sa njihovom eliminacijom unazad (*backward*). Pored tradicionalne MLR, sve se više koriste unapređene metode modeliranja kao što su: metoda parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS) [100,154], kombinacija PLS i genetičkog algoritma (GA-PLS) [100], klasifikaciona i regresiona stabla (*classification and regression trees*) [157].

PLS regresija, jedna od osnovnih alatki u hemometriji, je u skorije vreme razvijena generalizacija MLR. Metoda PLS se dosta primenjuje u odabiru molekulskih deskriptora zahvaljujući VIP parametru, koji sumira važnost svake varijable za model (tj. za obe matrice promenljivih X i Y) u PLS regresiji.

Važnost svake varijable u PLS projekciji (VIP) predstavljaVIP metodu za izbor varijabli [101,102] na osnovu izračunatih VIP vrednosti za svaku varijablu i isključuje varijable sa VIP vrednostima ispod prethodno definisanog limita u (obično $u=1$). Sve varijable koje povećavaju prediktivnu moć modela se zadržavaju. VIP vrednost za varijablu j je definisana jednačinom:

$$VIP_j = \sqrt{\frac{p}{\sum_{m=1}^M SS(b_m \cdot t_m)} \sum_{m=1}^M w_{mj}^2 SS(b_m \cdot t_m)} \quad (7)$$

gde je p - broj varijabli, M broj zadržanih latentnih varijabli, w_{mj} je PLS težinski koeficijent (*PLS weight*) j -te varijable za m -tu latentnu varijablu i $SS(b_m \cdot b)$ je procenat Y promenljive objašnjen m -tom latentnom varijablom. Naime, VIP je suma kvadrata PLS težinskih koeficijenata (w), koji uzimaju u obzir objašnjenu varijansu svake PLS dimenzije. Pravilo „veće od jedan“ se generalno koristi kao kriterijum za odabir varijabli zato što je prosečna vrednost kvadrata VIP vrednosti jednaka 1.

Nakon odabira varijabli tj. molekulskih deskriptora sa najviše informacija o ispitivanim jedinjenjima, potrebno je izabrati odgovarajuću metodu za formiranje modela. Pored gore navedenih metoda i njihovih modifikacija, koje se najviše koriste za linearno modelovanje (MLR, postupna MLR, PLS, GA-MLR/GA-PLSR) za QSRR modelovanje se koristi i nelinearna statistička metoda - veštačke neuronske mreže (ANN) [158-161]. ANN predstavljaju fleksibilniju metodu za formiranje modela u odnosu na MLR, jer se i linearne i nelinearne funkcije mogu koristiti ili kombinovati prilikom obrade podataka. Ove performanse omogućavaju opisivanje kompleksnijih

odnosa između retencije i višedimenzionih prostornih deskriptora, što može da vodi ka modelu sa boljim sposobnostima predviđanja [121].

1.4. VALIDACIJA MODELA

Validacija modela je jedan od ključnih koraka prilikom procene matematičkih modela koji omogućava poređenje formiranih modela i izbor optimalnog modela sa najvećim prognostičkim potencijalom. U zavisnosti od veličine ulaznih podataka, to jest od odnosa broja molekula i broja nezavisnih varijabli (npr. molekulskih deskriptora, pH mobilne faze itd.) postoje dva načina formiranja matematičkog modela [162,163]:

1. podela osnovnog skupa jedinjenja na tri skupa gde svaki treba da reprezentuje originalni – polazni skup: trening set (skup korišćen za treniranje modela), verifikacioni (kalibracioni) skup (provera performansi modela) i validacioni skup (test set ili kontrolni skup, provera moći predviđanja modela, tzv. eksterna validacija)
2. kada je mali skup jedinjenja, polazni skup se ne deli već se testiranje modela vrši unutrašnjom ukrštenom validacijom (engl. *Cross Validation*, CV).

Cilj je da se dobije značajan, odnosno robustan model koji ima dobru moć predviđanja.

Kod ukrštene validacije najčešće se primenjuje pristup „izostavi jednu vrednost“ - “*Leave-One-Out Cross Validation (LOO-CV)*” [164]. Sam postupak se zasniva na isključivanju jednog para podataka (x_i, y_i) , a zatim se formira novi model sa preostalih $n-1$ podataka. Dobijeni regresioni model sa $n-1$ podataka se zatim koristi za predviđanje vrednosti y koja nije bila uključena u formiranje modela. Svaki model se procenjuje merenjem tačnosti predviđanja odgovora. Odstupanje isključenog (x_i, y_i) podatka se računa prema formuli $e_{(i)} = y_i - \hat{y}_{i/i}$, gde je y_i zadata vrednost, a $\hat{y}_{i/i}$ vrednost predviđena datim modelom kada je izostavljena i -ta vrednost iz seta podataka. Proces se ponavlja za svih $i = 1, 2, \dots, n$ parova podataka računajući vrednosti odstupanja $e_{(1)}, \dots, e_{(n)}$ od odgovarajućih modela. Na osnovu predviđene rezidualne sume kvadrata (*Predicted Residual Sum of Squares*, PRESS) i ukupne sume kvadrata (SSTo) računa se vrednost Q^2 , kojom se procenjuje statistički značaj modela. Ova vrednost predstavlja unakrsno validiranu R^2 vrednost (R^2_{cv} ili Q^2):

$$PRESS = \sum_{i=1}^n e_{(i)}^2 \quad (8)$$

$$Q^2 = 1 - \frac{PRESS}{SSTo} \quad (9)$$

Regresioni modeli sa $Q^2 \geq 0,5$ se smatraju dovoljno pouzdanim za predviđanje i izračunavanje zavisno promenljivih, pogotovu kod malog seta jedinjenja [165].

Sposobnost modela da izvrši predviđanje jedinjenja u trening setu se procenjuje na osnovu vrednosti srednje kvadratne greške procene, RMSEE (engl. *Root Mean Square Error of Estimation*):

$$RMSEE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (10)$$

gde je n broj uzoraka u trening setu, a y i $\hat{y}_i$ predstavljaju eksperimentalne i predviđene vrednosti jedinjenja u trening setu.

Sposobnost modela da izvrši predviđanje jedinjenja u test setu se procenjuje na osnovu vrednosti srednje kvadratne greške predviđanja, RMSEP (engl. *Root Mean Square Error of Prediction*):

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_{i/i})^2}{n}} \quad (11)$$

gde je n broj uzoraka u test setu, a y i $\hat{y}_{i/i}$ predstavljaju eksperimentalne i predviđene vrednosti jedinjenja u test setu.

Pored navedenih parametara, procena kvaliteta i prognostičkog kapaciteta formiranih modela, kao i poređenje modela i odabir optimalnih, vrši se na osnovu vrednosti parametara kao što su: koeficijent korelacije (r), koeficijent determinacije (R^2), standardizovan kvadrat koeficijenta determinacije (R_{adj}^2), F odnos i p vrednost.

$$R^2 = \frac{SSR}{SSTo} \quad (12)$$

$$R_{adj}^2 = 1 - \frac{MSE}{MS(Total)} \quad (13)$$

R^2 i R_{adj}^2 su parametri koji pokazuju koliko odstupa regresiona funkcija od zadatih vrednosti y_i , tj. ukazuju na deo varijacije zavisne promenljive koji je objašnjen modelom. Ako se odgovarajuća eksperimentalno dobijena vrednost obeleži sa y_i ,

vrednost izračunata datim regresionim modelom $\hat{y}_i$, a n predstavlja broj podataka koji formiraju jednačinu, iz ovih vrednosti se dalje mogu računati:

- *ukupna suma kvadrata (ukupna varijacija):*

$$SSTo = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 \quad (14)$$

- *suma kvadrata greške (varijacija za koju ne postoji objašnjenje):*

$$SSE = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (15)$$

- *regresiona suma kvadrata (varijacija za koju postoji objašnjenje) :*

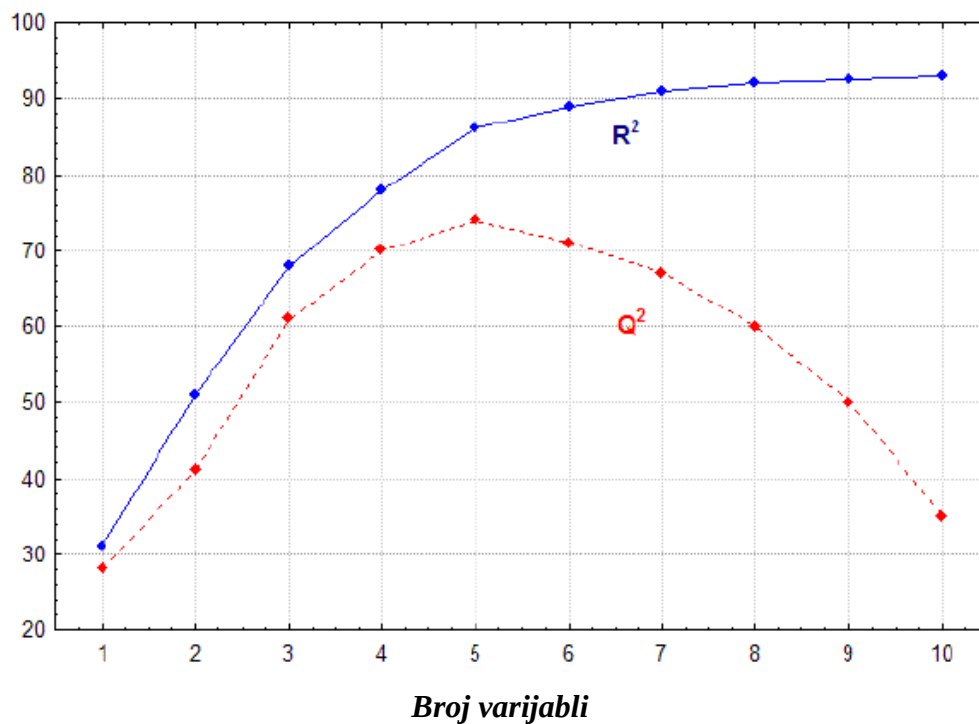
$$SSR = \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2 \quad (16)$$

gde je:

$$\bar{y} = \sum_{i=1}^n \frac{y_i}{n} \quad (17)$$

Varijanse MSR (regresiona), MSE (rezidualna) i MS (ukupna) predstavljaju količnik odgovarajućih varijacija i stepeni slobode ispitivanog modela, kao na primer $MS=SS/df$. F parametar se izračunava kao odnos dve varijanse $F=MSR/MSE$, dok se p -vrednost izračunava kao nivo važnosti F parametra.

Iz navedenih jednačina se vidi da ako se smanjuje vrednost SSE (npr. dobijen je bolji model), i R^2 i F rastu proporcionalno sa SSE dok RMSEE opada. Dakle, model koji najviše odgovara može biti procenjen sa bilo kojim od ova tri parametra ($\max(R^2)$, $\max(F)$, i $\min(RMSEE)$). Takođe, R^2 vrednost uvek raste sa porastom broja varijabli u istom modelu, što ukazuje da se ovaj parameter ne može sam koristiti za odabir najboljih modela, poređenje modela i odabir varijabli koje najviše utiču na model. Za razliku od R^2 , Q^2 raste dok god se korisne varijable dodaju varijablama prethodnog modela; kada se varijable koje ne odgovaraju modelu dodaju Q^2 vrednost se smanjuje (Slika 23.). Stoga se optimalna kompleksnost modela i model koji ima najbolju moć predviđanja bira na osnovu maksimalne Q^2 vrednosti, kao i minimalne vrednosti grešaka predviđanja RMSEE, RMSEP.



Slika 23. Grafik promene vrednosti R^2 i Q^2 pri promeni broja varijabli [151]

Na osnovu svega navedenog, više vrednosti r , R^2 , R^2_{adj} , F , p i Q^2 i niže vrednosti RMSEE i RMSEP parametara moraju biti zadovoljene u cilju dobijanja pouzdanih modela.

2. CILJ RADA

Ciljevi ove doktorske disertacije su:

1. Razvoj nove osjetljive HPLC-UV metode za određivanje ziprasidona, njegovih sintetskih i degradacionih nečistoća, kao i nečistoća sa genotoksičnim potencijalom. Optimizacija eksperimentalnih uslova primenom linearnih (PLS) i nelinearnih (ANN-MLP) statističkih metoda i ispitivanje selektivnosti RP stacionarnih faza za ispitivana jedinjenja primenom PCA i AHC analize. Validacija optimizovane RP-HPLC metode i njena primena za identifikaciju i određivanje ziprasidona i njegovih nečistoća u farmaceutskim doziranim oblicima.
2. QSRR analiza i primena linearnih (PLS) i nelinearnih (ANN-MLP) statističkih metoda za definisanje kvantitativnog odnosa između hemijske strukture i osobina ispitivanih jedinjenja i retencije u razvijenom RP-HPLC sistemu. Teorijsko objašnjenje separacionih procesa i mehanizama retencije odgovornih za retenciono ponašanje. Primena formiranih QSRR modela za predviđanje razdvajanja potencijalnih nečistoća ziprasidona prisutnih u generičkom leku i drugih derivata ziprasidona.
3. Razvoj brze metode tačne hromatografije pod ultra visokim pritiskom (transfer RP-HPLC metode na UPLC) za analizu ziprasidona i nečistoća I-V uz istovremenu mogućnost karakterizacije nepoznatih nečistoća. Optimizacija eksperimentalnih uslova primenom PLS-modela i hromatografskih funkcija. Validacija predložene UPLC metode sa masenom detekcijom (UPLC-MS-MS) i potvrda njene primenljivosti za određivanje sadržaja ziprasidona i degradacionih proizvoda u sirovini ziprasidona i farmaceutskim doziranim oblicima.
4. Određivanje masa molekulskih jona i fragmenata ziprasidona i njegovih nečistoća UPLC-MS-MS metodom tj. tripl kvadrupolskim masenim analizatorom u cilju ispitivanja puteva fragmentacije i potvrde hemijske strukture. Predlaganje strukture nepoznatih degradacionih proizvoda ziprasidona na osnovu predloženih fragmentacionih puteva.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. OPREMA, HEMI-KALIJE I RAČUNARSKI PROGRAMI

3.1.1. Oprema

- Tečni hromatograf *Hewlett Packard HP 1100 (Agilent Technologies, Nemačka)*: binarna pumpa, degaser, termostatirani autosampler, termostatski blok za kolonu, UV-detektor (DAD), integracija - Agilent ChemStation Software Rev. A.10.01. (grafička obrada)
- Tečni hromatograf *Thermo Scientific Accela 600 (Thermo Scientific, USA)*: kvatenerna pumpa (1000 bara), autosampler, termostatski blok za kolonu, UV-detektor (PDA, 20 Hz), MS detektor: tripl kvadrupolski maseni analizator - Thermo TSQ Quantum Access MAX, optimizacija radnih uslova instrumenata primenom automatskih optimizacionih procedura TSQ EZ Tune version 2.3.0.1206 SP1 Software-a, integracija - Xcalibur 2.1.0.1139 Software
- Tečni hromatograf *Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific Nemačka)*: kvatenerna pumpa (620 bara), autosampler, termostatski blok za kolonu, UV-detektor (DAD, 100 Hz), integracija - Chromeleon (c) Dionex Software Version 7.1.1.1127
- RP- HPLC stacionarne faze korišćene u ispitivanju:
 1. Zorbax SB C8, 250 mm × 4.6 mm id, 5.0 μm (Agilent technologies)
 2. Discovery HSC18, 250 mm × 4.6 mm id, 5.0 μm (Supelco)
 3. Zorbax XDB C18, 250 mm × 4.6 mm id, 5.0 μm (Agilent technologies)
 4. Zorbax SB C18, 250 mm × 4.6 mm id, 5.0 μm (Agilent technologies)
 5. Zorbax Extend C18, 250 mm × 4.6 mm id, 5.0 μm (Agilent technologies)
 6. Xterra RPC18, 250 mm × 4.6 mm id, 5.0 μm (Waters)
 7. Chromolith RP-18e 100-4.6, 100 mm × 4.6 mm id. (Merck)
 8. PurospherStar RP18, 250 mm × 4.6 mm id, 5.0 μm (Merck)
 9. Spherisorb ODS 1, 250 mm × 4.6 mm id, 5.0 μm (Waters)
 10. BDS Hypersil C18, 100 mm × 4.6 mm id, 3.0 μm (Thermo)
 11. Supelcosil LC 8DB, 150 mm × 4.6 mm id, 5.0 μm (Supelco)
 12. Zorbax XDB C8, 150 mm × 4.6 mm id, 5.0 μm (Agilent technologies)
 13. Spherisorb ODS2, 250 mm × 4.6 mm id, 5.0 μm (Waters)
 14. Zorbax SB Phenyl, 150 mm × 4.6 mm id, 5.0 μm (Agilent technologies)

15. Luna C18 (2), 250 x 4,6 mm, 5 µm (Phenomenex)
 16. Bonus RP, 150 mm × 4.6 mm id, 5.0 µm (Agilent technologies)
 17. Zorbax SB CN, 150 mm × 4.6 mm id, 5.0 µm (Agilent technologies)
 18. Nucleosil 100-5 C18, 250 mm × 4.6 mm id, 5.0 µm (Machery Nagel)
 19. ODS Hypersil, 150 mm × 4.6 mm id, 5.0 µm (Thermo)
 20. Symmetry Shield RP18, 150 mm × 4.6 mm id, 5.0 µm (Waters)
- RP- UPLC stacionarne faze korišćene u ispitivanju:
 1. Pinnacle® DB C18 50x2,1 mm, 1,9µm, (Restek)
 2. Acquity UPLC BEH 50x2,1 mm, 1,7µm, (Waters)
 3. Acquity UPLC BEH Phenyl 50x2,1 mm, 1,7µm, (Waters)
 4. Hypersil Gold 50x2,1 mm, 1,9µm, (Thermo)
 - Ostala oprema:
 - Elektronska analitička vaga: Mettler, tip XP-205 TDR KL (I) (*Mettler-Toledo AG, Švajcarska*)
 - pH-metar sa kombinovanom staklenom elektrodom: Metrohm tip 780 (*Metrohm, Švajcarska*)
 - Sistem za prečišćavanje vode: EasyPure RF (*Barnstead, SAD*)
 - Ultrazvučno kupatilo: tip USK (*EI Niš, Srbija*)
 - Sistem za filtriranje mobilne faze: Millipore Nylon Membrane, 0,45 µm (*Millipore, Irska*)
 - Sistem za filtriranje uzoraka: Millitex Suringe Driven Filter Unit, Nylon Membrane, 0,45 µm (*Millipore, SAD*)
 - Centrifuga (*Sigma 2-16, Velika Britanija*)
 - Mikrolitarski špric: 100-1000 µL, SG Australija

3.1.2. Hemikalije

- **Standardi ispitivanih supstanci:**
 - ziprasidon-mezilat, trihidrat, nečistoća I, nečistoća II, nečistoća III, nečistoća IV, nečistoća V (*Pfizer Inc., SAD*). Strukture i nazivi supstanci su prikazani u uvodu u delu 1.1.5.
- **Uzorci:**

- *Zeldox[®] kapsule*, proizvođača *Pfizer, Nemačka*; sadrže ziprasidon-hidrohlorid, monohidrat, a deklarirana količina u odnosu na ziprasidon je 40 mg po kapsuli;
- *Zeldox[®] prašak za rastvor za injekcije*, proizvođača *Pfizer, Francuska*; sadrže ziprasidon-mezipat, trihidrat, a deklarirana količina u odnosu na ziprasidon je 20 mg po bočici tj. 20mg/mL kada se rekonstituiše rastvor;

- **Sastav placeba:**

- Laktoza monohidrat, preželatinizirani kukuruzni škrob, magnezijum-stearat (*European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM), Strasbourg, Francuska*)

- **Rastvarači i reagensi:**

Za pripremu svih ispitivanih rastvora i mobilnih faza korišćena je voda HPLC-grade.

- **Za mobilnu fazu u RP-HPLC sistemu:**

- Acetonitril – HPLC grade (*Merck, Nemačka*)
- Kalijum-dihidrogenfosfat (*J.T. Baker B.V., Holandija*)
- Ortofosforna kiselina (85 %), (*Merck, Nemačka*)
- Trietilamin (TEA), (*Merck, Nemačka*)

- **Za mobilnu fazu u UPLC-MS-MS i UPLC-DAD sistemu:**

- Amonijum-formijat (*Chromasolv[®] for HPLC ≥99.0%*), (*Fluka Analytical, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Nemačka*)
- Mravlja kiselina (za LC-MS), (*J.T. Baker B.V., Holandija*)
- Acetonitril (LC-MS Chromasol^{v®} ≥ 99.9%), (*Fluka Analytical, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Nemačka*)

- **Za pripremu rastvora standardnih supstanci i uzoraka kod oba sistema:**

- Metanol – HPLC gradient grade (*Merck, Nemačka*)
- Dimetilsulfoksid (*J.T. Baker B.V., Holandija*)
- Koncentrovana hlorovodonična kiselina (*Merck, Nemačka*)

3.1.3. Računarski programi

- SIMCA P+ program, Version 12.0, Umetrics AB, Umea, Švedska 2008.
www.umetrics.com
- Peltarion Synapse 1.3.5. program, Peltarion HB, Stockholm, Švedska,
www.peltarion.com

- MATLAB ver 6.5 program, MathWorks, MA 01760-2098 USA, Juli **2002**.
- MarvinSketch 5.5.1.0 program, ChemAxon, Budimpešta, Mađarska, Juli **2011**, www.chemaxon.com/products.html.
- CS Chem3D Ultra 7.0 (Property Picker ActiveX Control), Cambridge Soft Corporation, 100 Cambridge Park Dr. Cambridge, MA 02140-2317 U.S.A., **2001**. <http://www.cambridgesoft.com/>.
- Gaussian 98 (Revision A.7), M. J. Frisch et al., Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, **1998**.
- Molecular Orbital PACkage/Parametric Method Vs.3 (MOPAC/PM₃)
- Excel 2003 u okviru paketa Microsoft Office 2003, *Microsoft*, SAD

3.2. PRIPREMA RASTVORA ZA OPTIMIZACIJU RP-HPLC METODE

Priprema svih rastvora vršena je u odmernim sudovima od tamnog stakla jer je ziprasidon fotosenzitivan.

3.2.1. Priprema rastvora ispitivanih supstanci

Osnovni rastvori nečistoća I, II, III, IV i V (0,5 mg mL⁻¹): u pet odmernih sudova od 10 mL prenese se po 5 mg standarda ispitivane nečistoće i rastvori na ultrazvučnom kupatilu u 7 mL metanola (nečistoće I, II, IV), odnosno dimetilsulfoksida (nečistoće III i V). Odmerni sudovi se dopune odgovarajućim rastvaračem do crte.

Osnovni rastvor ziprasidona (2 mg mL⁻¹): u odmerni sud od 10 mL prenese se količina standardne supstance ziprasidon-mezilat, trihidrata koja odgovara 20 mg ziprasidona i rastvori na ultrazvučnom kupatilu u 7 mL metanola. Odmerni sud se dopuni metanolom do crte.

Korastvarač (metanol:voda:conc HCl (20:5:0,01, v/v/v)): pomeša se 800 mL metanola i 200 mL vode sa 0,4 mL koncentrovane hlorovodonične kiseline.

Rastvori R-1 nečistoća I, II, III, IV i V (0,05 mg mL⁻¹): u pet odmernih sudova od 10 mL prenese se po 1 mL osnovnog rastvora odgovarajuće nečistoće i svaki odmerni sud se dopuni korastvaračem do crte.

Rastvor smeše za optimizaciju metode (R_{sm}): u odmerni sud od 10 mL prenesu se odgovarajuće zapremine rastvora *R-I nečistoća* (po 0,4 mL za nečistoće I, III-V, odnosno 0,6 mL za nečistoću II) i 5,0 mL osnovnog rastvora ziprasidona, tako da koncentracije u rastvoru budu: $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ za nečistoće I i III-V; $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ za nečistoću II i 1 mg mL^{-1} za ziprasidon. Odmerni sud se dopuni korastvaračem do crte. Za ispitivanje retencije ziprasidona i njegovih nečistoća u hromatografskom sistemu rastvor R_{sm} je injektovan pod različitim hromatografskim uslovima prema planu eksperimenta u eksperimentalnom dizajnu.

Priprema rastvora doziranih oblika

Rastvori za ispitivanje sadržaja nečistoća:

Rastvor uzorka kapsula: odmeri se sadržaj 20 kapsula i izračuna prosečna masa sadržaja kapsula (deklarisana prosečna masa sadržaja kapsula je oko 150 mg). U odmerni sud od 20 mL prenese se oko 75mg homogenizovane mase sadržaja kapsula koja odgovara 20 mg ziprasidona, i doda oko 12 mL korastvarača. Rastvor se tretira na ultrazvučnom kupatilu 15 minuta, nakon čega se odmerni sud dopuni korastvaračem do crte. Rastvor se centrifugira 10 min na 4000 obrtaja/min. Očekivana koncentracija ziprasidona je 1 mg mL^{-1} .

Rastvor uzorka praška za rastvor za injekcije: sadržaj bočice se rastvori u 1,4 mL vode za injekcije, kvantitativno prenese u odmerni sud od 20 mL i dopuni korastvaračem do crte. Očekivana koncentracija ziprasidona je 1 mg mL^{-1} .

Rastvori za ispitivanje sadržaja ziprasidona: u dva odmerni suda od 20 mL prenese se 2 mL rastvora uzorka kapsula, odnosno rastvora uzorka za prašak za rastvor za injekcije i dopuni korastvaračem do crte. Očekivana koncentracija ziprasidona u oba razblažena rastvora je $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

3.2.2. Priprema mobilnih faza

Rastvori mobilne faze za optimizaciju metode: 25 mM, 50 mM i 75 mM vodeni rastvori kalijum-dihidrogenfosfata se pripremaju rastvaranjem 3,402 g; 6,8045 g i 10,207 g KH_2PO_4 u 1 litru vode. U vodeni rastvor KH_2PO_4 dodaje se TEA prema planu eksperimenata u sledećim zapreminama: 5mL (0,5%), 10mL (1%) i 15mL (1,5%). pH

vrednost rastvora fosfatnog pufera sa 1% TEA se podesi na 2,3; 2,5 i 2,7 sa ortofosforom kiselinom. Svi rastvori mobilnih faza se pripremaju neposredno pre upotrebe i filtriraju kroz membranski filter (0,45 μm).

3.3. PRIPREMA RASTVORA ZA VALIDACIJU RP-HPLC METODE

Svi osnovni rastvori (v. poglavlje 3.2.1.) su razblaživani korastvaračem neposredno pre upotrebe do koncentracionih nivoa zahtevanih u postupku validacije metode. Ispitana je stabilnost osnovnih rastvora i svi su čuvani u frižideru 7 dana na temperaturi od 2 – 8 °C, osim osnovnog rastvora nečistoće III koji je čuvan 1 dan.

3.3.1. Priprema rastvora za ispitivanje selektivnosti metode

Za procenu *selektivnosti* predložene RP-HPLC metode korišćen je *rastvor placebo*, R_{sm} rastvor i *rastvori uzorka kapsula i praška za rastvor za injekcije*. (priprema v. poglavlje 3.2.1.)

Rastvor placebo: u odmerni sud od 20 mL prenese se 52,4 mg placebo (smeša pomoćnih supstanci u odnosu koji odgovara deklarisanom sastavu u doziranom obliku) i doda oko 12 mL korastvarača. Rastvor se tretira na ultrazvučnom kupatilu 15 minuta, nakon čega se odmerni sud dopuni korastvaračem do crte. Rastvor se centrifugira 10 min na 4000 obrtaja/min.

3.3.2. Priprema rastvora za ispitivanje linearnosti metode

Rastvori nečistoća I, II, III, IV, V za ispitivanje linearnosti: u šest odmernih sudova od 10 mL prenesu se odgovarajuće zapremine (0,10; 0,20; 0,40; 0,60; 0,80 i 1,2 mL) *rastvora R-1 nečistoća I-V*. Odmerni sudovi se dopune korastvaračem do crte, tako da koncentracija svake nečistoće bude u opsegu od 0,50 do 6,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Rastvori ziprasidona za ispitivanje linearnosti: u sedam odmernih sudova od 20 mL prenesu se odgovarajuće zapremine *osnovnog rastvora ziprasidona* (0,70; 0,80; 0,90; 1,0; 1,1; 1,2; 1,3 mL); odmerni sudovi se dopune korastvaračem do crte tako da koncentracija ziprasidona bude od 70 do 130 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

3.3.3. Priprema rastvora za ispitivanje limita detekcije i limita kvantifikacije

Rastvori nečistoća za ispitivanje LOD i LOQ : rastvori R-1 nečistoća I-V se razblaže korastvaračem u odnosu 1:100 tako da se dobiju rastvori nečistoća koncentracije $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. U šest odmernih sudova od 10 mL prenesu se odgovarajuće zapremine (0,20; 0,5; 1,0; 1,6; 2,0; i 5 mL) razblaženih rastvora ($c = 0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) nečistoća I-V. Odmerni sudovi se dopune korastvaračem do crte tako da koncentracija svake nečistoće bude od 0,01 do $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$.

3.3.4. Priprema rastvora za ispitivanje tačnosti metode

Rastvori za ispitivanje tačnosti pripremaju se metodom standardnog dodatka i za svaku ispitivanu koncentraciju pravi se po tri rastvora.

Rastvori nečistoća I, II, III, IV, V za ispitivanje tačnosti: u devet odmernih sudova od 20 mL prenese se masa sadržaja kapsule (oko 75 mg) koja sadrži oko 20 mg ziprasidona. Na prenetu masu sadržaja kapsule doda se odgovarajuća zapremina rastvora R-1 svake nečistoće (po 0,96 mL; 1,2 mL i 1,44 mL za nečistoću II i po 0,64 mL; 0,80 mL i 0,96 mL za nečistoće I, III-V). U odmerne sudove se doda oko 12 mL korastvarača i rastvor se tretira na ultrazvučnom kupatilu 15 minuta, nakon čega se odmerni sudovi dopune korastvaračem do crte tako da koncentracije nečistoća budu: $2,4$; $3,0$ i $3,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ za nečistoću II i $1,6$; $2,0$ i $2,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ za nečistoće I i III-V. Rastvor se centrifugira 10 min na 4000 obrtaja/min.

Rastvori ziprasidona za ispitivanje tačnosti: u devet odmernih sudova od 20 mL prenese se masa sadržaja kapsule (oko 75 mg) koja sadrži oko 20 mg ziprasidona. Na prenetu masu sadržaja kapsule doda se odgovarajuća zapremina osnovnog rastvora ziprasidona (8 mL; 10 mL i 12 mL) i rastvor se tretira na ultrazvučnom kupatilu 15 minuta, nakon čega se odmerni sud dopuni korastvaračem do crte. Rastvor se centrifugira 10 min na 4000 obrtaja/min. U devet odmernih sudova naprave se razblaženja rastvora korastvaračem u odnosu 1:10, tako da koncentracije za ziprasidon budu 80 ; 100 i $120 \mu\text{g mL}^{-1}$.

3.3.5. Priprema rastvora za ispitivanje preciznosti metode

Rastvori nečistoća za ispitivanje preciznosti: preciznost metode je procenjena određivanjem nečistoća I-V iz standardnih rastvora koji su sadržali sledeće koncentracije: $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ nečistoće I i III-V, tj. $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ nečistoće II, odnosno 0,2% i 0,3% u odnosu na ziprasidon (1 mg mL^{-1}). Pripremljeno je po šest ovakvih rastvora na način koji je opisan u poglavlju 3.2.1. za rastvor R_{sm} .

Rastvori ziprasidona za ispitivanje preciznosti ($c = 100 \mu\text{g/mL}$): u odmerne sudove od 20 mL prenese se po 1 mL osnovnog rastvora ziprasidona (v. poglavlje 3.2.1.) i oni se dopune korastvaračem do crte. Pripremljeno je šest ovakvih rastvora.

3.3.6. Priprema mobilnih faza za ispitivanje robusnosti

Priprema mobilnih faza za ispitivanje robusnosti opisana je u poglavlju 3.2.2.

3.3.7. Hromatografski uslovi

Hromatografsko razdvajanje je postignuto na stacionarnoj fazi Waters Spherisorb[®] ODS 1, (250 x 4,6 mm, 5 μm) gradijentnim eluiranjem (t (min) / % B: 0 min/10%, 6 min /25%, 10 min /25%, 20 min /100%, 20.1 min /10%, 30 min /10%) na temperaturi od 25 °C i pri protoku od $1,5 \text{ mL min}^{-1}$. Mobilnu fazu čine mobilna faza A (pufer–acetonitril (80+20, v/v)) i B (pufer–acetonitril (10+90, v/v)). Komponente pufera su 50 mM rastvor KH_2PO_4 sa 10 mL L^{-1} TEA (1% TEA), čija je pH vrednost 2,5 podešena ortofosforom kiselinom. Talasna dužina detekcije je 250 nm (DAD). Volumen injektovanja je 40 μL (za ispitivanje sadržaja nečistoća) odnosno 10 μL (za određivanje sadržaja ziprasidona).

3.4. PRIPREMA RASTVORA ZA OPTIMIZACIJU RP-UPLC METODE

3.4.1. Priprema rastvora ispitivanih supstanci

Rastvori RL nečistoća I-V ($c = 0,005 \text{ mg mL}^{-1}$): u pet odmernih sudova od 50 mL prenese se po 5 mL rastvora R-1 odgovarajuće nečistoće tako da koncentracija za svaku nečistoću bude $0,005 \text{ mg mL}^{-1}$. Odmerni sudovi se dopune korastvaračem do crte. Priprema rastvora R-1 nečistoća i korastvarača je opisana u poglavlju 3.2.1.

Osnovni rastvor ziprasidona ($c = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$): u odmerni sud od 10 mL prenese se količina standardne supstance ziprasidon-mezilat, trihidrata (oko 6,8027 mg) koja odgovara 5 mg ziprasidona i rastvori na ultrazvučnom kupatilu u 7 mL metanola. Odmerni sud se dopuni metanolom do crte.

Rastvor smeše za optimizaciju metode (M_{sm}): u odmerni sud od 10 mL prenesu se odgovarajuće zapremine *rastvora RL nečistoća* (po 0,6 mL za nečistoće I, III-V i 0,9 mL za nečistoću II) i 3,0 mL *osnovnog rastvora ziprasidona*, tako da koncentracije u rastvoru budu: $0,3 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ za nečistoće I i III-V; $0,45 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ za nečistoću II i $150 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ za ziprasidon. Odmerni sud se dopuni korastvaračem do crte. Rastvor M_{sm} je injektovan nakon 24h čuvanja na sobnoj temperaturi pod različitim hromatografskim uslovima prema planu eksperimenta u eksperimentalnom dizajnu.

Priprema rastvora doziranih oblika

Rastvori za ispitivanje sadržaja nečistoća:

Rastvor uzorka kapsula: u odmerni sud od 20 mL prenese se količina sadržaja kapsula koja odgovara 24 mg ziprasidona, doda oko 12 mL korastvarača i tretira se na ultrazvučnom kupatilu 15 minuta. Odmerni sud se dopuni korastvaračem do crte i rastvor se centrifugira 10 min na 4000 obrtaja/min. U odmerni sud od 10 mL prenese se 1,25 mL supernatanta i sud dopuni korastvaračem do crte. Očekivana koncentracija ziprasidona je $150 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.

Rastvor uzorka praška za rastvor za injekcije: sadržaj bočice se rastvori u 1,4 mL vode za injekcije, kvantitativno prenese u odmerni sud od 5 mL i dopuni korastvaračem do crte. U odmerni sud od 100 mL prenese se 3,75 mL ovog rastvora tako da krajnja koncentracija ziprasidona bude $150 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Odmerni sud se dopuni do crte korastvaračem.

Rastvori za ispitivanje sadržaja ziprasidona: pripreme se razblaživanjem *rastvora uzorka kapsula*, odnosno *rastvora uzorka praška za rastvor za injekcije* u odnosu 1:100 korastvaračem. Očekivana koncentracija ziprasidona u oba rastvora je $1,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.

3.4.2. Priprema mobilnih faza

Mobilne faze korišćene pri optimizaciji metode pripremane su prema planu eksperimenata u eksperimentalnom dizajnu. 10 mM vodeni rastvori amonijum-formijata su pripremljeni rastvaranjem 630 mg amonijum - formijata u 1 litru vode. pH vrednost rastvora pufera je podešena na 4,5; 4,6; 4,7; 4,8 i 4,9 sa mravljom kiselinom. Pripremljene mobilne faze su pre upotrebe profiltrirane kroz membranski filter (0,45 μm).

3.5. PRIPREMA RASTVORA ZA VALIDACIJU RP-UPLC METODE

Svi rastvori pripremani su razblaživanjem rastvora opisanih u poglavlju 3.4.1. do koncentracionih nivoa zahtevanih u postupku validacije metode.

3.5.1. Priprema rastvora za ispitivanje selektivnosti metode

Za procenu *selektivnosti* predložene RP-UPLC metode korišćen je *rastvor placebo*, M_{sm} rastvor i *rastvor uzorka kapsula i praška za rastvor za injekcije* (priprema v. poglavlje 3.4.1.)

Rastvor placebo: u odmerni sud od 20 mL prenese se 62,8 mg placebo i doda oko 12 mL korastvarača. Rastvor se tretira na ultrazvučnom kupatilu 15 minuta, nakon čega se odmerni sud dopuni korastvaračem do crte. Rastvor se centrifugira 10 min na 4000 obrtaja/min. U odmerni sud od 10 mL prenese se 1,25 mL supernatanta i sud dopuni korastvaračem do crte.

3.5.2. Priprema rastvora za ispitivanje linearnosti metode

Rastvori nečistoća I-V za ispitivanje linearnosti: u šest odmernih sudova od 10 mL prenesu se odgovarajuće zapremine (0,20; 0,30; 0,45; 0,60; 0,90; 1,2 i 1,8 mL) *rastvora RL*; odmerni sudovi se dopune korastvaračem do crte, tako da koncentracija svake nečistoće bude u opsegu od 0,10 do 0,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Rastvori za ispitivanje linearnosti ziprasidona: u odmerni sud od 50 mL prenese se 1,5 mL *osnovnog rastvora ziprasidona* (v. poglavlje 3.4.1.) i dopuni korastvaračem do crte, tako da je koncentracija ziprasidona 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$. U sedam odmernih sudova od 10 mL

prenesu se odgovarajuće zapremine ovog rastvora (0,70; 0,80; 0,90; 1,0; 1,1; 1,2; 1,3 mL); odmerni sudovi se dopune korastvaračem do crte tako da koncentracija ziprasidona bude od 1,05 do 1,95 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

3.5.3. Priprema rastvora za ispitivanje limita detekcije i limita kvantifikacije

Za određivanje LOQ i LOD nečistoća I-V pripremljeni su rastvori opadajućih koncentracija za svaku nečistoću od 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do 0,00007 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i analizirani.

3.5.4. Priprema rastvora za ispitivanje tačnosti metode

Za svaki ispitivani koncentracijski nivo pravi se po tri rastvora.

Rastvori nečistoća I-V za ispitivanje tačnosti: u tri odmerna suda od 20 mL prenesu se odgovarajuće zapremine rastvora RL nečistoća (po 0,60; 1,2 i 2,4 mL za nečistoće I i III-V i po 0,9; 1,8 i 3,6 mL za nečistoću II). U svaki odmerni sud prenese se po 7,85 mg placeba i 12 mL korastvarača. Sudovi se tretiraju na ultrasoničnom kupatilu 15 minuta i dopune do oznake korastvaračem tako da koncentracije budu 0,15; 0,3 i 0,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za nečistoće I, III-V i 0,225; 0,45 i 0,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za nečistoću II. Rastvori se centrifugiraju 10 min na 4000 obrtaja/min.

Rastvori ziprasidona za ispitivanje tačnosti: u odmerne sudove od 10 mL prenese se po 0,8 mL; 1 mL i 1,2 mL rastvora ziprasidona koncentracije 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (priprema v. poglavlje 3.5.2.) i svaki se dopuni korastvaračem do crte. Koncentracija ziprasidona je 1,2; 1,5 i 1,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

3.5.5. Priprema rastvora za ispitivanje preciznosti metode

Rastvori nečistoća za ispitivanje preciznosti: pripremani su postupkom koji je opisan za rastvor M_{sm} u poglavlju 3.4.1. Koncentracija nečistoća je 0,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za nečistoće I i III-V, tj. 0,45 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za nečistoću II, odnosno 0,2% i 0,3% u odnosu na ziprasidon (150 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Pripremljeno je po šest ovakvih rastvora.

Rastvori ziprasidona za ispitivanje preciznosti ($c = 1,5 \mu\text{g/mL}$): pripremaju se razblaživanjem rastvora ziprasidona koncentracije 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (priprema v. poglavlje 3.5.2.) u odnosu 1:10 (v/v) korastvaračem. Pripremljeno je po šest ovakvih rastvora.

3.5.6. Priprema mobilnih faza za ispitivanje robusnosti

Priprema mobilnih faza za ispitivanje robusnosti opisana je u poglavlju 3.4.2.

3.5.7. Hromatografski uslovi

Hromatografska analiza u *UPLC-MS-MS sistemu* je izvedena na stacionarnoj fazi Acquity UPLC BEH 50 x 2,1 mm, 1,7 μ m (Waters) gradijentnim eluiranjem (t (min) / % B: 0 min/40%, 1 min /40%, 4 min /60%, 5,6 min /60%, 5,8 min /40%, 7 min /40%) na temperaturi od 30 °C i pri protoku od 0,3 mL min⁻¹. Mobilnu fazu čine mobilna faza A (rastvor 10 mM amonijum-formijata, pH=4,7 podešena mravljom kiselinom) i B (acetonitril). Talasna dužina detekcije je 250 nm (PDA). Zapremina injektovanja ispitivanih rastvora je 10 μ L.

Hromatografski uslovi u *UPLC-DAD sistemu* su slični sa malim modifikacijama gradijenta (t (min) / % B: 0 min/22%, 0,5 min /22%, 1 min /30%, 3 min /30%, 5,5 min /70%, 7 min /70%, 7,2 min /22%, 8min/22%).

Za identifikaciju i određivanje sadržaja ispitivanih supstanci i identifikaciju nepoznatog degradacionog proizvoda korišćen je tripl kvadrupolski maseni detektor pri sledećim uslovima, koji su prethodno optimizovani:

<i>Jonski izvor:</i>	HESI+ / HESI- (nečistoća IV)
<i>Napon spreja:</i>	4000 / 4000 V
<i>Temperatura uparivača:</i>	400°C / 400°C
<i>Pritisak gasa (N₂) za raspršivanje kroz kapilaru:</i>	
1) <i>pri direktnom protoku (sheat)</i>	60 bar / 60 bar
2) <i>pri kružnom protoku (aux)</i>	55 bar / 55 bar
<i>Napon na kapilari (Capillary offset):</i>	
	35 V / -35V
<i>Potencijal jonske optike (Tube Lens Offset):</i>	
	162V / -148V
<i>Temperatura kapilare:</i>	300°C / 300°C
<i>Maseni analizator:</i>	Tripl kvadrupolski maseni analizator
<i>Volumen injektovanja:</i>	10 μ L

Optimizacija uslova masenog spektrometra za svaku ispitivanu supstancu je vršena standardnim rastvorima supstanci u odgovarajućim koncentracijama (ziprasidon - 1 mg mL⁻¹; nečistoće I, III, V - 2 µg mL⁻¹; nečistoća II - 3 µg mL⁻¹; nečistoća IV - 0,5 mg mL⁻¹) direktnim injektovanjem u maseni spektrometar pomoću integrisane pumpe šprica čiji je protok bio 10 µL/min. U MS eksperimentima korišćena je metoda praćenja odabrane reakcije (eng. *Selected Reaction Monitoring*, SRM). Vrednosti pojedinih kolizionih energija (E_{coll}) i potencijali jonske optike (Tube Lens, TL) za ispitivana jedinjenja su podešavane na osnovu odabranih tranzicija tj. jonskih prelaza kako bi se postigla što bolja osetljivost detektora. Svaki produkt jon je kvantifikovan u toku vremena snimanja od 100 ms po kanalu sa jedinstvenom rezolucijom masa za Q1 i Q3. Odabrani jonski prelazi, kolizionne energije i potencijali jonske optike su:

	SRM	E_{coll} i TL
	Q1	Q3
Ziprasidon:	412,894→193,860; 28V i 162 V	
Nečistoća I:	219,605→176,960; 20V i 162 V	
Nečistoća II:	427,875→177,000; 29V i 162 V	
Nečistoća III:	840,918→412,980; 19V i 128 V	
Nečistoća IV:	227,794→191,970; 16V i 68 V	
Nečistoća V:	545,889→326,790; 31V i 162 V	

Kao kolizionni gas korišćen je argon, a kao gas za raspršivanje i uparavanje azot. Pritisak kolizionog gasa argona u kolizionoj ćeliji (*Collision cell pressure*) je bio 1,5 mTorr.

3.6. METODE EKSPERIMENTALNOG DIZAJNA KORIŠĆENE U ISPITIVANJU RP-HPLC HROMATOGRAFSKOG PONAŠANJA ZIPRASIDONA I NJEGOVIH NEČISTOĆA

Nakon preliminarnih ispitivanja, u optimizaciji hromatografskih uslova su korišćene različite metode eksperimentalnog dizajna s obzirom na složenost i osetljivost analiza. Nova RP-HPLC metoda je razvijena primenom PLS, ANN-MLP, PCA i AHC analiza. Optimizacija je vršena u dve faze kroz optimizaciju mobilne faze i ispitivanje selektivnosti RP stacionarnih faza.

3.6.1. Optimizacija mobilne faze

Eksperimentalni uslovi (varijable) sa najvećim uticajem na razdvajanje analita su odabrani primenom linearnog PLS i nelinearnog ANN-MLP modela, a na osnovu trodimenzionalnih grafika površine odgovora odabrani su optimalni eksperimentalni uslovi.

PLSR. Formiranje modela primenom linearne regresione analize metodom parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS) je izvršeno u SIMCA P+ 12.0 programu [166]. Kako se opsezi ispitivanih faktora razlikuju nekoliko puta, pre formiranja PLS modela podaci su obrađeni metodom skaliranja do jedinične varijanse (engl. *unit variance (UV) scaling*) jer se *a priori* pretpostavilo da je uticaj svake varijable na model isti. Postupak je opisan u poglavlju 3.6.2.

U toku PLS analize najznačajnije varijable su birane na osnovu VIP parametra. Kvalitet PLS modela procenjivan je na osnovu parametara kvadratnog koeficijenta korelacije R^2 , validacionog regresionog faktora $Q^2(Y)$ i srednje kvadratne greške procene (RMSEE).

ANN-MLP. Višeslojni perceptron (MLP) koji predstavlja najčešće korišćenu višeslojnu nerekurentnu mrežu (*Multilayer Feedforward Networks*) uz *backpropagation* (BP) algoritam je korišćen za formiranje nelinearnih modela u Peltarion Synapse 1.3.5. programu [167].

Validacija modela. S obzirom na mali skup ulaznih podataka, nije bilo mogućnosti za podelu podataka na trening, validacioni i verifikacioni set, pa je testiranje i verifikacija performansi oba modela vršena unutrašnjom ukrštenom validacijom (CV) i to njenim najjednostavnijim oblikom, pristupom „izostavi jednu vrednost“ (LOO-CV). Ponavljajući ovaj proces za svaku vrednost u setu podataka dobija se *cross validirana* R^2 vrednost koja se obeležava kao Q^2 . Za procenu kvaliteta formiranih jednačina i odabir statistički najznačajnijih modela korišćeni su sledeći statistički parametri: r^2 (kvadrat koeficijenta korelacije dobijene u odnosu na predviđenu vrednost), srednja kvadratna greška predviđanja (RMSEP) i validacioni regresioni faktor Q^2 .

3.6.2. Ispitivanje selektivnosti RP stacionarnih faza

Ispitivanje selektivnosti RP stacionarnih faza sličnih karakteristika pri odabranim eksperimentalnim uslovima u odnosu na ziprasidon i njegove nečistoće,

vršeno je primenom analiza glavne komponente (PCA) i analiza aglomerativnog hijerarhijskog grupisanja (AHC).

Pre PCA i AHC analize potrebno je bilo prethodno obraditi (transformisati) podatke jer se smatra da *a priori* sve varijable, odnosno varijanse u varijablama podjednako utiču na model. Opsezi varijabli, npr. hromatografskih parametara se veoma razlikuju pa bi oni sa većim opsezima više uticali na model usled veće varijanse koju pokazuju, i obrnuto. Ako su varijable sa velikim broječanim vrednostima mogu se predstaviti kao odgovarajući logaritmi, što nije bilo u ovom slučaju. Odabrane su dve najčešće korišćene metode za transformisanje podataka - skaliranje do jedinične varijanse (engl. *unit variance (UV) scaling*) i srednje centriranje (*mean-centering*) podataka. Kod UV skaliranja za svaku varijablu (kolonu matrice) je izračunata standardna devijacija (s_j) i vrednost svake varijable je pomnožena inverznom funkcijom standardne devijacije ($1/s_j$). Svaka skalirana varijabla ima istu (uniformnu, *unit*) varijansu. Na ovaj način su ujednačene varijanse svih varijabli. Srednje centriranje je bio drugi deo standardne procedure za obradu podataka pre modelovanja. Izračunata je srednja vrednost svake varijable (u svakoj koloni) i oduzeta od vrednosti podataka. Obe ove metode se standardno primenjuju u SIMCA P+ 12.0 programu [166]. Drugi naziv za ovu kombinovanu metodu skaliranja je auto-skaliranje („*auto-scaling*“) [98]. Podaci su standardizovani prema jednačinama:

$$x_{ij} = \frac{(x_{ij} - \bar{x}_j)}{s_j} \quad (18)$$

gde $\bar{x}_j, s_j$ označavaju srednju vrednost hromatografskog parametra j na svim kolonama, i njegovu standardnu devijaciju:

$$\bar{x}_j = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m x_{ij} \quad (19)$$

$$s_j = \sqrt{\frac{1}{m} \sum_{i=1}^m (x_{ij} - \bar{x}_j)^2} \quad (20)$$

m označava broj analiziranih sistema.

PCA. Za analizu glavnih komponenti korišćen je matematički program Soft Independent Modeling of Class Analogy SIMCA P+ 12.0 program [166]. Rezultati

analize su predstavljeni 2D- grafikonom rezultata i PCA koeficijentna varijabli (engl. *score and loading plots*).

AHC. Za AHC analizu korišćen je program MATLAB ver. 6.5 [168]. Rezultati AHC analize su prikazani u vidu dendograma i tzv. obojenom mapom na osnovu *Ward*-ove metode povezivanja kao dendogrami 20 stacionarnih faza u funkcionalnom prostoru 22 hromatografska parametra, i hromatografskih parametara u funkcionalnom prostoru 20 stacionarnih faza.

3.7. METODE EKSPERIMENTALNOG DIZAJNA KORIŠĆENE U ISPITIVANJU RP-UPLC HROMATOGRAFSKOG PONAŠANJA ZIPRASIDONA I NJEGOVIH NEČISTOĆA

Preliminarna ispitivanja su pokazala da je bilo potrebno ispitati tri faktora na pet nivoa. Za optimizaciju UPLC metode nakon preliminarnih ispitivanja odabran je zvezdasti dizajn jer je trebalo detaljno ispitati uticaj tri faktora (pH, protok, temperatura) u veoma uzanom opsegu zbog velike osetljivosti sistema.

Zvezdasti dizajn zahteva najmanje tri nivoa ispitivanja ($-\alpha$, 0 , $+\alpha$), zato što moraju da postoje najmanje tri tačke da bi se uklopile u kvadratnu funkciju. Tačke gde je jedan faktor na nivou $+\alpha$ su aksijalne tačke. Svaka aksijalna tačka podrazumeva postavljanje jednog faktora na nivo $\pm \alpha$, a ostale faktore na 0 nivou. Kada je $\alpha \neq 1$, svaka promenljiva se ispituje na pet nivoa ($-\alpha$, -1 , 0 , $+1$, $+\alpha$) [96,169,170]. Vrednost α zavisi od broja promenljivih i može se izračunati kao $\alpha = 2^{N/4}$, gde je N broj promenljivih [91]. Za tri faktora, zvezdasti dizajn se sastoji od centralne tačke i od šest tačaka, za svaku stranicu kocke po jedna [93]. Eksperimenti su izvođeni randomizirano što je osnovni zahtev za dobijanje statistički nezavisnih odgovora i za tačno određivanje efekata i vršena su ponavljanja u centralnoj tački tri puta radi procene eksperimentalne greške [169]. Za svaku varijablu ispitivani nivoi bili su $-\alpha$, -1 , 0 , $+1$, $+\alpha$, gde je vrednost α za $N = 3$ broj promenljivih, trebalo da bude 1,68. S obzirom na uzak opseg ispitivanja ovo bi bila mala promena, pa je nivo ispitivanja lokalizovan na prvi ceo broj $\alpha = 2$. Za analizu podataka korišćene su PLS metoda i hromatografske funkcije.

PLS. Određivanje optimalnih hromatografskih uslova vršeno je pomoću PLS metode [98] korišćenjem matematičkog programa Soft Independent Modeling of Class Analogy SIMCA P+ 12.0 [166] i metodom površine odgovora [171].

Hromatografske funkcije odgovora – CRF (engl. *Chromatographic Response Function*) [128] i eksponencijalna hromatografska funkcija CEF (engl. *Chromatographic Exponential Function*) [127] su odabrane za optimizaciju hromatografskih UPLC uslova. Za odgovarajuće eksperimentalno dobijene ($\sum_{i=1}^L R_i$, L , T_L , T_1 za CRF; t_f , R_i , n za CEF) i zadate vrednosti (T_A , T_0 , w_1 , w_2 , w_3 za CRF; t_{max} , R_{opt} , a za CEF) izračunavanje funkcija CRF i CEF je izvršeno u Excelu prema jednačinama (4) i (5) prikazanim u poglavlju 1.2.5.

3.8. QSRR STUDIJA DERIVATA ZIPRASIDONA

3.8.1. Optimizacija konformacije ispitivanih jedinjenja

Hemijske strukture ispitivanih jedinjenja konstruisane su u ChemDrawUltra 7.0.0. programu [172]. Za sva ispitivana jedinjenja izračunate su pKa vrednosti i odabrani dominantni molekulski/katjonski oblici pri eksperimentalnim uslovima, pH 2,5 pomoću MarvinSketch programa [173]. Izračunata pKa vrednost ziprasidona (7,1) je bliska eksperimentalno dobijenoj pKa vrednosti (oko 6,7 [42]) što pokazuje da je odabran najverovatniji dominantni oblik za dalje ispitivanje. Određivanje najstabilnijih konformacija odabranih molekulskih/katjonskih oblika ispitivanih jedinjenja pri pH 2,5 izvršeno je primenom Parametric Method Vs.3 (PM3) metode u Molecular Orbital PACKageprogramu (MOPAC/PM₃) [174,175].

3.8.2. Izračunavanje molekulskih deskriptora

Za izračunavanje sternih, fizičko-hemijskih i elektronskih osobina optimizovanih konformacija molekulskih modela korišćeni su odgovarajući računarski programi: MarvinSketch 5.1.5.0 program [173] Chem3D Ultra 7.0.0 program [172], CS Gaussian 98 program [176] uz upotrebu B3LYP/3-21G teorije (B3LYP/3-21G) [177-179].

Molekulski deskriptori kao što su logaritam podeonog koeficijenta (logP), logaritam distribucionog koeficijenta oktanol-voda pri pH 1,5, 2,5 i 4,0 (logD_{1.5}, logD_{2.5}, logD_{4.0}), površina polarnog dela molekule (PSA, engl. *Polar Surface Area*), broj donora vodonične veze (HBD, engl. *Hydrogen Bond Donor*), broj akceptora vodonične veze (HBA, engl. *Hydrogen Bond Acceptor*) su za optimizovane molekulske modele izračunati korišćenjem MarvinSketch 5.1.5.0 programa. Za izračunavanje molarne

refraktivnosti (MR), površine dostupne rastvaraču (SAS, engl. *Connolly Accessible Area*), molekulske površine (MS, engl. *Connolly Molecular Area*) korišćen je Chem3D Ultra 7.0.0 program.

Izračunavanje sledećih molekulskih parametara optimizovanih konformacija u Gaussian 98 programu [176] je izvršeno korišćenjem B3LYP/6-31G hibridne funkcije: dipol, energija najviše popunjene molekulske orbitale (HOMO, engl. *Highest Occupied Molecular Orbital*), energija najniže nepopunjene molekulske orbitale (LUMO, engl. *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*), i kvantno-hemijskih deskriptora kao što su hemijski potencijal (μ), elektronegativnost (χ), *hardness* (η), *global softness* (S) i indeks elektrofilnosti (ω), koji se veoma često koriste u interpretaciji različitih aspekata hemijskog vezivanja i reakcionih mehanizama. Hemijski potencijal ukazuje na tendenciju elektrona da se odvoji, *hardness* se može opisati kao otpornost na transfer elektrona, *softness* je koristan za jednostavno predviđanje hemijske reaktivnosti [180-183]. Indeks elektrofilnosti (ω) je predložen kao mera smanjenja energije do koje dolazi usled maksimalnog prelaska elektrona između donora i akceptora ($\omega = \chi^2/2\eta$) [184].

3.8.3. Statističke metode korišćene za formiranje QSRR modela

Linearna regresiona metoda PLS je korišćena za odabir molekulskih deskriptora (X varijable) sa najvećim uticajem na retenciono ponašanje (t_R) i za formiranje QSRR modela. U toku PLS analize najznačajniji molekularni deskriptori su birani na osnovu VIP parametra koji su računati u SIMCA P+ 12.0 programu [166]. X varijable sa VIP vrednostima većim od 1 imaju najveći uticaj na formirani QSRR model, X varijable sa $1,0 > \text{VIP} > 0,5$ pokazuju umereni uticaj, dok X-varijable sa VIP vrednostima manjim od 0,5 nisu značajne za QSRR model [98]. Molekulski deskriptori sa najvišim VIP vrednostima su odabrani za dalje formiranje PLS-QSRR modela. Odabir najznačajnijih deskriptora za PLS-QSRR modele izvršen je na osnovu sledećih parametara: koeficijenta determinacije (R^2), validacionog regresionog faktora ($LOO-CV$, Q^2) i greške predviđanja RMSEP formiranih modela.

QSRR modelovanje je vršeno primenom linearnih (PLS) i nelinearnih statističkih metoda (MLP-ANN). Formiranje modela primenom PLS metode je izvršeno u SIMCA P+ 12.0 programu [166]. Za nelinearno QSRR modelovanje u Peltarion Synapse 1.3.5. programu [167] korišćen je višeslojni perceptron (MLP) višeslojne

nerekurentne mreže (*Multilayer Feedforward Networks*) uz BP algoritam. Molekulski deskriptori sa najvišim VIP vrednostima odabrani PLS metodom su korišćeni kao ulazi (*inputs*) kod MLP-ANN modela.

Ukrštena validacija i validacioni regresioni faktor (Q^2) su korišćeni kao kriterijumi za ispitivanje robusnosti, pouzdanosti i tačnosti predviđanja statističkih modela.

Formirani PLS-QSRR i ANN-QSRR modeli su analizirani i optimalan model je izabran poređenjem regresionih R^2 i validacionih parametara Q^2 , greškama predviđanja RMSEP i koeficijenta korelacije r predviđenih u odnosu na eksperimentalne vrednosti.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. RAZVOJ I OPTIMIZACIJA RP-HPLC METODE ZA ODREĐIVANJE ZIPRASIDONA I NJEGOVIH NEČISTOĆA

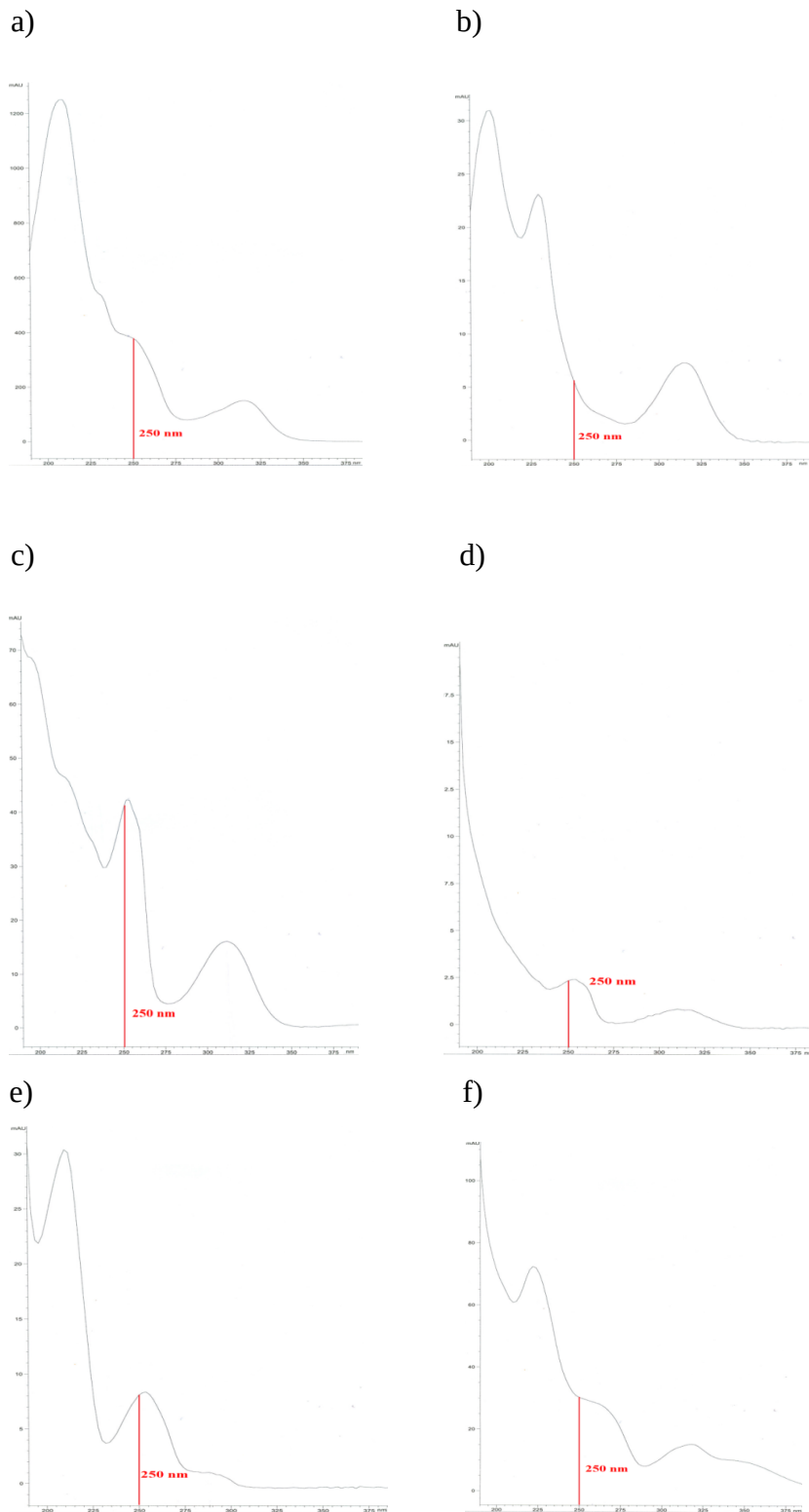
U dostupnoj literaturi nema puno podataka o određivanju ziprasidona i nečistoća [49,58]. Ziprasidon u prisustvu degradacionih proizvoda, nastalih pod dejstvom temperature i bazne sredine, je određivan HPLC metodom, ali bez odgovarajućih podataka o strukturi nečistoća [49]. U oficinalnim monografijama ziprasidona Evropske 8.1 [43] i Američke Farmakopeje 35 [44] određivanje sadržaja ziprasidona i nečistoća se ispituje u tri hromatografska sistema.

Zbog složenosti ispitivane smeše, razdvajanje i određivanje ziprasidona i nečistoća različite polarnosti u jednom sistemu otežava pronalaženje hromatografskih uslova za njihovu istovremenu analizu. Stoga je ispitivan uticaj promene eksperimentalnih uslova (temperatura stacionarne faze, pH, koncentracija organskog modifikatora i soli) na hromatografsko ponašanje ispitivanih supstanci na različitim stacionarnim fazama u cilju pronalaženja hromatografskih uslova za njihovo optimalno razdvajanje.

Ispitivanje hromatografskog ponašanja supstanci vršeno je kroz proces optimizacije HPLC metode upotrebom više metoda eksperimentalnog modelovanja kako bi se dobio optimalan odgovor sistema. U postavljanju metode bila su bitna preliminarna ispitivanja kako bi se ispitale i identifikovale promenljive koje imaju značajan uticaj na hromatografsko ponašanje ispitivanih supstanci, kao i da bi se odredio opseg u kojem će se one pratiti.

4.1.1. Preliminarna ispitivanja

Talasna dužina detekcije je prvi faktor koji je ispitivan. Postoje podaci da je detekcija ziprasidona vršena na 229 ± 1 nm [50,58]. Snimljen je UV-spektar rastvora svih ispitivanih supstanci u opsegu 200 - 400 nm. Upoređivanjem UV spektara zaključeno je da bi optimalna talasna dužina detekcije bila 250 nm, jer svih šest ispitivanih supstanci ima dobru apsorbanciju na toj talasnoj dužini (Slika 24.). Takođe, uporednim praćenjem hromatografskog razdvajanja supstanci na obe talasne dužine, pokazalo se da je na 250 nm manji šum na baznoj liniji u odnosu na 229 nm. DAD detektor je izabran da bi se tokom ispitivanja proveravala i obezbedila čistoća svih eluiranih pikova.



Slika 24. UV-spektri: a) ziprasidona, b) nečistoće I, c) nečistoće II, d) nečistoće III, e) nečistoće IV, f) nečistoće V

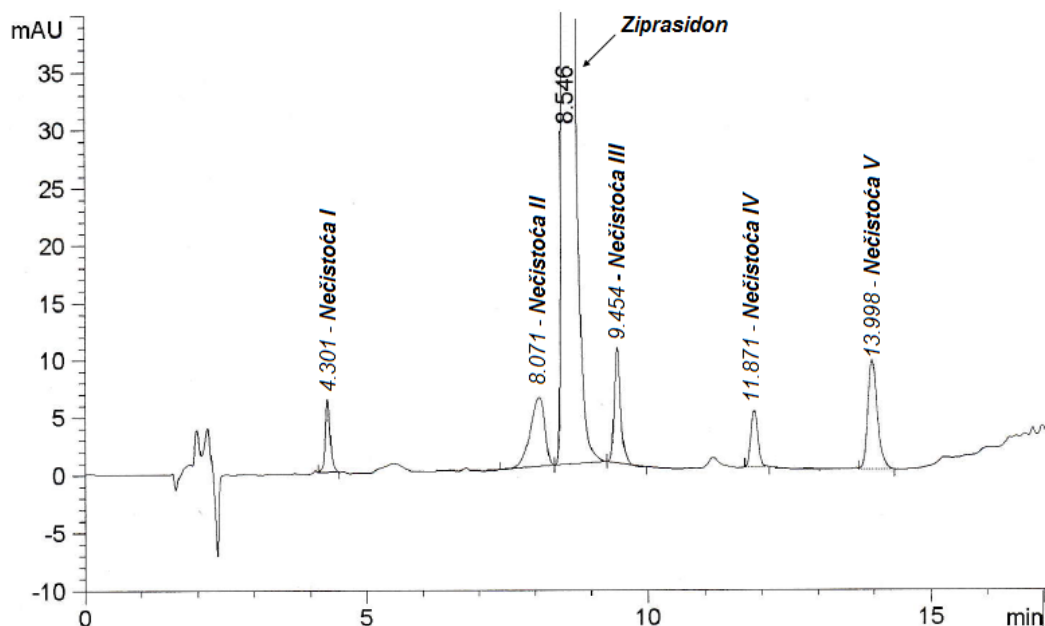
Sledeća faza je odabir odgovarajuće *stacionarne faze*. Bazna jedinjenja pokazuju interakcije sa slobodnim silanolnim grupama stacionarne faze što utiče na povećanje

retencije. Dolazi do jonske izmene između protonovanih baza (BH^+) i katjona iz mobilne faze (npr. Na^+ , K^+) na jonizovanim silanolnim grupama, a posledica može biti i loš oblik pika (*tejlina*). Silanolne interakcije se mogu izbeći izborom stacionarne faze posebno dizajnirane za bazna jedinjenja sa smanjenim brojem slobodnih kiselih silanolnih grupa koje favorizuju retenciju [185]. U dostupnoj literaturi ispitivanje ziprasidona je vršeno na nepolarnim stacionarnim fazama, kao što su C18 stacionarne faze izokraskim [50,57,58] i gradijentnim eluiranjem [49,86]. S obzirom na pomenutu razliku u polarnosti i bazne osobine ziprasidona i njegovih nečistoća, hromatografsko ponašanje je ispitivano na nekoliko modifikovanih stacionarnih faza različite polarnosti, npr. polarne – cijanopropil (CN) i amino (NH_2) i nepolarne – fenil, oktil (C8) i oktadecil (C18) hemijski modifikovane stacionarne faze. Ispitivanjem su obuhvaćeni i različiti tipovi stacionarnih faza (npr. klasični silikagel, silikagel modifikovanih krajeva sa trimetilsilanom (engl. *endcapped*), hibridne stacionarne faze, monolitne stacionarne faze, različite dužine stacionarnih faza, veličine čestica itd.). Na većini ispitivanih stacionarnih faza redosled eluiranja je bio isti. Ipak dešavalo se da na nekim stacionarnim fazama dođe do slepljivanja pikova nečistoća IV i V (Zorbax Extend C18, PurospherStar RP18, Zorbax SBC8) ili do koelucije (Zorbax XDBC8, Discovery HSC18) usled povećane retencije nečistoće IV. Ova nečistoća je jedina prisutna u nejoniizovanom obliku pri niskim pH vrednostima usled odsustva piperazinskog prstena što bi mogao da bude uzrok povećane retencije na pojedinim hidrofobnijim stacionarnim fazama.

Velika strukturna sličnost ziprasidona i nečistoće II (oksidativni proizvod) bila je ključni problem pri razvoju hromatografske metode. Na većini stacionarnih faza nije dobijeno njihovo razdvajanje tako da je rezolucija ovog kritičnog para odlučujuća za izbor nepolarne C18 hemijski modifikovane stacionarne faze. Dobra rezolucija i vreme eluiranja svih komponenti sa stacionarne faze (t_R nečistoće V koja se eluira poslednja je 13,5 min) je postignuto na gusto pakovanoj stacionarnoj fazi sa silikagelom dvostruko modifikovanih krajeva trimetilsilanom (engl. *dubble endcapped*) - Zorbax Eclipse XDB C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m). Međutim, nisu bili zadovoljeni drugi hromatografski parametri. Vrednost faktora simetrije pika nečistoće II je veća od 2 uz značajan *tejlina*. Kako bi se otklonili ovi nedostaci promenjena je stacionarna faza i isti uslovi gradijentnog eluiranja su primenjeni na stacionarnoj fazi Spherisorb ODS 1 (250 x 4,6

mm, 5 μ m). Na ovoj stacionarnoj fazi dobijena je zadovoljavajuća simetrija pika nečistoće II. Pregledom literaturnih podataka utvrđeno je da glavna razlika između ovih stacionarnih faza potiče od punjenja Spherisorb ODS 1 stacionarne faze sferičnim česticama silikagela koje nemaju dodatno modifikovane krajeve trimetilsilanom, tako da su manje izražene hidrofobne interakcije sa analitom [186,187], što bi mogao da bude razlog slabije retencije i bolje simetrije pika. Na Spherisorb ODS 1 stacionarnoj fazi dobijeno je dobro razdvajanje i simetrija svih pikova ispitivanih jedinjenja i ona je odabrana za dalju optimizaciju eksperimentalnih uslova.

Izbor komponenata i pH vrednosti mobilne faze. Pregledom literature ustanovljeno je da je retenciono ponašanje ziprasidona ispitivano izokraskim eluiranjem sa različitim procentom organskog rastvarača (24–60 %), uglavnom u smeši acetonitrila i metanola. U početku sastav mobilne faze nije menjan tokom hromatografskog postupka, ali zbog velike razlike u polarnosti ispitivanih supstanci nije dobijeno razdvajanje svih šest jedinjenja. Zatim je sastav mobilne faze modifikovan prema programu za linearni gradijent uz upotrebu metanola kao organskog rastvarača. Šum na baznoj liniji je bio veliki uz značajno povećanje retencije (preko 60 minuta) manje polarnih supstanci (nečistoće III i V). Dodatkom acetonitrila postignute su bolje hromatografske performanse: manja retencija na stacionarnoj fazi, manje šumova na baznoj liniji, oštriji pikovi i bolje razdvajanje. Ovakav efekat ACN je bio očekivan, s obzirom na generalno veću snagu eluiranja, manju UV apsorpciju ACN na nižim talasnim dužinama od metanola, manji pritisak na stacionarnoj fazi pri istom protoku u smeši sa vodenom fazom, ali i verovatno zbog različitih hemijskih osobina rastvarača koji su pokazali različitu selektivnost prilikom razdvajanja ove smeše jedinjenja. Zbog svega navedenog, ACN je odabran kao organski modifikator. Međutim, primenom linearnog gradijentnog programa dobijena je loša rezolucija između dva kritična para: nečistoća II/ziprasidon i ziprasidon/nečistoća III (Slika 25.). Dalja ispitivanja su pokazala da je za bolje razdvajanje ove tri supstance neophodno izokrasko eluiranje u delu gradijenta i najbolje razdvajanje pokazao je udeo acetonitrila od 37,5 %, što je utvrđeno eksperimentalnim putem.

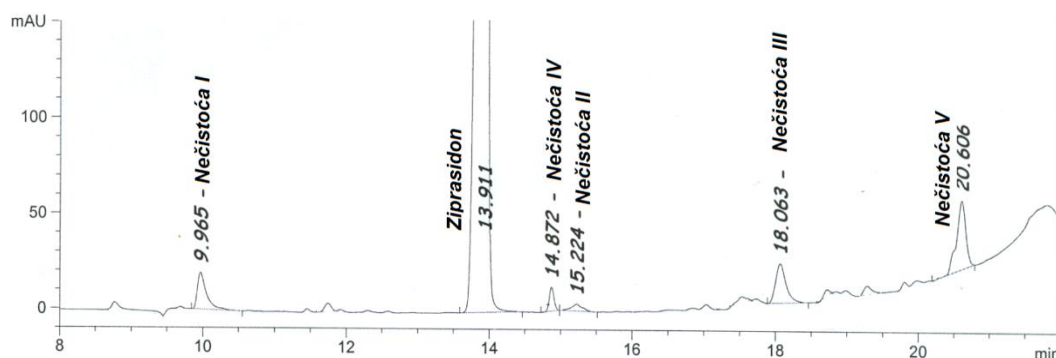


Slika 25. Hromatogram smeše ziprasidona ($c=200 \mu\text{g mL}^{-1}$) i nečistoća I-V ($c=2 \mu\text{g mL}^{-1}$) na koloni Spherisorb ODS1 C18 250 x 4.6 mm x 5 μm , mobilna faza: fosfatni pufer pH 2,5 (H_3PO_4) i ACN

Pored izbora odgovarajuće stacionarne faze, postoji još nekoliko metoda u optimizaciji metode za smanjenje silanolnih efekata: niska vrednost pH mobilne faze ($2,0 < \text{pH} < 3,5$) čime se smanjuje koncentracija jonizovanih silanolnih grupa, dodavanje amina u mobilnu fazu ili upotreba mobilne faze viših pH vrednosti ($\text{pH} > 7$) za razdvajanje baznih jedinjenja koja mogu biti nejonizovana na višim pH vrednostima [188]. U kiseloj sredini ziprasidon i nečistoće I, II, III i V su prisutne u jonizovanom obliku usled protonovanja tercijarnog amina na piperazinskom heterociklusu, a nečistoća IV je u nejonizovanom obliku. Literaturni podaci ukazali su da je ispitivanje ziprasidona vršeno u kiselom opsegu pH vrednosti mobilne faze jer u baznoj sredini podleže značajnoj degradaciji. pH vrednost je obuhvatala opseg od 3-6 [50,57,72,73,87] u kome je inicijalno ispitivano hromatografsko ponašanje supstanci pri razvoju analitičke metode.

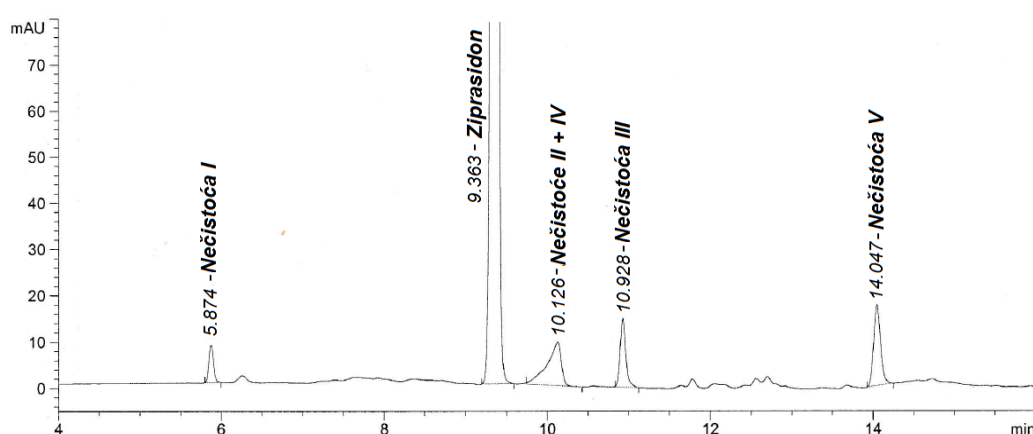
Prvo je korišćena voda kao komponenta mobilne faze i ispitivana pH vrednost je podešavana ortofosfornom kiselinom. Zbog nezadovoljavajuće simetrije pikova ispitivanih supstanci, ispitan je uticaj različitih pufera kao komponenata u mobilnoj fazi prema linearnom gradijentnom programu od 100% pufera do 0%. Inicijalno je korišćen fosfatni pufer čija je vrednost podešena na pH 5,0. U odnosu na ziprasidon kraće t_R je

imala samo nečistoća I. Ostale nečistoće su imale veću retenciju u odnosu na ziprasidon, uz dugo t_R nečistoće V koja se poslednja eluirala (oko 20,6 min) i uz nezadovoljavajuću simetriju pikova nečistoća II i V (Slika 26.).



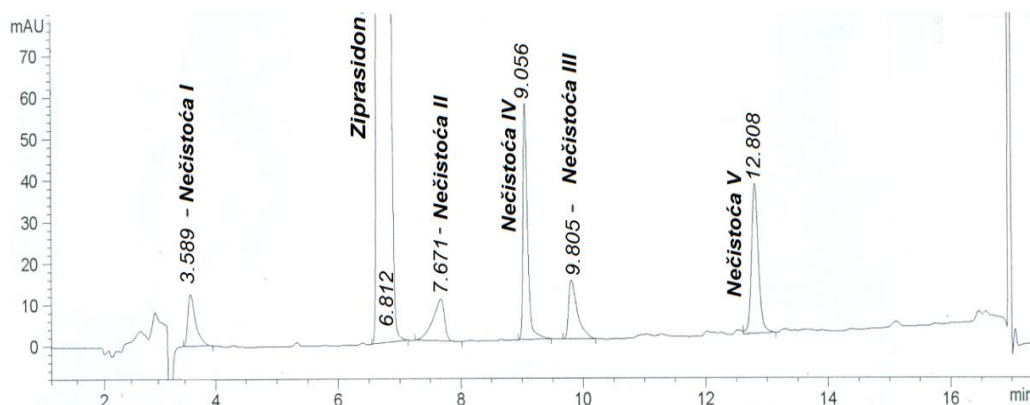
Slika 26. Hromatogram smeše ziprasidona ($c=200 \mu\text{g mL}^{-1}$) i nečistoća I-V ($c=2 \mu\text{g mL}^{-1}$) na koloni Spherisorb ODS1 C18 250 x 4.6 mm x 5 μm , mobilna faza: fosfatni pufer pH 5,0 i ACN

Pri pH vrednosti pufera 6,0 povećala se retencija svih supstanci. Simetrija pika nečistoće II je bila nezadovoljavajuća ($A_s > 2$) uz *tejl*ing pikova nečistoća I i IV. Promena linearnog gradijentnog programa od 70% do 0% pufera uticala je na smanjenje retencije svih supstanci bez promena u efikasnosti razdvajanja. Snižavanje pH vrednosti pufera ispod 5,0 uticalo je na izmenu redosleda eluiranja ispitivanih supstanci. Pri pH vrednosti 4,8 pikovi nečistoća II i IV su se preklapili (Slika 27.).



Slika 27. Hromatogram smeše ziprasidona ($c=200 \mu\text{g mL}^{-1}$) i nečistoća I-V ($c=2 \mu\text{g mL}^{-1}$) na koloni Spherisorb ODS1 C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm), mobilna faza: fosfatni pufer pH 4,8 i ACN

Pri pH vrednosti pufera 4,5 redosled eluiranja između nečistoća II i IV je zamenjen, tako da se povećala retencija nečistoće IV u odnosu na nečistoću II (Slika 28.). Uprkos postignutom razdvajanju svih pikova, nastavljeno je ispitivanje uticaja nižih pH vrednosti na retenciono ponašanje zbog nezadovoljavajuće simetrije pikova nečistoća I, II, III i IV.



Slika 28. Hromatogram smeše ziprasidona ($c=200 \mu\text{g mL}^{-1}$) i nečistoća I-V ($c=2 \mu\text{g mL}^{-1}$) na koloni Spherisorb ODS1 C18 250 x 4.6 mm x 5 μm , mobilna faza: fosfatni pufer pH 4,5 i ACN

Podešavanjem pH vrednosti pufera na 4,0 menja se redosled eluiranja nečistoća III i IV, tako da je retencija nečistoće III manja u odnosu na nečistoću IV. To se može objasniti činjenicom da je nečistoća III (dimer) zastupljena više u protonovanom obliku na nižim pH vrednostima i da se brže eluiira sa stacionarne faze u odnosu na nečistoću IV koja nije protonovana. Dalje snižavanje pH vrednosti pufera uticalo je na smanjenje rezolucije kritičnog para ziprasidon/nečistoća II. Pri pH vrednosti pufera 2,5, redosled eluiranja između nečistoće II i ziprasidona je izmenjen, tako da je retenciono vreme nečistoće II manje u odnosu na ziprasidon (Slika 25.). Takođe, dobijena je zadovoljavajuća simetrija svih pikova i značajno je smanjen *tejl*ing.

Na osnovu ovih preliminarnih ispitivanja pokazano je da promena pH vrednosti ima značajan uticaj na retenciju svih ispitivanih supstanci, a najviše na retenciono ponašanje nečistoće II. Ovo se može objasniti prisustvom keto grupe na α -C atomu indolinona što doprinosi izraženijoj polarnosti ove molekule u odnosu na ostale supstance i na nju promena pH pufera mobilne faze najviše utiče. Smanjenjem pH vrednosti mobilne faze nečistoća II je zastupljena više u jonizovanom obliku i pokazuje

manji afinitet vezivanja za stacionarnu fazu, što utiče na simetriju pika i retenciju. Takođe, hromatografsko ponašanje ostalih ispitivanih supstanci bi moglo da bude posledica veće jonizacije ispitivanih jedinjenja na nižim pH vrednostima. S obzirom na promene redosleda eluiranja, kao i teškoće u razdvajanju kritičnog para – ziprasidon/nečistoća II, bilo je potrebno detaljno ispitati uticaj pH na hromatografsko ponašanje ispitivanih supstanci u uskom opsegu pH vrednosti radi dobijanja optimalnih uslova za njihovo razdvajanje.

Preliminarna ispitivanja su pokazala da je neophodno dodavanje *modifikatora* u mobilnu fazu. Uporedo sa fosfatnim puferom vršena su ispitivanja sa trietilamonijum-fosfatnim i amonijačno-acetatnim puferom na istim pH vrednostima. Pri uporednim analizama sa trietilamonijum-fosfatnim i fosfatnim puferom pri istim pH vrednostima, pokazalo se da supstance brže eluiraju u prvom slučaju. Prisustvo modifikatora amonijačno-acetatnog pufera je pokazalo drugačiji uticaj na jonizaciju ispitivanih supstanci u odnosu na fosfatni pufer. Redosled eluiranja se menjao već na pH 4,5 kada je došlo do koeluiranja dva para supstanci, ziprasidona i nečistoće II i nečistoće III i IV. Takođe, primećeno je i duže zadržavanje nečistoće V na stacionarnoj fazi u odnosu na fosfatni pufer. Ispitivan je i uticaj jon-par reagensa Na-oktansulfonske kiseline na hromatografsko ponašanje supstanci. Pored loše rezolucije između parova pikova nečistoća IV/ziprasidon i ziprasidon/nečistoća II i povećane retencije svih nečistoća, nečistoća III (dimer) je nestabilna u prisustvu ovog modifikatora. Nakon svih ispitivanja, izbor fosfatnog pufera se pokazao kao najoptimalniji za ispitivanje hromatografskog ponašanja supstanci.

Kada je u mobilnu fazu dodat trietanolamin simetrija pikova i rezolucija su znatno poboljšane i smanjena je retencija. Amini u mobilnoj fazi, kao jake baze, interaguju sa slobodnim jonizovanim silanolnim grupama, što blokira interakciju ovih grupa sa analiziranim supstancama čime se objašnjava poboljšanje efikasnosti i selektivnosti sistema [188]. Optimalne koncentracije fosfatnog pufera i trietanolamina u vodenoj mobilnoj fazi određene su upotrebom eksperimentalnog dizajna.

Temperatura stacionarne faze obično značajno utiče na retenciju (k), selektivnost (α) i efikasnost (N). Razmatrana je zavisnost hromatografskog ponašanja svih ispitivanih supstanci od promene temperature stacionarne faze. Ispitivanja su pokazala da se retencija smanjuje kako temperatura stacionarne faze raste, čime se

skraćuje vreme izvođenja analize. Uticaj promene temperature na razdvajanje parova ispitivanih supstanci ispitan je u opsegu od 20 - 30 °C jer je u ovom opsegu simetrija pikova bila zadovoljavajuća.

Tokom svih preliminarnih ispitivanja *volumen injektovanja* (40 µL) je održavan na konstantnoj vrednosti. U početku *protok* je bio 1 mL min⁻¹. S obzirom da promena protoka generalno utiče na retenciono ponašanje, ispitivano je povećanje protoka u cilju smanjenja retencije i vremena izvođenja analize. Protok je povećavan za pola jedinice i najbolja selektivnost u razdvajanju i skraćenje vremena eluiranja su dobijeni pri protoku od 2 mL min⁻¹. Međutim, pritisak u sistemu je bio veliki, pa je kao optimalno rešenje za skraćenje analitičkog postupka i poboljšanje rezolucije kritičnih parova odabran protok od 1,5 mL min⁻¹.

4.1.2. Optimizacija hromatografskih uslova

Optimizacija hromatografskih uslova je obuhvatila optimizaciju mobilne faze i ispitivanje selektivnosti RP stacionarnih faza sličnih karakteristika pri odabranim eksperimentalnim uslovima u odnosu na ziprasidon i njegove nečistoće.

4.1.2.1. Optimizacija mobilne faze

Nakon preliminarnih ispitivanja za optimizaciju su odabrana četiri faktora koja su najviše uticala na hromatografsko ponašanje ispitivanih supstanci: koncentracija fosfatnog pufera kalijum-dihidrogenfosfata u vodenoj fazi, od 25 mmol L⁻¹ do 75 mmol L⁻¹, pH vrednost vodene faze od 2,3 do 2,7, koncentracija trietanolamina od 0,5 % do 1,5% i temperatura stacionarne faze od 20 °C do 30 °C.

Optimizacija eksperimentalnih uslova i modelovanje hromatografskog ponašanja sistema vršena je primenom linearne (PLS) i nelinearne statističke metode (ANN-MLP).

4.1.2.1.1. Metoda parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS) u modelovanju RP-HPLC sistema za ispitivanje zipasidona i njegovih nečistoća

Određivanje optimalnih hromatografskih uslova vršeno je pomoću metode parcijalnih najmanjih kvadrata – PLS [98] korišćenjem matematičkog programa Soft

Independent Modeling of Class Analogy SIMCA P+ 12.0 [166]. Ispitivani faktori i njihovi nivoi, tj. opsezi, broj i plan eksperimenata su navedeni u Tabeli 1 [189].

Tabela 1. Rezultati dobijeni prilikom optimizacije RP-HPLC metode za određivanje ziprasidona i njegovih nečistoća [189]

Eksp. No.	Temperatura [°C]	pH	KH ₂ PO ₄ [mM]	% TEA	Rs-Imp2-Zipr	Rs-Zipr-Imp3
1	20	2,5	25	1	1,32	7,92
2	25	2,5	25	1	1,57	8,16
3	30	2,5	25	1	1,78	8,61
4	25	2,3	25	1	1,54	7,98
5	25	2,5	25	1	1,55	8,01
6	25	2,7	25	1	1,55	8,05
7	25	2,5	25	1	1,55	8,05
8	25	2,5	50	1	1,53	8,3
9	25	2,5	75	1	1,57	8,16
10	25	2,5	25	0,5	1,3	8,76
11	25	2,5	25	1	1,55	8,01
12	25	2,5	25	1,5	1,63	7,49

Kvantitativna regresiona analiza je izvršena sa ciljem da se uspostavi korelacija između ispitivanih eksperimentalnih uslova i vrednosti rezolucije (Rs) pri svakom od njih. Eksperimentalni uslovi su predstavljali X-varijable, tj. faktore, a kao odgovor, tj. Y-varijable odabrane su Rs kritičnih parova pikova. Pri svakom od 12 izvedenih eksperimenata praćen je uticaj promene jednog faktora. Prilikom modelovanja uzet je u obzir i uticaj interakcije dva faktora na odgovor sistema: pH x koncentracija KH₂PO₄, T x koncentracija KH₂PO₄, T x %TEA, T x pH. Takođe, ispitivana je i kvadratna zavisnost svakog faktora i Rs: pH x pH, %TEA x %TEA, T x T, koncentracija KH₂PO₄ x koncentracija KH₂PO₄. Pošto se opsezi ispitivanih faktora razlikuju nekoliko puta svi podaci su skalrani.

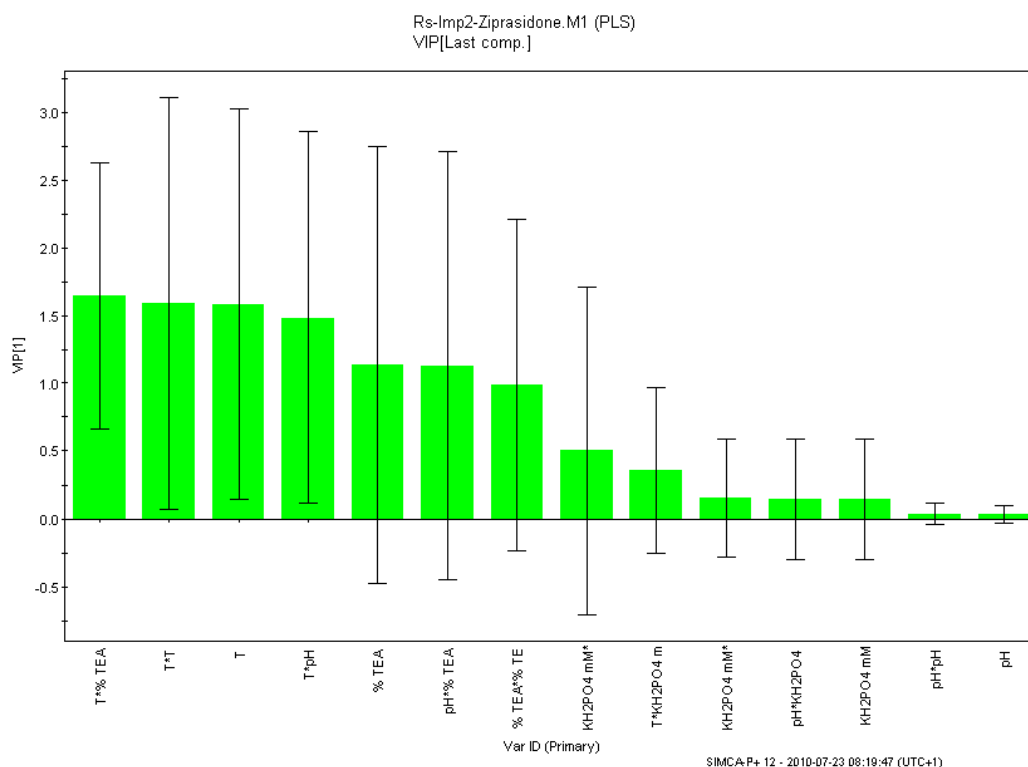
Tokom modelovanja su praćena dva odgovora sistema, „Rs Zipr-Imp 2“ i „Rs Zipr-Imp 3“ i za svaki odgovor je stvoren poseban model. To su Rs između kritičnih parova, tj. pikova koji su najbliži glavnom piku – ziprasidona i nečistoće II koja se eluira ispred, i ziprasidona i nečistoće III koja izlazi iza glavnog pika. Eksperimentalno dobijene vrednosti rezolucija „Rs Zipr-Imp 2“ i „Rs Zipr-Imp 3“ prikazane su u Tabeli 1. Eksperimentalni dizajn je stvaran tako da se nađu maksimalni odgovori sistema.

Razvoj modela je podrazumevao *screening* fazu i optimizacionu fazu. Primarno je podatke za modelovanje sačinjavalo ukupno 14 X-promenljivih ($K=14$) i 1 Y-promenljiva ($M=1$). U toku *screening* faze je ispitan uticaj svakog uslova (X_k) na Y-odgovor u modelu pomoću VIP_k parametra [98]. Da bi se pokazao značaj različitih X-varijabli, VIP je predstavljen grafički sa intervalima pouzdanosti za nivo značajnosti od 95% (Slika 29. [189]).

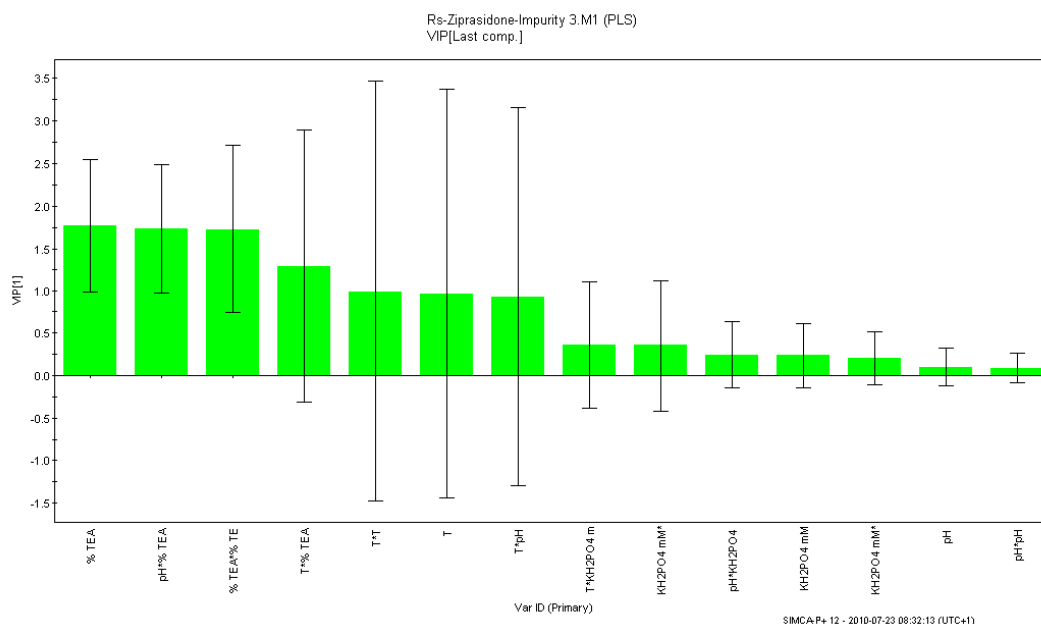
Nakon procene dobijenog dijagrama, promenljive: %TEA, pH, koncentracija KH_2PO_4 , koncentracija KH_2PO_4 x koncentracija KH_2PO_4 , pH x pH, pH x koncentracija KH_2PO_4 , T x koncentracija KH_2PO_4 , %TEA x koncentracija KH_2PO_4 , pH x %TEA, %TEA x %TEA, su eliminisane iz „Rs Zipr-Imp 2“ modela, a varijable T x %TEA, T x T, T, T x pH su izabrane za formiranje PLS modela (Slika 29.).

X-varijable sa VIP vrednostima većim od 1 (%TEA, pH x %TEA, %TEA x %TEA, T x %TEA, T x T, T, T x pH) su razmatrane u formiranju „Rs Zipr-Imp 3“ modela. Kako je uticaj pH vrednosti bio veliki u toku preliminarnih ispitivanja i ova varijabla je uključena u PLS modelovanje (Slika 29.).

a)



b)

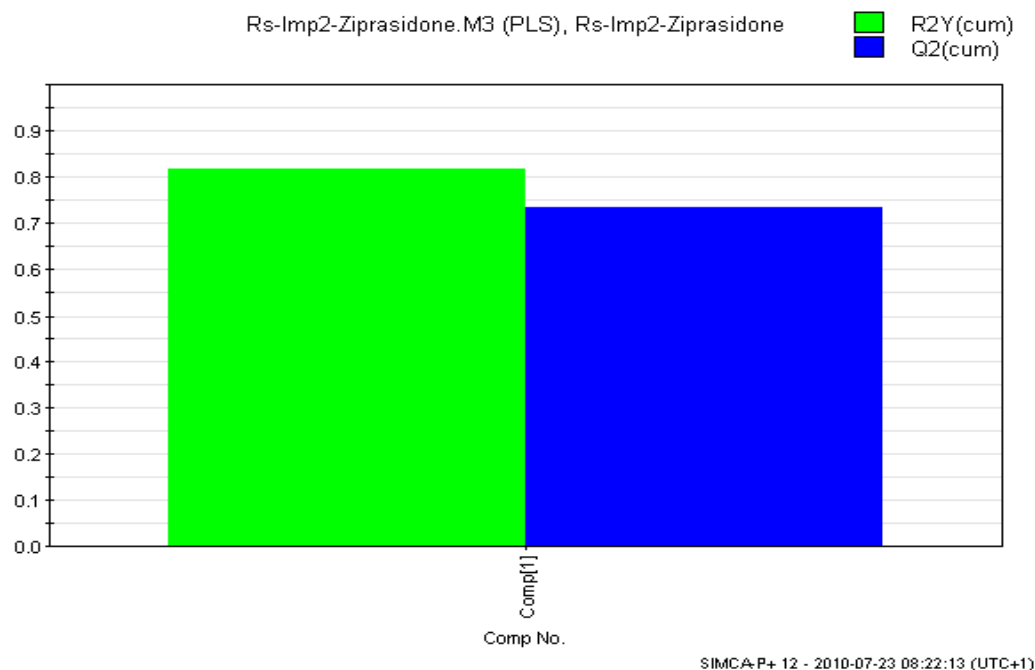


Slika 29. Dijagrami izračunatih VIP vrednosti za uticaj svakog faktora na Rs između ziprasidona i njegovih nečistoća (*screening* faza): a) model „Rs Zipr-Imp 2“; b) model „Rs Zipr-Imp 3“

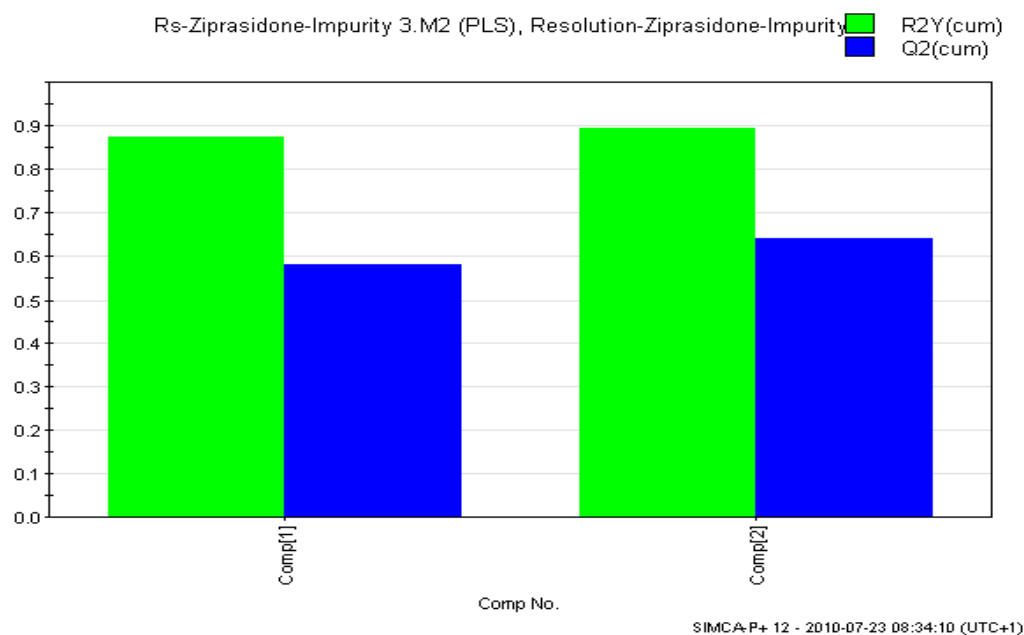
Konačno, podatke za model „Rs Zipr-Imp 2“ sačinjavalo je 5 varijabli: 4 X-promenljivih ($K=4$) i 1 Y-promenljiva ($M=1$), a za model „Rs Zipr-Imp 3“ 9 varijabli: 8 X-promenljivih ($K=8$) i 1 Y-promenljiva ($M=1$). Za optimizaciju faktora koji su pokazali statistički značajan uticaj na hromatografsko ponašanje kritičnih parova primenjen je PLS metod i metoda površine odgovora.

Kvalitet regresije je procenjen koeficijentom determinacije - R^2 i validacionim regresionim faktorom ukrštene validacije - Q^2 (*Leave-One-Out Cross Validated R^2 , Q^2*). R^2 vrednost pokazuje koji je deo tj. procenat varijacije zavisne promenljive – Y objašnjen modelom, a Q^2 vrednost je mera tačnosti predviđanja modela. Dobijene vrednosti R^2 za „Rs Zipr-Imp 2“ i „Rs Zipr-Imp 3“ 0,8188 i 0,8939 ukazuju na veoma dobru korelaciju između faktora (X) i odgovora (Y), a visoka vrednost Q^2 (0,7359 i 0,6415) smatra se pokazateljem velike moći predviđanja ispitivane rezolucije (Y) formiranih PLS modela [190,191] (Slika 30.).

a)



b)

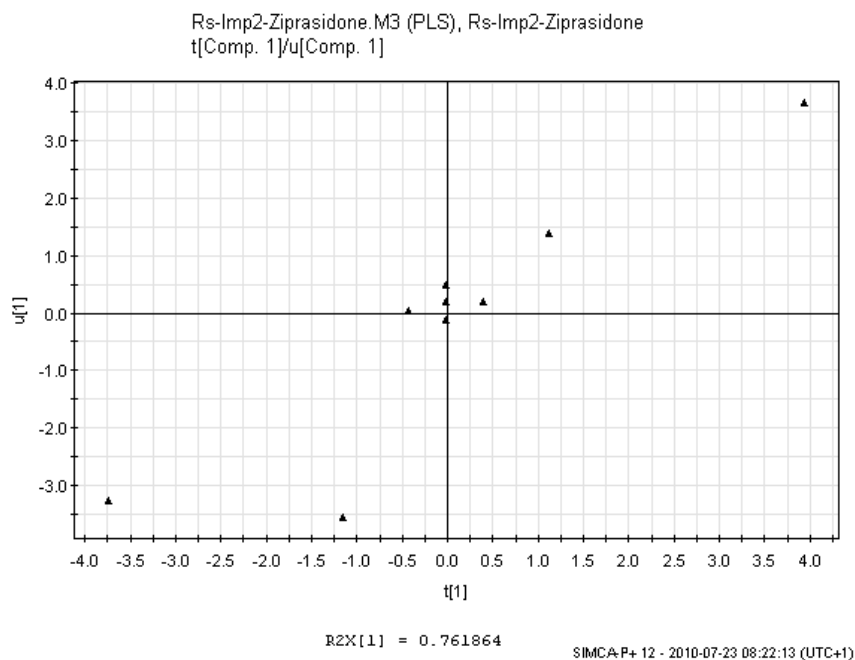


Slika 30. Dijagram za vrednosti R^2 i Q^2 za modele:

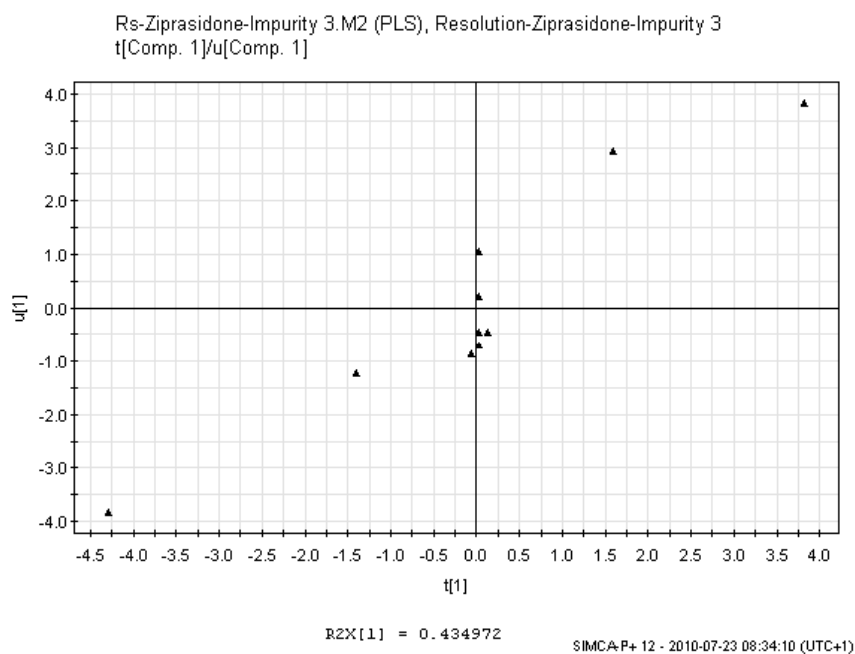
a) „Rs Zipr-Imp 2“ i b) „Rs Zipr-Imp 3“

Grafik *tu* pokazuje zavisnost između X i Y i koristi se za identifikaciju stepena zavisnosti između ispitivanih promenljivih. Ovaj grafik daje vizuelnu korelaciju između X i Y prostora i kod oba modela pokazuje veoma malo odstupanje od linearnosti, tj.

malo rasipanje oko prave linije. Takođe, nije identifikovan nijedan eksperiment koji značajno odstupa (*outlier*) od ostalih po svojim X i Y vrednostima (Slika 31. i 32.).



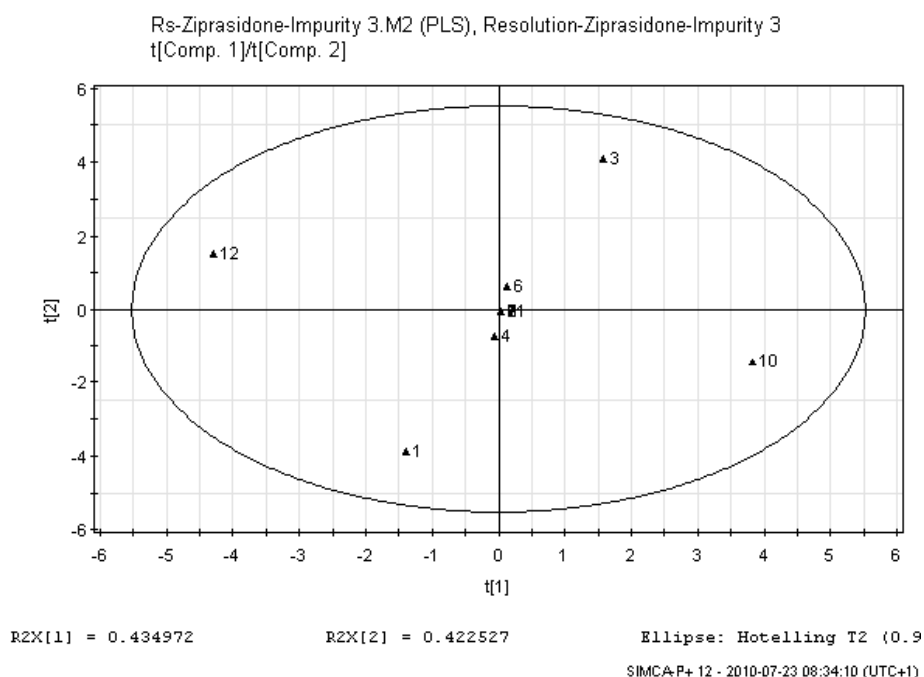
Slika 31. Grafik tu za model „Rs Zipr-Imp 2“



Slika 32. Grafik tu za model „Rs Zipr-Imp 3“

Grafik tt pokazuje kako su X-prostor (X-uslovi) i odgovarajuće vrednosti raspoređeni jedni u odnosu na druge tj. na devijacije u X-podacima. Elipsa na grafiku je definisana pomoću *Hotelling's* T^2 opsega koji uzima u obzir sve komponente i definiše nivo tolerancije od 95% ili od 99%. Kod „Rs Zipr-Imp 2“ grafik tt nije imao značaja u smislu pronalaženja velikog odstupanja (*outlier*-a) u posmatranim eksperimentima u X-prostoru jer je urađeno modelovanje u jednokomponentnom sistemu.

U modelu „Rs Zipr-Imp 3“ svi posmatrani eksperimenti su ravnomerno raspoređeni na osnovu X i Y podataka u okviru elipse kojom je definisan nivo pouzdanosti od 95%, tako da nije bio identifikovan nijedan *outlier* (Slika 33.)



Slika 33. Grafik tt model „Rs Zipr-Imp 3“

Na osnovu PLS modela pomoću programa SIMCA-P+ izračunati su regresioni koeficijenti za svaku X - promenljivu (Slika 34.). Oni izražavaju vezu između svih uslova u modelu i Y varijabli i međusobno su zavisni, pošto su i varijable zavisne i pojednostavljaju pregled i interpretaciju modela [98]. Statistički značaj svakog koeficijenta označen je kao interval pouzdanosti za nivo značajnosti od 95%. Koeficijenti se odnose na varijable čije su vrednosti centrirane i svedene na istu skalu.

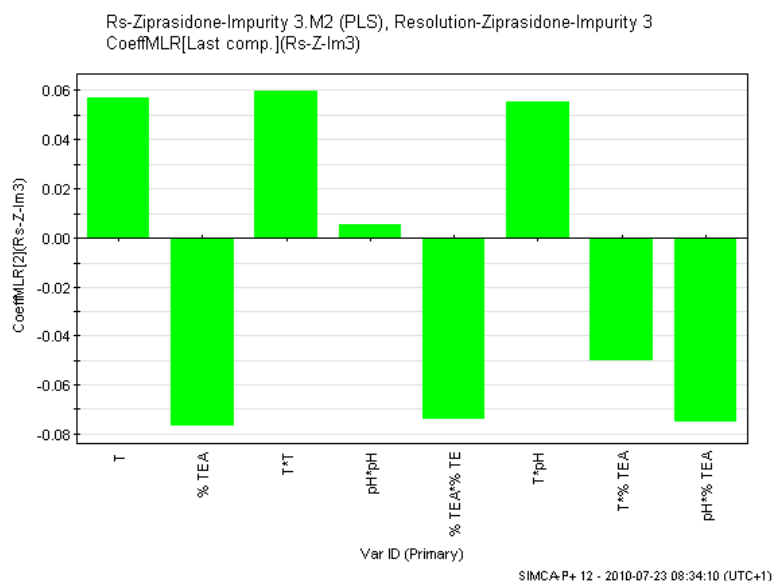
U modelu „Rs Zipr-Imp 2“ (Slika 34a.), sve promenljive imaju pozitivan uticaj na rezoluciju, dok kod modela „Rs Zipr-Imp 3“ (Slika 34b.) % TEA, %TEA x %TEA, T

x %TEA i pH x %TEA imaju negativan uticaj. Zajedničko u profilima koeficijenata je što su odgovori oba modela najosetljiviji na promene temperature i %TEA (Slika 34.).

a)



b)

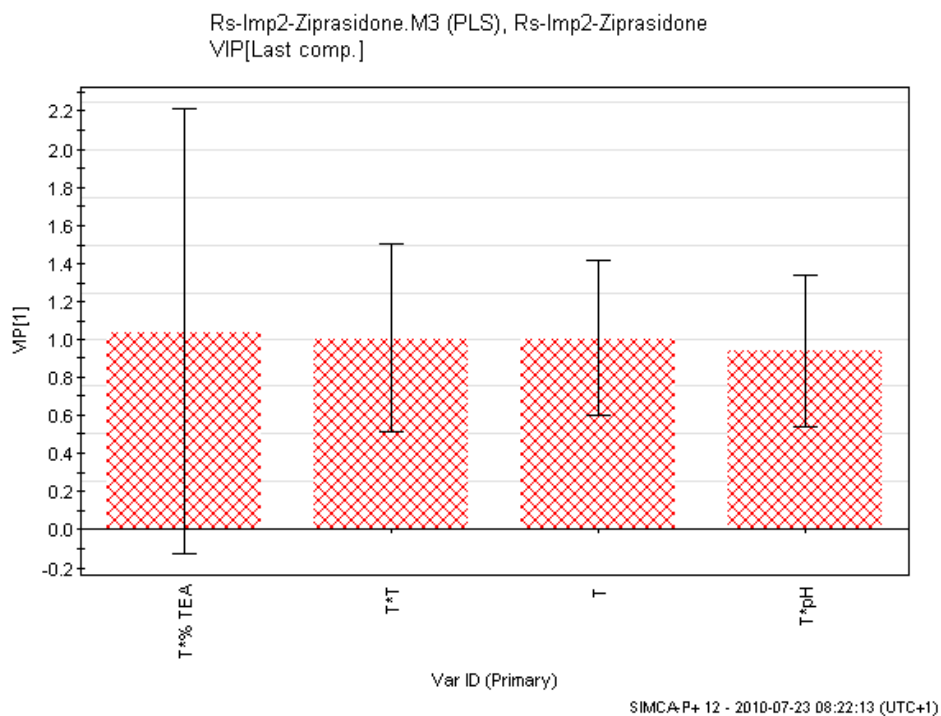


Slika 34. Dijagrami izračunatih vrednosti koeficijenata matematičkih modela:

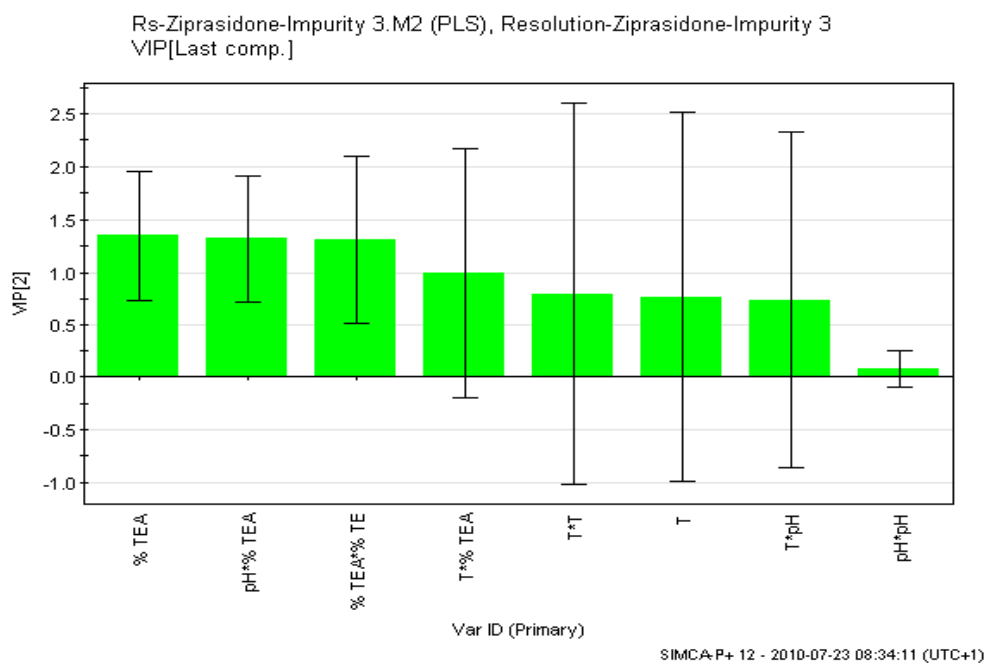
a) „Rs Zipr-Imp 2“ i b) „Rs Zipr-Imp 3“

Kako bi se potvrdila važnost svake promenljive u modelu izračunat je i VIP parametar. U oba modela, promene T i %TEA su na osnovu visoke vrednosti VIP parametra ($1,0 > \text{VIP}$) pokazale najveći uticaj na rezolucije (Slika 35.).

a)



b)



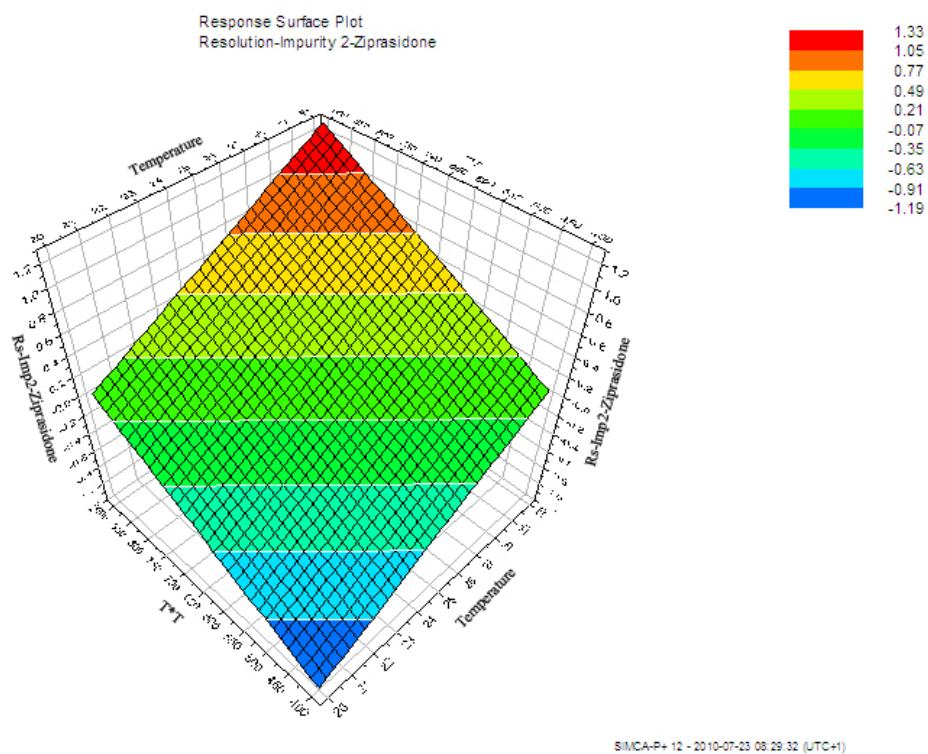
Slika 35. Dijagrami izračunatih VIP vrednosti za uticaj svakog faktora na *Rs* između ziprasidona i njegovih nečistoća (optimizaciona faza): a) „Rs Zipr-Imp 2“ i b) „Rs Zipr-Imp 3“

Porast temperature stacionarne faze doprinosi porastu R_s u oba modela. Povećanje koncentracije TEA dovodi do povećanja vrednosti R_s između ziprasidona i nečistoće II, dok smanjuje R_s između ziprasidona i nečistoće III.

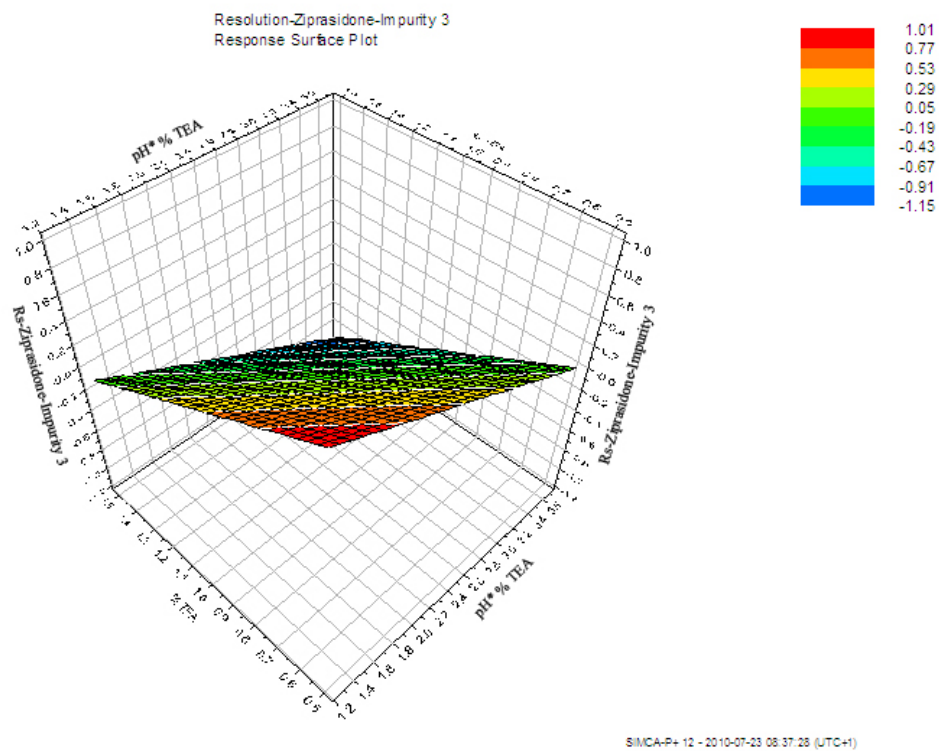
Na osnovu dobijenih visokih vrednosti statističkih parametara R^2 (0,8188 i 0,8939) i Q^2 (0,7359 i 0,6415) utvrđeno je da ovaj model dizajna adekvatno opisuje proces razdvajanja dva kritična para ziprasidona i njegovih nečistoća II i III u hromatografskom sistemu u definisanom opsegu ispitivanih uslova i da eksperimentalno dobijene vrednosti ne odstupaju značajno od predviđenih. Takođe, korišćenjem PLS metode, utvrđeno je da hromatografsko razdvajanje parova zavisi od temperature stacionarne faze i procenta trietanolamina u mobilnoj fazi, dok je uticaj ostalih faktora od manjeg značaja. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da sadržaj TEA u mobilnoj fazi i temperatura stacionarne faze moraju biti pažljivo odabrani i kontrolisani.

Radi bolje analize i definisanja optimalnih vrednosti ispitivanih uslova za odgovore sistema, zavisnost između posmatranih faktora i odabranog odgovora, je prikazana u vidu odgovarajućih trodimenzionalnih grafika, odnosno površina odgovora. Na Slici 36. prikazana je zavisnost rezolucija od dva najznačajnija faktora. Za model „ R_s Zipr-Imp 2“ odabrane su varijable T i $T \times T$, a kod „ R_s Zipr-Imp 3“ varijable $pH \times \%TEA$ i $\%TEA$. 3-D grafici su pokazuju da je optimalna koncentracija trietanolamina 1% za oba odgovora sistema. Odlučeno je da se, bez obzira na pozitivan uticaj temperature na rezoluciju, ona ne povećava iznad 25°C, jer dalje povećanje temperature skraćuje trajanje stacionarne faze.

a)



b)



Slika 36. 3-D grafik: a) $f(Rs\ Imp\ II - Zipr) = f(T, T*T)$ i
 $f(Rs\ Zipr- Imp\ III) = f(pH*TEA\ i\ \%TEA)$

4.1.2.1.2. Veštačke neuronske mreže (ANN) u modelovanju RP-HPLC sistema za ispitivanje zipasidona i njegovih nečistoća

Veštačke neuronske mreže sa višeslojnim perceptronom (ANN-MLP) [192] uz *back propagation* (BP) algoritam [193] su odabrane za nelinearno modelovanje. Prvi korak u konstrukciji veštačkih neuronskih mreža je definisanje ispitivanih faktora – ulaza (*input*) i odgovora sistema-izlaza (*output*). Kao i kod PLS modelovanja, odabrana su četiri faktora za optimizaciju mobilne faze: koncentracija KH_2PO_4 u vodenoj fazi (25; 50 i 75 mmol L^{-1}), pH vrednost vodene faze (2,3; 2,5 i 2,7), koncentracija TEA (0,5; 1,0 i 1,5 %) i temperatura stacionarne faze (20; 25 i 30 °C). Odlučeno je da se formiraju dva modela R_s/α -ANN-MLP-model i t_R -ANN-MLP-model. U prvom su kao odgovori sistema pod različitim eksperimentalnim uslovima, odabrane rezolucije (R_s : $R_s/\text{Imp II-Zipr}$, $R_s/\text{Zipr-Imp III}$) i faktori selektivnosti (α : $\alpha/\text{Imp II-Zipr}$, $\alpha/\text{Zipr-Imp III}$) dva kritična para: nečistoća II/ziprasidon i ziprasidon/nečistoća III, a u drugom modelu t_R ziprasidona i nečistoća I-V. Vrednosti *input*-a i *output*-a predstavljene u Tabelama 2. i 3. [194] su korišćene za treniranje višeslojne nerekurentne (*feedforward*) mreže gde se stvara konekcija samo u jednom smeru od *input*-a, preko skrivenih slojeva ka *output*-u. S obzirom na mali skup ulaznih podataka, nije bilo mogućnosti za podelu podataka na trening, validacioni i verifikacioni set, pa je testiranje i verifikacija performansi modela vršena unutrašnjom ukrštenom validacijom (LOO-CV) [162,163]. Za procenu kvaliteta formiranih jednačina i odabir statistički najznačajnijih modela korišćeni su sledeći statistički parametri: r^2 , RMSEE, RMSEP i validacioni regresioni faktor Q^2 [195].

Tabela 2. Predviđanje faktora selektivnosti (α) i rezolucije (R_s) za ziprasidon i nečistoće II i III pod različitim eksperimentalnim uslovima pomoću formiranog **Rs/ α -ANN-MLP modela** (maksimalno epoha: 7, veličina serije: 9, validacioni interval: 2, treniranje završeno posle 703 epoha)

Experimenti	T [°C]	pH	KH ₂ PO ₄ [mM]	TEA [%]	Rs/Imp II-Zipr	Pred-Rs/Imp II-Zipr	Rs/Zipr-Imp III	Pred-Rs/Zipr-Imp III
Exp 1	20	2,5	50	1	1,32	1,319733	7,92	7,917773
Exp 2	25	2,5	50	1	1,55	1,545068	8,12	8,055281
Exp 3	30	2,5	50	1	1,78	1,779972	8,61	8,607911
Exp 4	25	2,3	50	1	1,54	1,542004	7,98	8,010163
Exp 5	25	2,7	50	1	1,55	1,550974	8,05	8,088267
Exp 6	25	2,5	25	1	1,55	1,550247	8,05	8,050197
Exp 7	25	2,5	75	1	1,57	1,571029	8,16	8,161077
Exp 8	25	2,5	50	0,5	1,30	1,300549	8,76	8,759963
Exp 9	25	2,5	50	1,5	1,63	1,630606	7,49	7,489305
					r^2 , obs vs, pred	0,9999	r^2 , obs vs, pred	0,9970
Experimenti	T [°C]	pH	KH ₂ PO ₄ [mM]	TEA [%]	α -Imp II-Zipr	Pred- α -Imp II-Zipr	α -Zipr-Imp III	Pred- α -Zipr-Imp III
Exp 1	20	2,5	50	1	2,98	2,979683	1,09	1,090178
Exp 2	25	2,5	50	1	3,00	2,989326	1,08	1,101114
Exp 3	30	2,5	50	1	2,88	2,879663	1,11	1,110162
Exp 4	25	2,3	50	1	3,03	3,032672	1,11	1,101668
Exp 5	25	2,7	50	1	2,94	2,944634	1,11	1,100285
Exp 6	25	2,5	25	1	3,16	3,159578	1,06	1,059853
Exp 7	25	2,5	75	1	2,99	2,989110	1,11	1,109478
Exp 8	25	2,5	50	0,5	2,95	2,950110	1,09	1,089750
Exp 9	25	2,5	50	1,5	3,05	3,051261	1,12	1,119798
					r^2 , obs vs, pred	0,9994	r^2 , obs vs, pred	0,9067
Srednja vredn, r^2 , obs vs, pred								0,9758
MSEE								0,0002
RMSEP								0,0141
LOO-CV, Q^2								0,8687

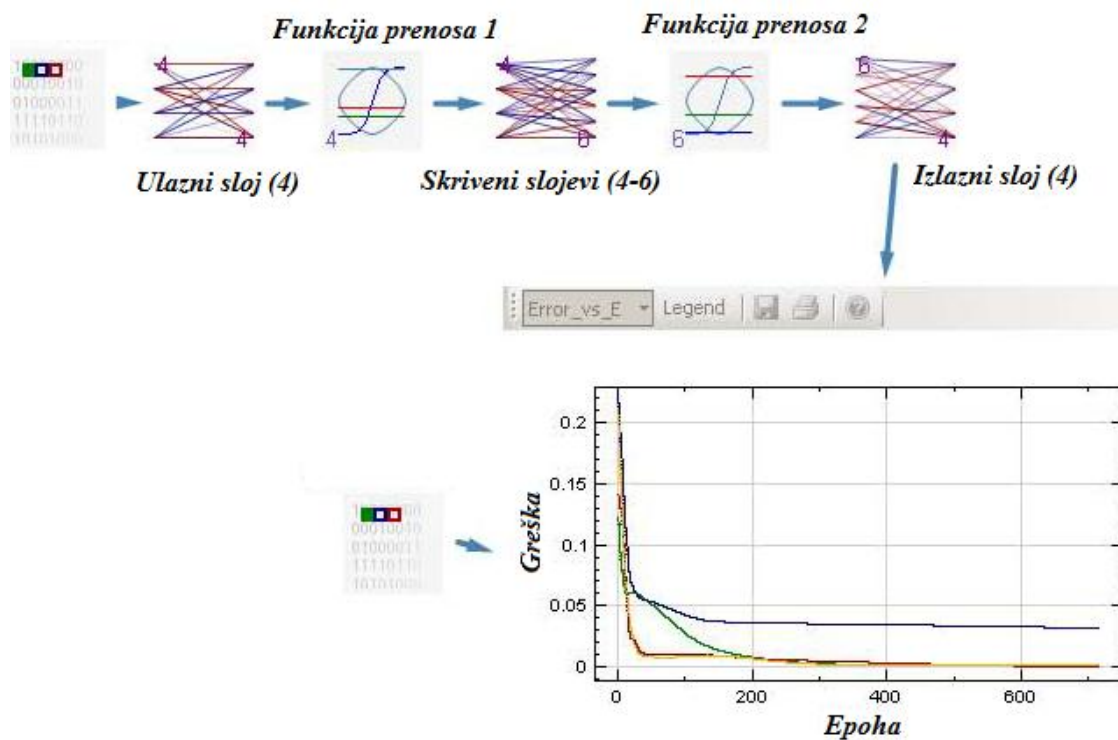
Tabela 3. Predviđanje retencionih vremena (t_R) ziprasidona i njegovih nečistoća pod različitim eksperimentalnim uslovima pomoću formiranog **t_R -MLP-ANN modela** (maksimalno epoha: 7, veličina serije: 9, validacioni interval: 2, treniranje završeno posle 858 epoha)

Experimenti	T [°C]	pH	KH ₂ PO ₄ [mM]	TEA [%]	t_R -Imp I [min]	Pred- t_R -Imp I [min]	t_R -Imp II [min]	Pred- t_R -Imp II [min]	t_R -Ziprasidon [min]	Pred- t_R -Ziprasidon [min]
Exp 1	20	2,5	50	1	3,81	3,810466	7,78	7,766354	8,33	8,327583
Exp 2	25	2,5	50	1	3,69	3,685318	7,37	7,361376	7,95	7,944278
Exp 3	30	2,5	50	1	3,77	3,771903	7,46	7,465751	8,09	8,088064
Exp 4	25	2,3	50	1	3,6	3,597486	7,19	7,161539	7,76	7,754730
Exp 5	25	2,7	50	1	3,65	3,648847	7,32	7,330675	7,90	7,892631
Exp 6	25	2,5	25	1	3,64	3,641318	7,41	7,421936	8,01	8,013101
Exp 7	25	2,5	75	1	3,62	3,622225	7,24	7,262802	7,83	7,845137
Exp 8	25	2,5	50	0,5	3,89	3,891407	7,86	7,854801	8,40	8,402982
Exp 9	25	2,5	50	1,5	3,48	3,482480	6,94	6,932659	7,54	7,540944
					r^2 , obs vs, pred	0,9999	r^2 , obs vs, pred	0,9885	r^2 , obs vs, pred	0,9997
Experimenti	T [°C]	pH	KH ₂ PO ₄ [mM]	TEA [%]	t_R -Imp III [min]	Pred- t_R -Imp III [min]	t_R -Imp IV [min]	Pred- t_R -Imp IV [min]	t_R -Imp V [min]	Pred- t_R -Imp V [min]
Exp 1	20	2,5	50	1	10,85	10,878699	13,51	13,511901	16,4	16,396565
Exp 2	25	2,5	50	1	10,37	10,409500	12,75	12,685717	16,12	16,157104
Exp 3	30	2,5	50	1	10,76	10,729243	12,91	12,922046	16,16	16,159068
Exp 4	25	2,3	50	1	10,1	10,175707	12,58	12,607105	16,07	16,062898
Exp 5	25	2,7	50	1	10,33	10,261599	12,52	12,564716	16,15	16,162508
Exp 6	25	2,5	25	1	10,89	10,854566	13,3	13,296823	16,4	16,400513
Exp 7	25	2,5	75	1	10,18	10,151466	12,64	12,626415	16,1	16,069382
Exp 8	25	2,5	50	0,5	11,47	11,487230	12,87	12,870523	16,68	16,670759
Exp 9	25	2,5	50	1,5	9,65	9,665654	12,55	12,548395	15,82	15,818144
					r^2 , obs vs, pred	0,9964	r^2 , obs vs, pred	0,9963	r^2 , obs vs, pred	0,9973
	Srednja vredn, r^2 obs vs pred								0,9980	
MSEE										0,0005
RMSEP										0,0232
LOO-CV, Q²										0,8802

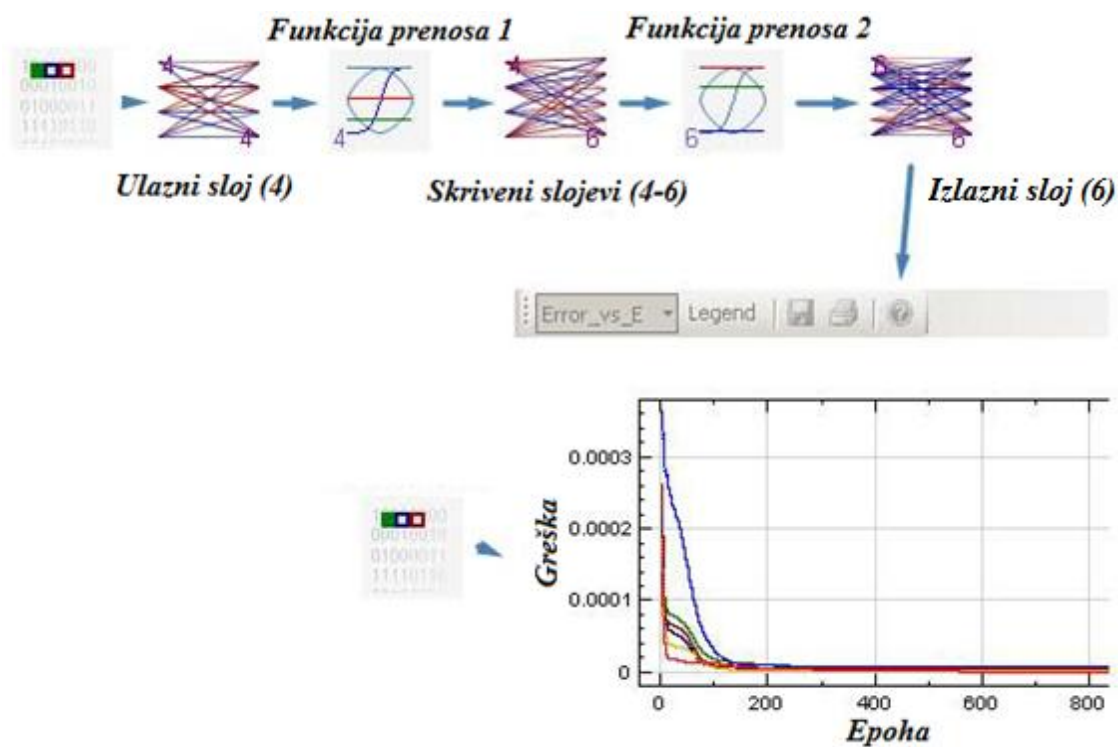
Primenjena je topologija (arhitektura) višeslojnog perceptrona i po dve mreže, troslojne i četvoroslojne, sa sigmoidnom transfer funkcijom su dizajnirane za svaki model. Kvalitet predviđanja hromatografskih parametara R_s/α i t_R je upoređivan na osnovu vrednosti RMSEP, r^2 (eksperimentalne u odnosu na predviđenu vrednost) i $Q^2(Y)$ parametra ukrštene validacije (LOO-CV), tako da su za oba modela odabrane četvoroslojne mreže. U prvom sloju (*input* sloj) broj čvorova (4) je bio jednak broju faktora od značaja za optimizaciju RP-HPLC sistema. Četvrti sloj (*output* sloj) se sastoji od neurona koji predstavljaju R_s i α kritičnih parova (4) odnosno t_R ispitivanih jedinjenja (6).

Najbolja mreža za R_s/α -ANN-MLP model formirana je treniranjem sa *backpropagation* algoritmom u 703 epoha odnosno 858 epoha za t_R -ANN-MLP model, kada je dobijena najniža vrednost za grešku (RMSEP). Eksperimentalno dobijeni rezultati za R_s , α i t_R poređeni su sa vrednostima koje predviđa ANN i određeni su koeficijenti determinacije - r^2 . Na odabir najbolje mreže uticala je i najviša vrednost parametara r^2 (R_s/α -ANN-MLP: 0,976 i t_R -ANN-MLP: 0,998) i Q^2 (R_s/α -ANN-MLP: 0,869 i t_R -ANN-MLP: 0,880) (Tabele 2. i 3. [194]). Iz navedenog se vidi da su formirani modeli prošli LOO-CV validaciju usled veoma dobrog predviđanja rezolucije, faktora selektivnosti i retencionih vremena, što je značajno s obzirom da je LOO-CV validacija ključni verifikacioni korak u toku ANN modeliranja.

Dobijene su mreže sledeće arhitekture: 4-4-6-4 (R_s/α -ANN-MLP) i 4-4-6-6 (t_R -ANN-MLP) Drugi (4) i treći (6) sloj su skriveni slojevi čiji je optimalan broj neurona definisan prilikom treniranja mreže (Slike 37. i 38. [194]).

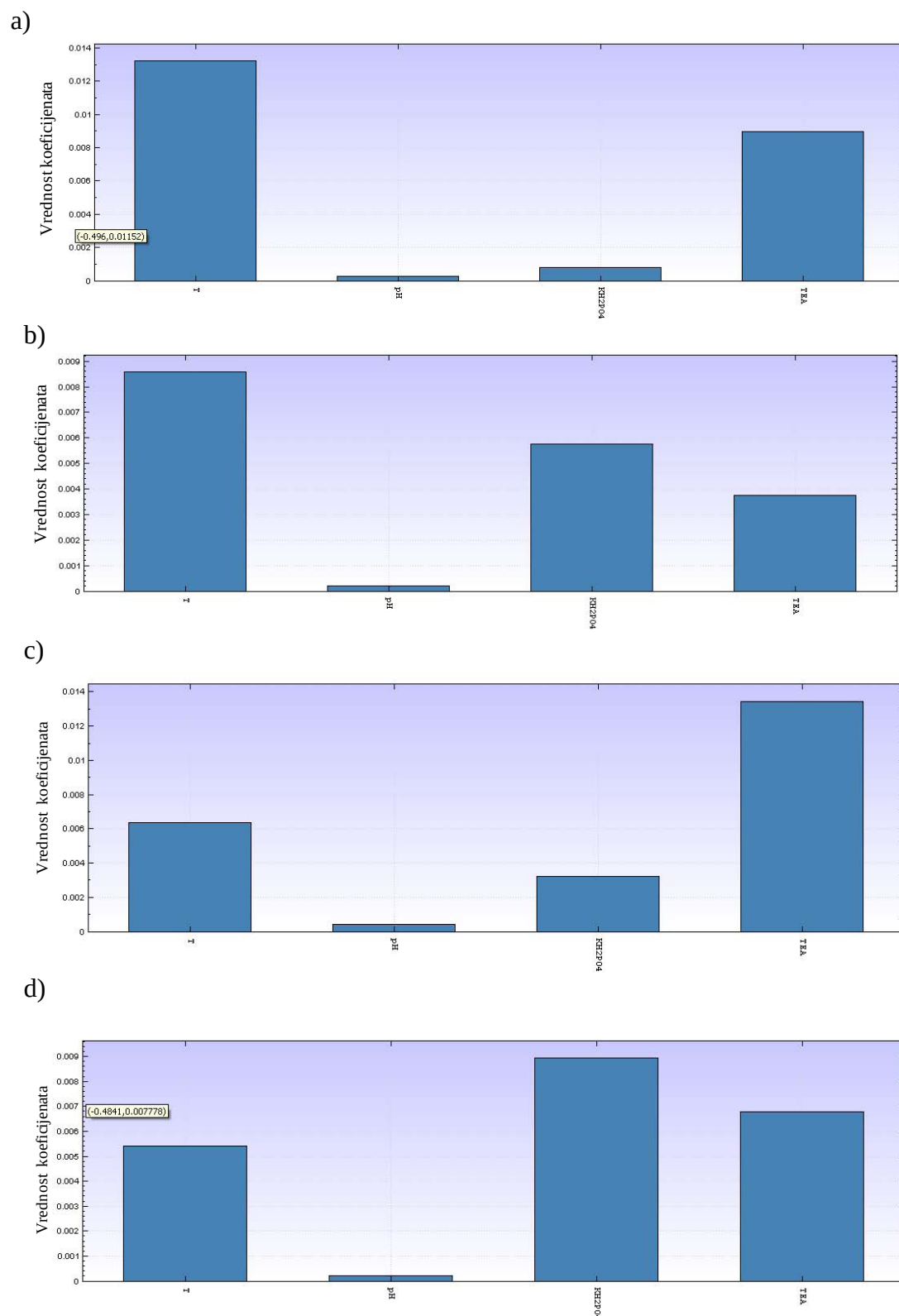


Slika 37. Arhitektura veštačke neuronske mreže za R_s/α -ANN-MLP model i odgovarajući grafik greške treniranja



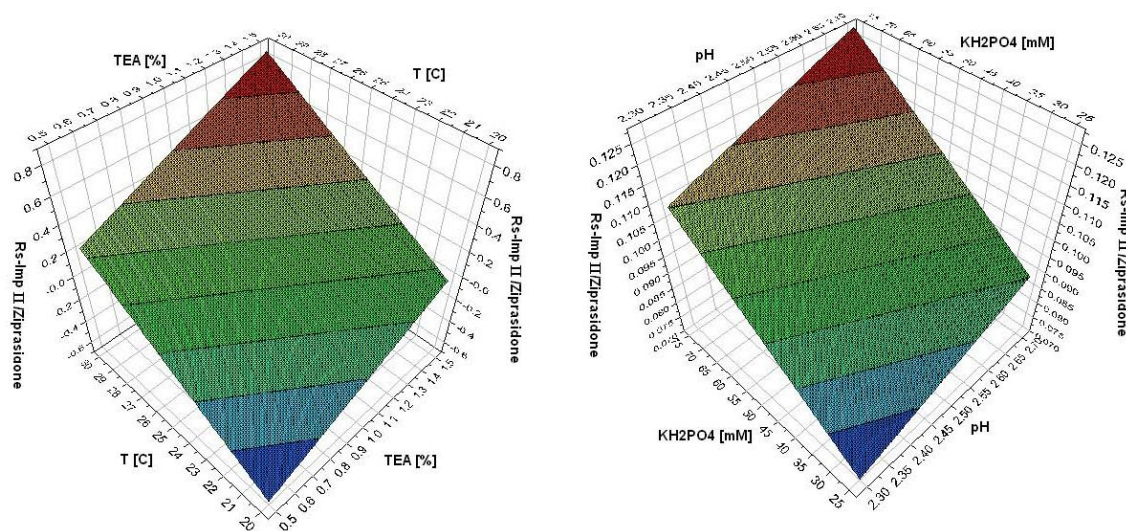
Slika 38. Arhitektura veštačke neuronske mreže za t_R -MLP-ANN modeli i odgovarajući grafik greške treniranja

Analizom osetljivosti izvršena je procena uticaja faktora na retenciono ponašanje kritičnih parova. Na osnovu formiranog R_s/α -ANN-MLP modela utvrđeno je da na vrednosti R_s para nečistoća II i ziprasidon najviše utiču temperatura i koncentracija TEA (Slika 39a.), dok je uticaj temperature i koncentracije KH_2PO_4 najveći na α (Slika 39b.). Na vrednost R_s ziprasidona i nečistoće III, najveći uticaj je imala temperatura stacionarne faze i koncentracija TEA (Slika 39c.), a uticaj koncentracija TEA i KH_2PO_4 je bio značajniji za α (Slika 39d.).

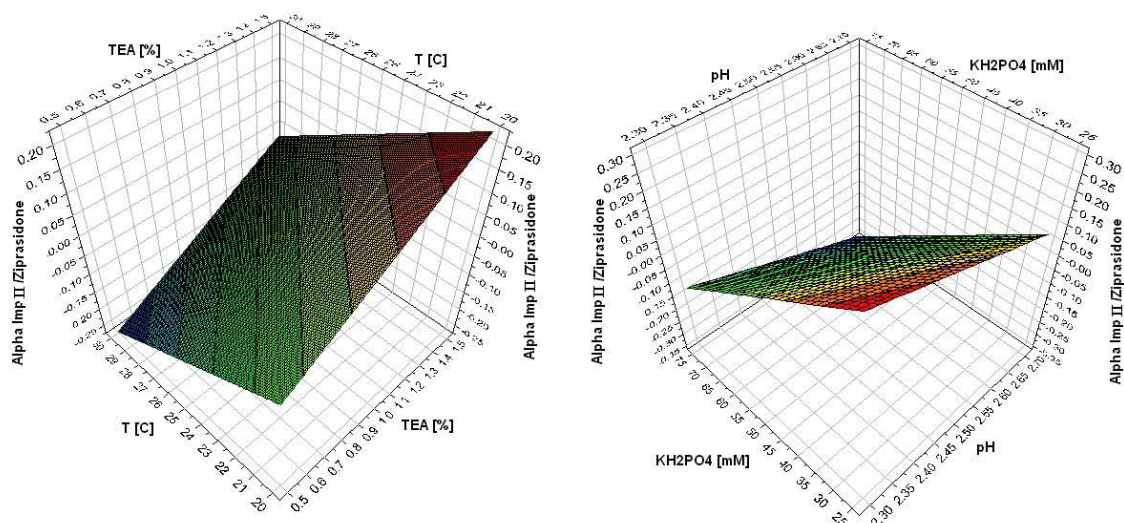


Slika 39. Grafici intenziteta uticaja T, pH, conc KH_2PO_4 , TEA na: a) Rs između nečistoće II i ziprasidona; b) α za nečistoću II i ziprasidon; c) Rs između ziprasidona i nečistoće III, d) α za ziprasidon i nečistoću III

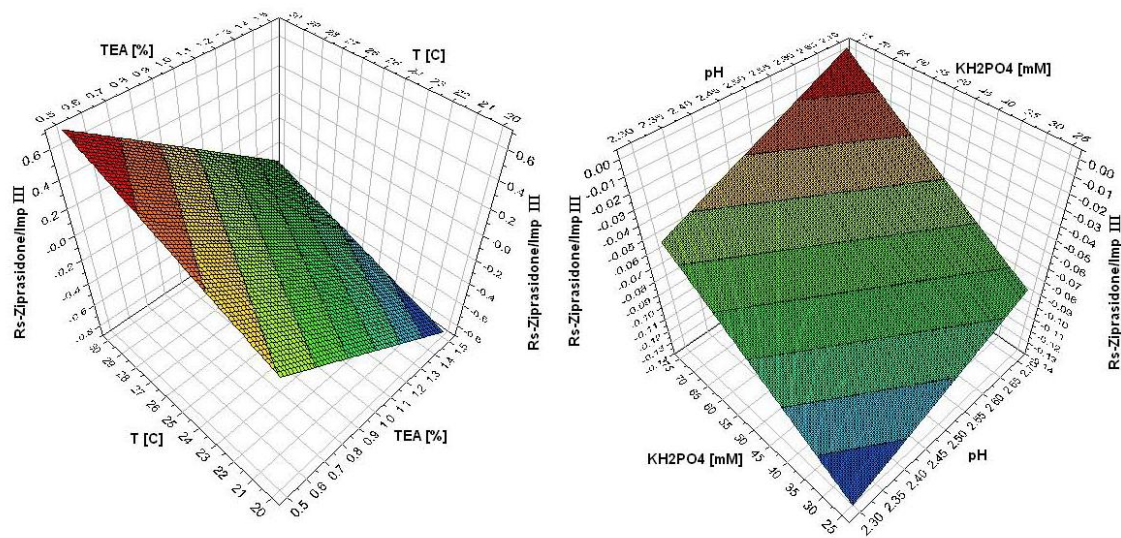
Da bi se detaljno ispitao uticaj svih eksperimentalnih faktora na odgovore sistema i definisale optimalne vrednosti ispitivanih uslova, primenjena je metoda površine odgovora. Zavisnost R_s i α , od dva faktora prikazana je 3-D grafikonima (Slike 40-43.). Iz dobijenih površina odgovora prikazanih na Slici 40. [194], povećanjem vrednosti svih faktora (T , %TEA, pH, koncentracija KH_2PO_4) dolazi do povećanja R_s kritičnog para nečistoća II/ziprasidon, dok su najveće vrednosti za α dobijene pri najnižim vrednostima temperature, pH i koncentracije KH_2PO_4 i pri najvišim vrednostima koncentracije TEA (Slika 41.). Na osnovu 3D-grafikona na Slici 42. evidentno je da povećanje R_s između ziprasidona i nečistoće III nastaje usled povećane vrednosti temperature stacionarne faze, pH i koncentracije KH_2PO_4 uz istovremeno smanjenje vrednosti koncentracije TEA. Takođe, pri višim vrednostima koncentracija TEA i KH_2PO_4 i temperature veća je i vrednost α za ovaj kritičan par, dok promena pH vrednosti nema uticaja na ovaj odgovor sistema (Slika 43. [194]).



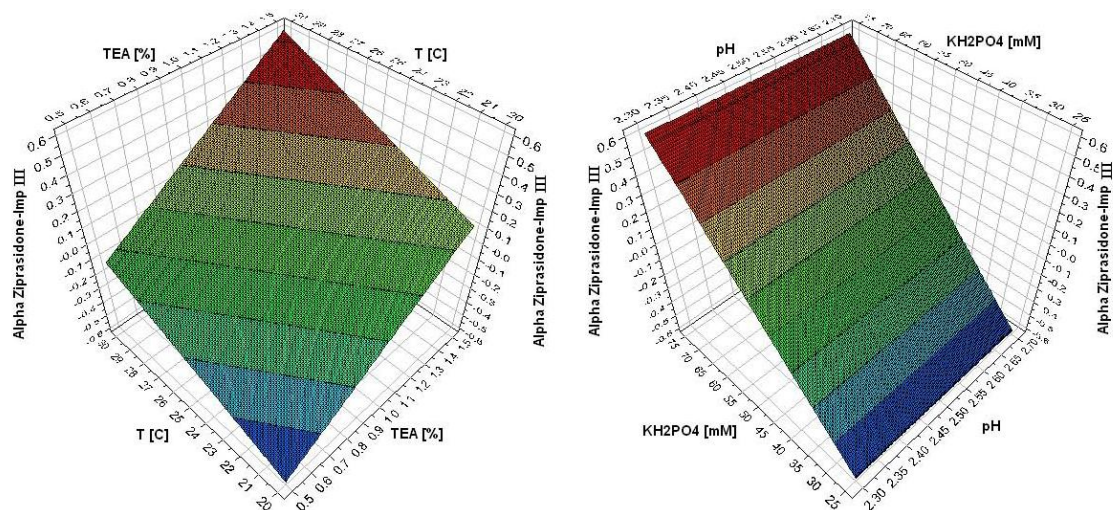
Slika 40. 3-D grafik: $f(R_s \text{ Imp II} - \text{Zipr}) = f(T, \% \text{TEA})$ (levo) i
 $f(R_s \text{ Imp II} - \text{Zipr}) = f(\text{pH}, \text{koncentracija } \text{KH}_2\text{PO}_4)$ (desno)



Slika 41. 3-D grafik: $f(\alpha \text{ Imp II} - \text{Zipr}) = f(T, \% \text{TEA})$ (levo) i
 $f(\alpha \text{ Imp II} - \text{Zipr}) = f(\text{pH}, \text{koncentracija KH}_2\text{PO}_4)$ (desno)



Slika 42. 3-D grafik: $f(\text{Rs Zipr-Imp III}) = f(T, \% \text{TEA})$ (levo) i
 $f(\text{Rs Zipr-Imp III}) = f(\text{pH}, \text{koncentracija KH}_2\text{PO}_4)$ (desno)



Slika 43. 3–D grafik: $f(\alpha \text{ Zipr-Imp III}) = f(T, \% \text{TEA})$ (levo) i $f(\alpha \text{ Zipr-Imp III}) = f(\text{pH}, \text{koncentracija } \text{KH}_2\text{PO}_4)$ (desno)

Dobijeni 3–D grafikoni potvrđuju rezultate dobijene analizom osjetljivosti i daju mogućnost vizuelne procene retencionog ponašanja supstanci. Dobijeni rezultati analize osjetljivosti i uticaji na odgovore sistema sumirani su u Tabeli 4. gde navedene oznake označavaju: „+” - porast, „-” - smanjenje i „0” - nema promena u vrednostima odgovora sistema (R_s i α). Eksperimentalni uslovi sa najjačim uticajem na hromatografske parametre su zatamljeni.

Tabela 4. Uticaji odabranih faktora na odgovore sistema

Hromatografski Parametri	Temperatura [°C]	pH	KH_2PO_4 [mM]	TEA [%]
$R_s/\text{Imp II-Ziprasidon}$	+	+	+	+
$\alpha/\text{Imp II-Ziprasidon}$	-	-	-	+
$R_s/\text{Ziprasidon-Imp III}$	+	+	+	-
$\alpha/\text{Ziprasidon-Imp III}$	+	0	+	+

Na osnovu analize svih rezultata koje su dala dva modela veštačkih neuronskih mreža (R_s/α -ANN-MLP i t_R -ANN-MLP) i dobijenih površina odgovora pokazalo se da bi optimalni sastav mobilne faze za razdvajanje ispitivanih jedinjenja trebalo da bude: pufer: rastvor 50 mM KH_2PO_4 uz dodatak 10mL/L TEA (1% TEA), pH=2,5 podešen ortofosforom kiselinom i temperatura stacionarne faze 25 °C (Tabela 5. [194]).

Da bi se smanjio broj eksperimenata, odlučeno da se iskoriste dobre prediktivne sposobnosti modela Rs/ α -ANN-MLP za predviđanje hromatografskih parametara (Rs/Imp II-Zipr, α -Imp II-Zipr, Rs/Zipr-Imp III, α -Zipr-Imp III) pod hipotetičkim eksperimentalnim uslovima radi podešavanja najboljih eksperimentalnih uslova za efikasno razdvajanje kritičnih parova (Test-Exp od 1 do 6, Tabela 5.). Hromatografski parametri sa većim vrednostima u odnosu na navedene uslove (Exp 2) su zatamljeni. Poređenjem dobijenih rezultata predviđanja ovog modela pokazalo se da nijedan od novo predloženih eksperimentalnih uslova nije doprineo efikasnijem razdvajanju ziprasidona od nečistoće II i III.

Tabela 5. Predviđanje hromatografskih parametara pod hipotetičkim eksperimentalnim uslovima pomoću Rs/ α - ANN-MLP modela

Odabrani Exp	Temperatura [°C]	pH	KH ₂ PO ₄ [mM]	TEA [%]	Rs/Imp II-Zipr	α -Imp II-Zipr	Rs/Zipr-Imp III	α -Zipr-Imp III
Exp 2	25	2,5	50	1	1,55	3,00	8,12	1,08
Predviđanje No,	Temperatura [°C]	pH	KH ₂ PO ₄ [mM]	TEA [%]	Predviđena Rs/Imp II-Zipr	Predviđena α -Imp II-Zipr	Predviđena Rs/Zipr-Imp III	Predviđena α -Zipr-Imp III
Test-Exp-1	22,5	2,5	50	1	1,41795	2,99381	7,91211	1,09551
Test-Exp-2	27,5	2,5	50	1	1,16804	2,93915	8,34923	1,10613
Test-Exp-3	25	2,5	37,5	1	1,54523	3,07127	8,05400	1,08100
Test-Exp-4	25	2,5	62,5	1	1,56104	2,97903	8,09738	1,10807
Test-Exp-5	25	2,5	50	0,75	1,42038	2,95943	8,44701	1,09445
Test-Exp-6	25	2,5	50	1,25	1,60848	3,02360	7,72365	1,11067

Na kraju, analizom svih rezultata nastalih primenom različitih matematičkih metoda, PLS i ANN i površina odgovora, kojima je ispitivano retenciono ponašanje ziprasidona i njegovih nečistoća, a posebno kritičnih parova, pokazano je sledeće:

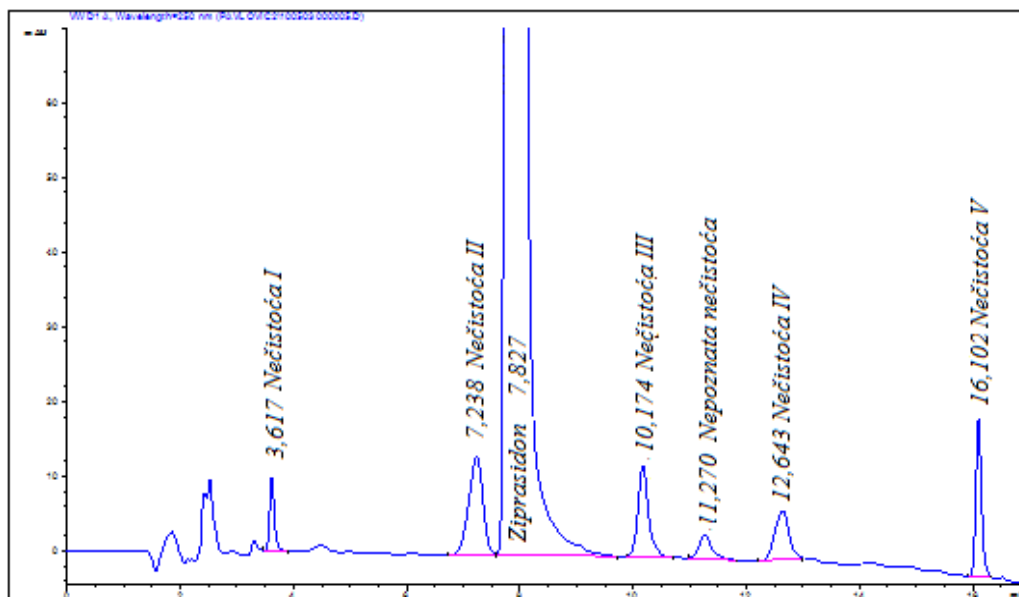
- temperatura i koncentracija trietanolamina su se i u linearnom (PLS) i nelinearnom (ANN) modelovanju izdvojile kao promenljive sa najvećim uticajem na rezoluciju kritičnih parova, a kod ANN koncentracija KH_2PO_4 je imala najveći uticaj na faktore selektivnosti;
- fino podešavanje pH vrednosti u uskom opsegu ni u jednom modelu nije pokazalo značajan uticaj na retenciju ispitivanih jedinjenja, tako da se može zaključiti da je u opsegu od 2,3 do 2,7 metoda robusna

Na osnovu svega navedenog utvrđeno je da je optimalni sastav mobilne faze: pufer: rastvor 50 mM KH_2PO_4 uz dodatak 10mL/L TEA (1% TEA), pH=2,5 podešen ortofosforom kiselinom i acetonitril, i temperatura stacionarne faze 25 °C. Izbor optimalne vrednosti protoka ($1,5 \text{ mL min}^{-1}$) je izvršen na osnovu već izvedenih eksperimenata. Zbog porasta pritiska u sistemu nije korišćen veći protok.

4.1.2.2. Određivanje selektivnosti RP stacionarnih faza u odnosu na ziprasidon i njegove nečistoće

Druga faza optimizacije podrazumevala je ispitivanje selektivnosti RP stacionarnih faza sličnih karakteristika pri dobijenim optimalnim eksperimentalnim uslovima (temperatura stacionarne faze: 25 °C; pH: 2,5; koncentracija TEA: 1% i KH_2PO_4 : 50mM) u odnosu na ziprasidon i njegove nečistoće. Prilikom ispitivanja sa razvijenom HPLC metodom je detektovana jedna *nepoznata nečistoća* (t_R : 11,270 min) u rastvoru smeše za optimizaciju metode - R_{sm} (v. poglavlje 3.2.1.) koji je čuvan 24h na sobnoj temperaturi (Slika 44.). Retenciono ponašanje ove nečistoće takođe je ispitivano.

Na većini ispitivanih stacionarnih faza nije postignuto razdvajanje kritičnog para ziprasidon/nečistoća II. Takođe, na nekim stacionarnim fazama nisu razdvojeni parovi nečistoća IV/*nepoznata nečistoća* (Supelcosil LC 8DB, ODS Hypersil) i nečistoća IV/V (v. poglavlje 4.1.1.).



Slika 44. Hromatogram rastvora R_{sm} nakon 24 h čuvanja na sobnoj temperaturi na koloni Waters Spherisorb® ODS 1 ($4.6 \times 250 \text{ mm}$, $5.0 \mu\text{m}$)

Eksperimentalno dobijeni hromatografski parametri (broj teoretskih platoa- N , faktor simetrije pika - SF , rezolucija - R_s i faktor selektivnosti - α između jedinjenja koja se blizu eluiraju, *tejl*ing faktor jedinjenja najveće koncentracije - T -Zip USP, faktor retencije poslednje nečistoće - k' -imp V) na 20 RP stacionarnih faza analizirani su primenom analiza osnovne komponente (PCA) i hijerarhijskog grupisanja (AHC). Vrednosti hromatografskih parametara prikazane su u Prilogu A (Tabele 1A. - 4A.). Ovom uporednom studijom određene su stacionarne faze posebno selektivne za efikasno razdvajanje ziprasidona i strukturno sličnih jedinjenja, pri odabranim eksperimentalnim uslovima.

Podaci su predstavljeni u obliku matrice sa N redova (analizirani sistemi: RP stacionarne faze) i K kolona (varijable: eksperimentalno dobijeni hromatografski parametri). Dobijena je matrica X (20×22), sa 20 redova (20 RP stacionarnih faza) i 22 kolone (22 hromatografska parametra) za AHC, odnosno matrica X (20×24) sa 24 kolone (24 hromatografska parametra) za PCA analizu (Tabele 6. i 7.) [194].

Tabela 6. Specifikacije ispitivanih RP stacionarnih faza

N°	Naziv stacionarne faze	<i>End-capped</i>	Punjenje stacionarne faze	Veličina čestica [µm]	Proizvođač/dobavljač
1	Zorbax SBC8	-	C8-alkyl-silica B	5	Agilent technologies
2	Discovery HSC18	+	C18-alkyl-silica B	5	Supelco
3	Zorbax Eclipse XDB C18	2+	C18-alkyl-silica B	5	Agilent technologies
4	Zorbax SB C18	-	C18-alkyl-silica B	5	Agilent technologies
5	Zorbax Extend C18	2+	C18-alkyl-silica B	5	Agilent technologies
6	Xterra RPC18	+	Embedded Polar Group	5	Waters
7	*Chromolith RP-18e 100-4.6	+	C18-alkyl-silica B	/	Merck
8	PurospherStar RP18	+	C18-alkyl-silica B	5	Merck
9	Spherisorb ODS1	-	C18-alkyl-silica A	5	Waters
10	*BDS Hypersil C18	+	C18-alkyl-silica A	3	Thermo
11	**Supelcosil LC 8DB	+	C8-alkyl-silica A	5	Supelco
12	**Zorbax Eclipse XDB C8	2+	C8-alkyl-silica B	5	Agilent technologies
13	Spherisorb ODS2	+	C18-alkyl-silica A	5	Waters
14	**Zorbax SB Phenyl	-	Phenylpropyl	5	Agilent technologies
15	Luna C18 (2)	+	C18-alkyl-silica B	5	Phenomenex
16	**Bonus –RP Zorbax	3+	Embedded Polar Group	5	Agilent technologies
17	**Zorbax SB CN	-	Cyanopropyl	5	Agilent technologies
18	Nucleosil 100-5 C18	+	Embedded Polar Group	5	Machery Nagel
19	**ODS Hypersil	+	C18-alkyl-silica A	5	Thermo
20	**Symmetry Shield RP18	+	Embedded Polar Group	5	Waters

Unutrašnji prečnik stacionarne faze - 4.6 mm, dužina stacionarne faze *100 mm, **150 mm, ostale 250 mm.

Tabela 7. Hromatografski parametri korišćeni za PCA i AHC analizu

No	Hromatografski parametri*
1	SF-Imp II
2	SF-Zip
3	SF-Imp III
4	SF-Unknown Imp
5	SF-Imp IV
6	SF-Imp V
7	T-Zip USP
8	Rs-Zip/Imp III
9	Rs- Imp III/ Unknown Imp
10	Rs- Unknown Imp/Imp IV
11	Rs-Imp IV/ Imp V
12	α -Zip/Imp III
13	α - Imp III/Unknown Imp
14	α - Unknown Imp/Imp IV
15	α - Imp IV/Imp V
16	k'-Imp V
17	N-Imp II
18	N-Zip
19	N-Imp III
20	N- Unknown imp
21	N-Imp IV
22	N-Imp V

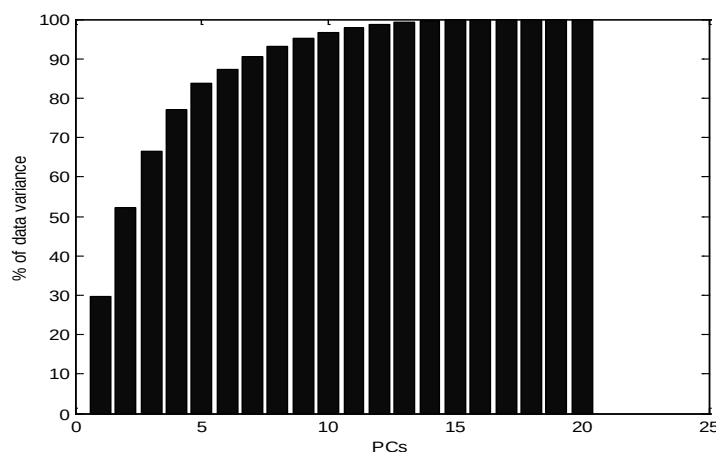
*Dodatni hromatografski parametri korišćeni samo u PCA analizi: Rs-Imp II/Zip i α -Imp II/Zip

Imp – nečistoća, Unknown Imp – nepoznata nečistoća

Obzirom da se opsezi numeričkih vrednosti hromatografskih parametara značajno razlikuju urađeno je skaliranje podataka. Varijable sa velikim opsegom pokazuju veliku varijansu pa one imaju mnogo veći uticaj na modelovanje, i obrnuto [98]. Podaci su standardizovani prema jednačinama (18), (19) i (20) navedenim u poglavlju 3.6.2. Vrednosti $\bar{x}_j, s_j$ u jednačini (18) su srednja vrednost hromatografskog parametra j na svim stacionarnim fazama, i njegova standardna devijacija, a m u jednačinama (19) i (20) označava broj analiziranih sistema (20 RP stacionarnih faza).

4.1.2.2.1. Analiza osnovnih komponenti (PCA) pri određivanju selektivnosti RP stacionarnih faza u odnosu na ziprasidon i njegove nečistoće

PCA model sa pet značajnih osnovnih komponenti (PC) je opisivao 81,6% varijanse podataka (Slika 45.). PC1, PC2, PC3, PC4 i PC5 objašnjavaju 27,6%; 20,8%; 13,7%; 11,1% i 8,4% ukupne varijanse (varijabilnosti podataka) (Slike 46-49.). Dvodimenzionalni grafikon rezultata (*engl. score plots*) PC1 (27,6%) naspram PC2 (20,8%) objašnjava 48,4% od ukupne varijanse originalnih varijabli i najbolje prikazuje glavne razlike između svih 20 RP stacionarnih faza (Slika 46a). RP stacionarne faze koje su blizu jedna drugoj imaju slične karakteristike u pogledu ispitivanih osobina tj. hromatografskih parametara za ispitivane supstance, tako da su se PCA analizom izdvojile 4 grupe stacionarnih faza. Grafikonima PCA koeficijenata varijabli (*engl. loading plots*) je prikazano koji hromatografski parametri imaju najveći uticaj na model i kako su međusobno povezani (Slika 46b). Hromatografski parametri više udaljeni od centra grafikona su imali veći uticaj na izdvajanje RP stacionarnih faza sličnih karakteristika. Rezolucija i faktor selektivnosti su odabrani kao najznačajniji hromatografski parametri za izbor stacionarne faze.



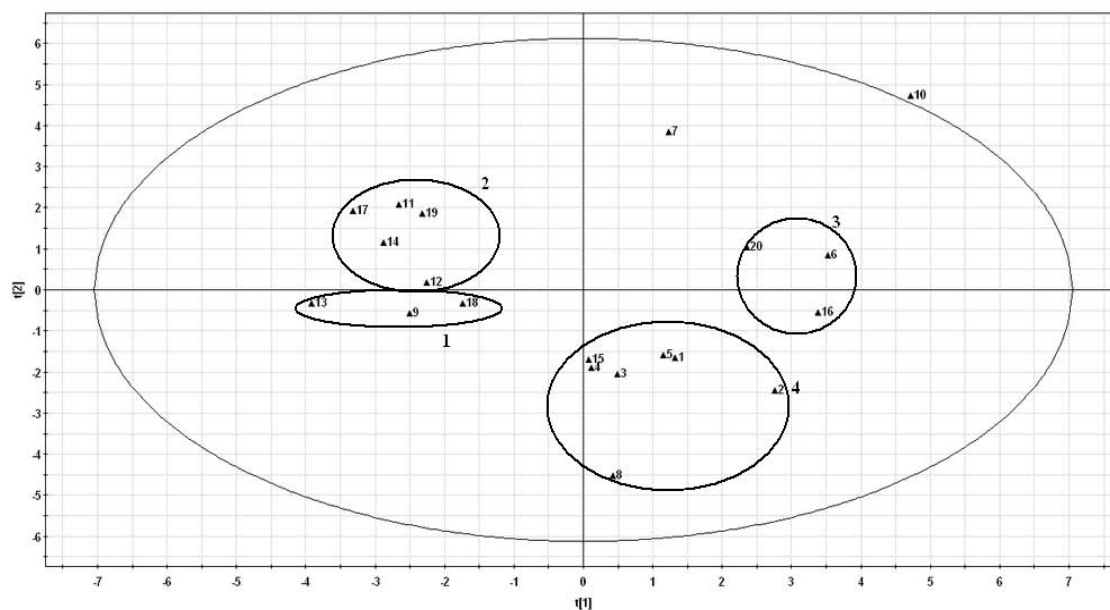
Slika 45. Procenat varijanse podataka opisan uzastopnim glavnim komponentama (PCs)

Prva glavna komponenta PC1 opisuje razliku između sledećih RP stacionarnih faza: Spherisorb ODS1, Supelclosil LC-8DB, Zorbax Eclipse XDBC8, Spherisorb ODS2, Zorbax SB Phenyl, Zorbax SB CN i ODS Hypersil, i ostalih trinaest stacionarnih faza s obzirom na visoke vrednosti: *tejlina* pika ziprasidona (T-Zip USP), *Rs* para nečistoća IV i V (*Rs*-Imp IV/Imp V) i *α* parova nečistoće III i *nepoznate nečistoće* i

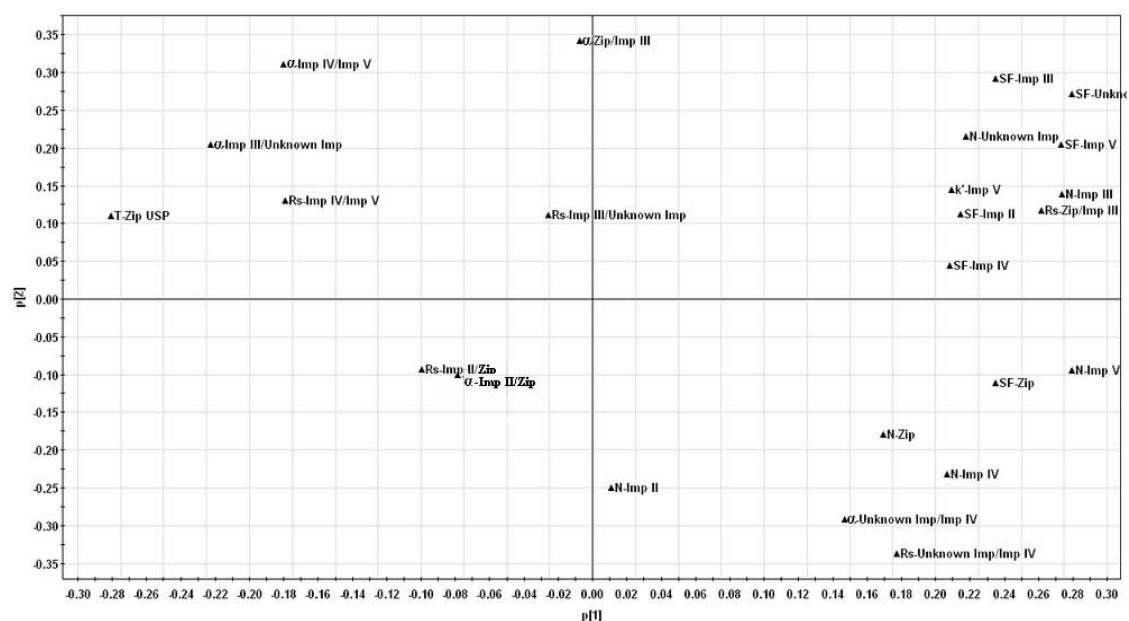
nečistoća IV i V (α -Imp III/Unknown Imp i α -Imp IV/Imp V) (Slika 46.). Najveću vrednost α za ova dva para su pokazale stacionarne faze Spherisorb ODS2 i Zorbax SB CN.

PC2 se odnosi na razliku između RP stacionarnih faza Chromolith RP-18e 100-4,6 i BDS Hypersil i stacionarne faze PurospherStar RP 18. Naime, prve dve su pokazale relativno visoke vrednosti α za nečistoće IV i V (α -Imp IV/Imp V) i najveću vrednost faktora simetrije za nečistoću III i *nepoznatu nečistoću* (SF-Imp III, SF-Unknown Imp). Dodatno, Chromolith RP-18e 100-4,6 stacionarnu fazu karakteriše i najveća vrednost α za par ziprasidon i nečistoća III (α -Zip/Imp III). Za stacionarnu fazu PurospherStar RP 18 zapažene su visoke vrednosti: α i R_s za *nepoznatu nečistoću* i nečistoću IV (α -Unknown Imp/Imp IV, R_s -Unknown Imp/Imp IV) i broja teoretskih platoa za nečistoću II (N-Imp II) (Slika 46.). Takođe, duž PC2 komponente se može uočiti razlika između RP stacionarnih faza Xterra RPC18, Symetry Shield RP18, Zorbax SB Phenyl, Zorbax SB CN, Superclosil LC-8DB, ODS Hypersil, Chromolith RP-18e 100-4,6 i BDS Hypersil i preostalih dvanaest stacionarnih faza u odnosu na vrednosti α za ziprasidon i nečistoću III i nečistoće IV i V (α -Zip/Imp III i α -Imp IV/Imp V (Slika 46.)).

a)

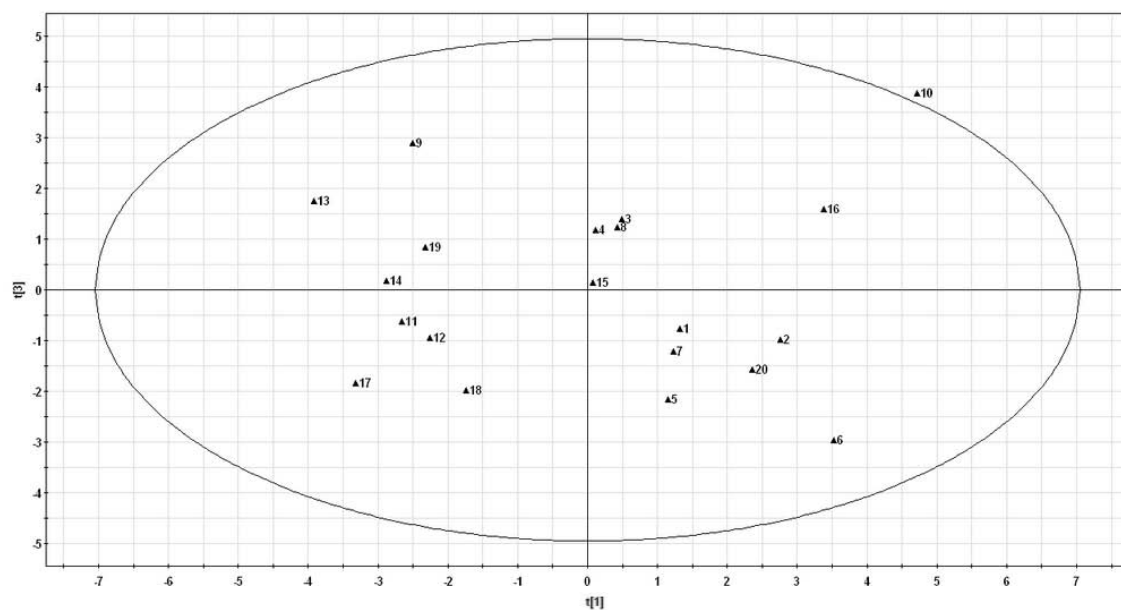


b)

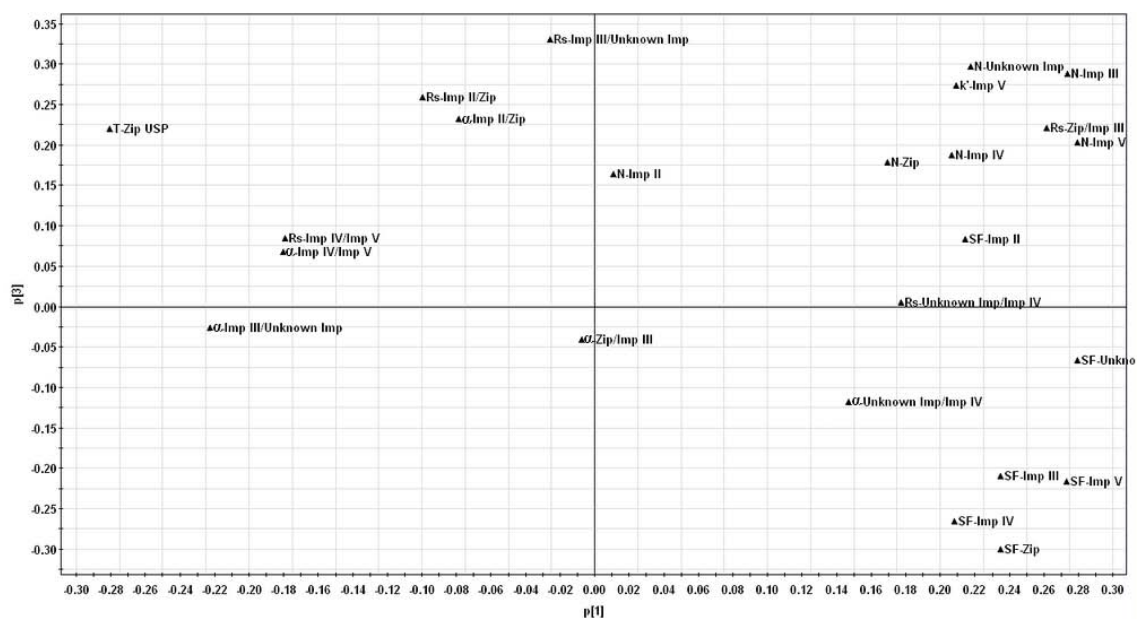


Slika 46. a) Grafikon rezultata (*engl. score plot*) b) Grafikon PCA koeficijena variabli (*engl. loading plot*) kao rezultat PCA analize hromatografskih parametara za PC1 i PC2

a)

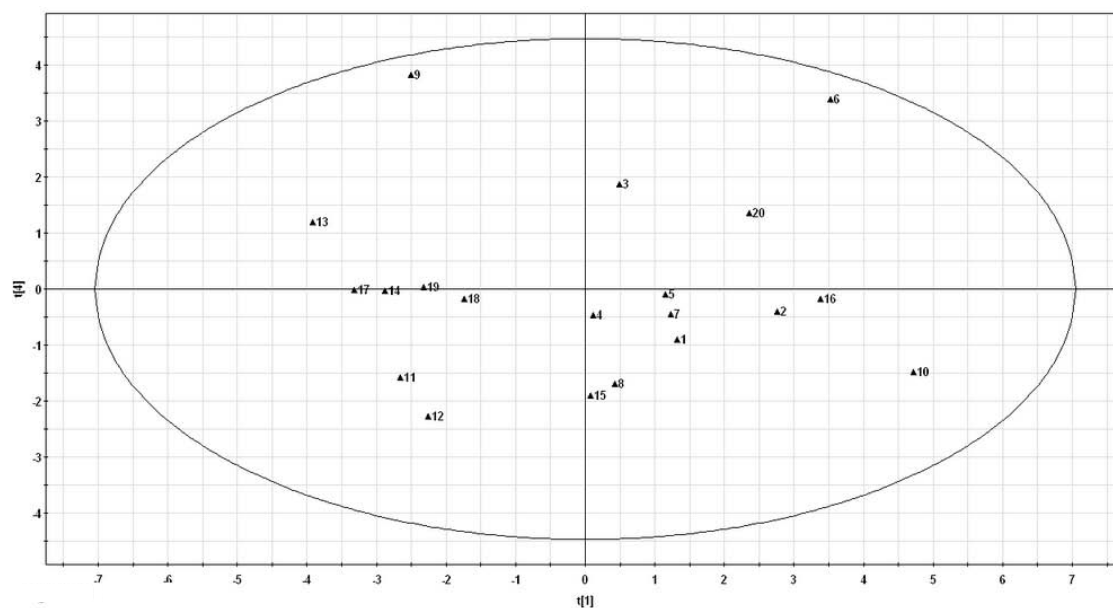


b)

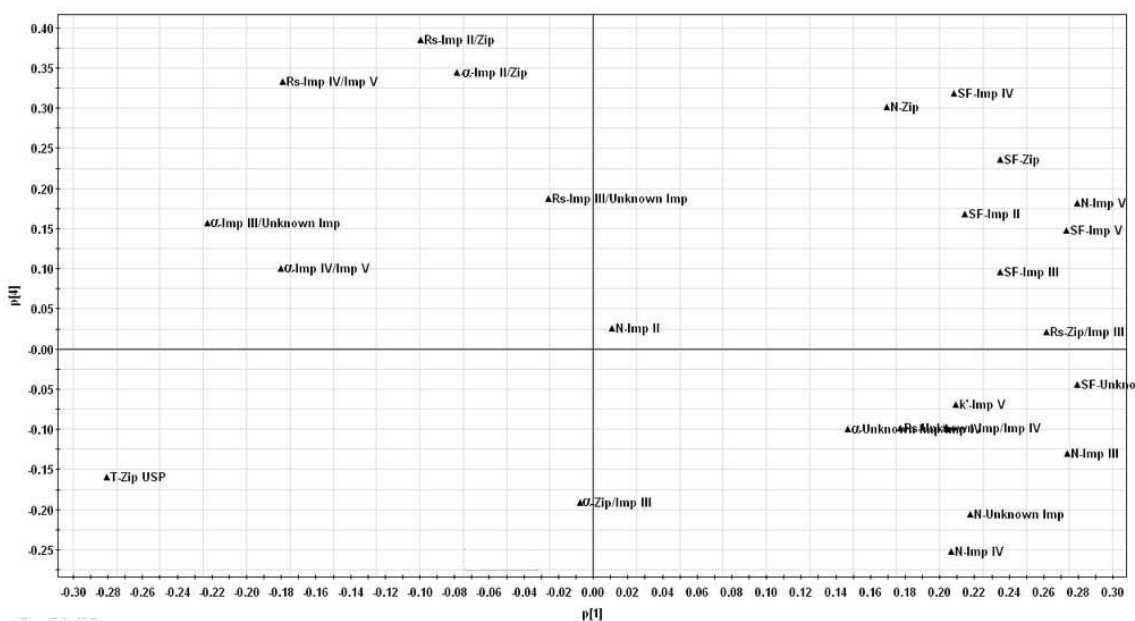


Slika 47. a) Grafikon rezultata (*engl. score plot*), b) Grafikon PCA koeficijenata varijabli (*engl. loading plot*) kao rezultat PCA analize hromatografskih parametara za PC3 i PC1

a)

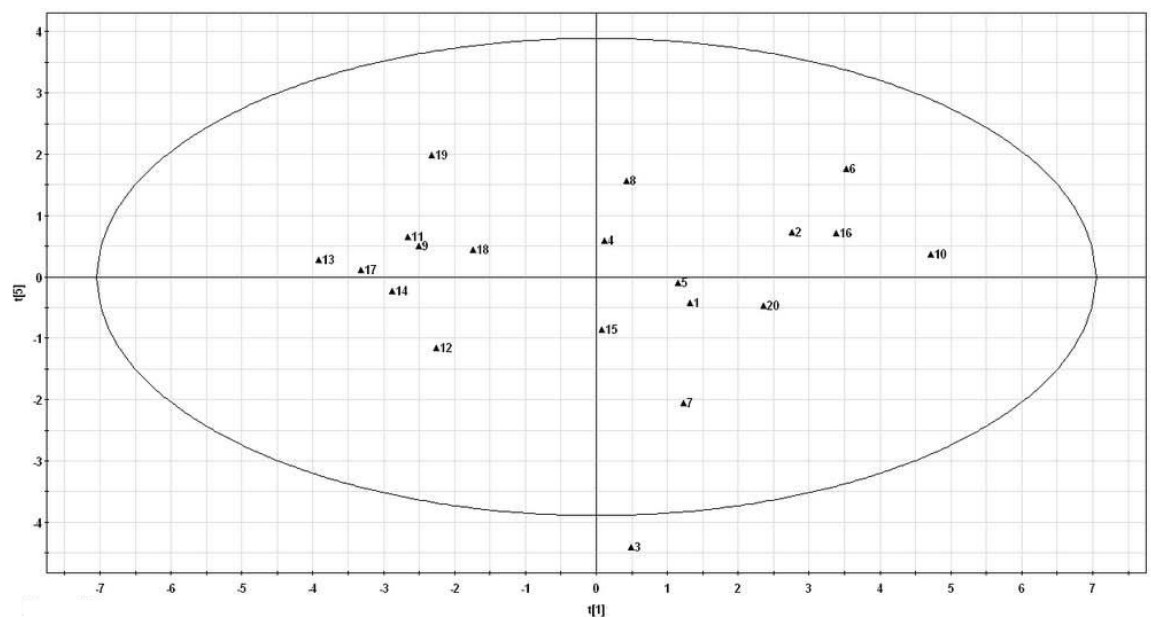


b)

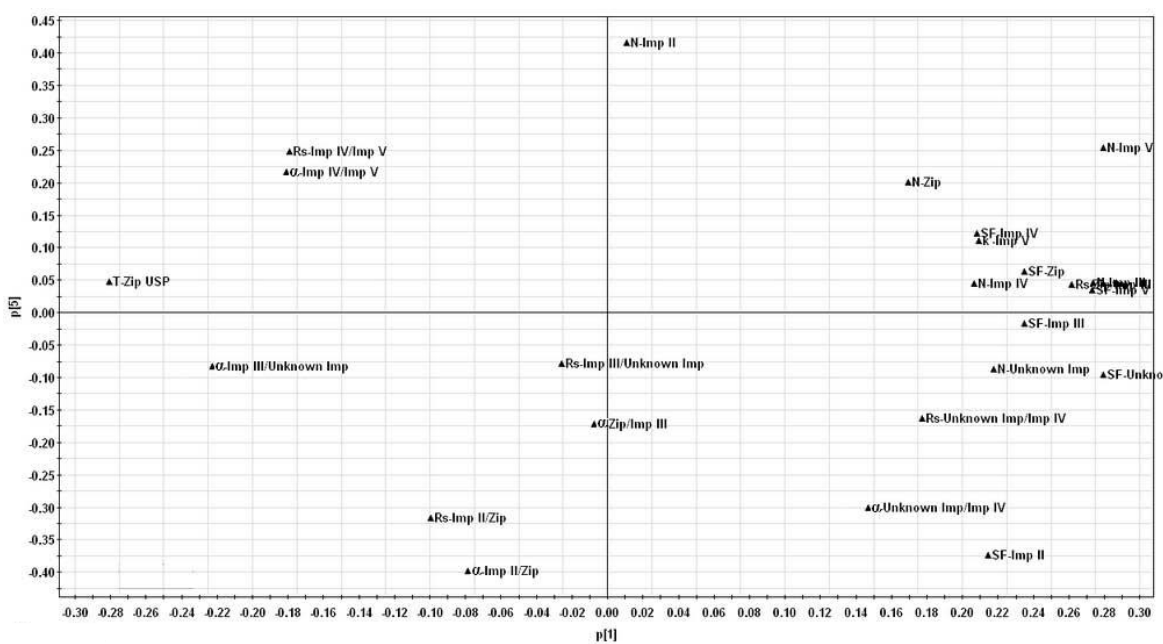


Slika 48. a) Grafikon rezultata (*engl. score plot*), b) Grafikon PCA koeficijenata varijabli (*engl. loading plot*) kao rezultat PCA analize hromatografskih parametara za PC4 i PC1

a)



b)



Slika 49. a) Grafikon rezultata (*engl. score plot*), b) Grafikon PCA koeficijenata variabli (*engl. loading plot*) kao rezultat PCA analize hromatografskih parametara za PC5 i PC1

Na osnovu grafikona rezultata i PCA koeficijenata varijabli (Slika 46.) izvedeni su glavni zaključci i odabrane su optimalne RP stacionarne faze za efikasno razdvajanje ziprasidona i njegovih šest nečistoća:

- Na desnoj strani grafikona rezultata (grupe 3 i 4, slika 46a.) su smeštene stacionarne faze sa višim vrednostima: broja teoretskih platoa za nečistoće III i V i *nepoznatu nečistoću* (N –Imp III, N-Imp V, N-Unknown Imp), faktora simetrije za sve nečistoće i sa nižim vrednostima za *tejljng* pika ziprasidona (T-Zip USP).
- Na levoj starni grafikona rezultata (grupe 1 i 2, Slika 46a.) su smeštene stacionarne faze sa višim vrednostima α za parove nečistoća III i *nepoznata nečistoća* i nečistoće IV i V (α -Imp III/Unknown Imp i α -Imp IV/Imp V), *tejljnga* pika ziprasidona (T-Zip USP) i Rs para nečistoća III i *nepoznata nečistoća* (Rs-Imp III/Unknown Imp).
- Na gornjoj strani grafikona rezultata (grupe 2 i 3, Slika 46a.) se nalaze stacionarne faze sa višim vrednostima: α za ziprasidon i nečistoću III i za nečistoće IV i V (α -Zip/Imp III i α -Imp IV/Imp V), faktora simetrije nečistoće III, V i *nepoznate nečistoće* (SF-Imp III, SF-Imp V, SF-Unknown Imp) i Rs između nečistoće III i *nepoznate nečistoće* (Rs-Imp III/Unknown Imp).
- Na donjoj strani grafikona rezultata (grupe 1 i 4, Slika 46a.) su stacionarne faze sa višim vrednostima α i Rs za nečistoću II i ziprasidon i za *nepoznatu nečistoću* i nečistoću IV (α -Imp II/Zip, Rs-Imp II/Zip, α -Unknown Imp/Imp IV, Rs-Unknown Imp/Imp IV).

PCA koeficijenti faktora selektivnosti na PC1 osi za sve parove pikova su negativni, dok su za par *nepoznata nečistoća*/nečistoća IV (α -Unknown Imp/Imp IV) pozitivni (Slika 46b.). Posledično, stacionarne faze koje su blizu nule ili negativnog dela ove ose imaju dobru selektivnost za razdvajanje svih ispitivanih jedinjenja. PCA koeficijenti faktora selektivnosti za parove pikova *nepoznata nečistoća* i nečistoća IV i nečistoća II i ziprasidon (α -Unknown Imp/Imp IV i α -Imp II/Zip) na PC2 ordinati su negativni, dok su za ostala tri para PCA koeficijenti faktora selektivnosti pozitivni (Slika 46b.). Stoga stacionarne faze koje se nalaze blizu nule na negativnoj strani ordinate imaju dobru selektivnost za razdvajanje svih ispitivanih supstanci. Zapažena je slična distribucija rezolucije na grafikonima PCA koeficijenata varijabli. Na osnovu analize svih rezultata, iz svega navedenog sledi da su stacionarne faze koje se nalaze u donjem levom kvadrantu grafikona rezultata - grupa 1 (Slika 46a.) kao što su Waters

Spherisorb® ODS 1 (4.6 mm × 250 mm, 5.0 µm), Waters Spherisorb® ODS 2 (4.6 mm × 250 mm, 5.0 µm), i Nucleosil® 100-5 C18 (4.6 mm × 250 mm, 5.0 µm) pogodne za razdvajanje svih ispitivanih supstanci.

4.1.2.2.2. Analiza hijerarhijskog grupisanja (HCA) pri određivanju selektivnosti RP stacionarnih faza u odnosu na ziprasidon i njegove nečistoće

Za modelovanje je odabrana aglomerativna analiza hijerarhijskog grupisanja (AHC). Podaci su organizovani u matricu kao i kod PCA analize, gde redove čini 20 RP stacionarnih faza (Tabela 6.), a kolone 22 hromatografska parametra (Tabela 7.). Rezultati su predstavljeni u vidu dva dendograma (Slika 50.). Za kriterijum grupisanja analiziranih sistema tj. varijabli odabran je *Ward-ov* (engl. *Ward linkage algorithm*) metod, dok je za meru procene stepena različitosti za odabrani metod grupisanja korišćena Euklidova funkcija. Dendogram na Slici 50a. Prikazuje tri odvojene grupe RP stacionarnih faza:

- Grupa A sadrži RP stacionarne faze N° 1-6, 8, 15, 16 i 20,
- Grupa B sadrži RP stacionarne faze N° 7 i 10,
- Grupa C sadrži RP stacionarne faze N° 9, 11-14 i 17-19.

Osim toga, glavne grupe imaju dodatne podgrupe (engl. *subclusters*). Grupa A sadrži sledeće dve podgrupe RP stacionarnih faza:

- Podgrupa A1– RP stacionarne faze N° 2, 5, 6, 16 i 20,
- Podgrupa A2– RP stacionarne faze N° 1, 3, 4, 8 i 15.

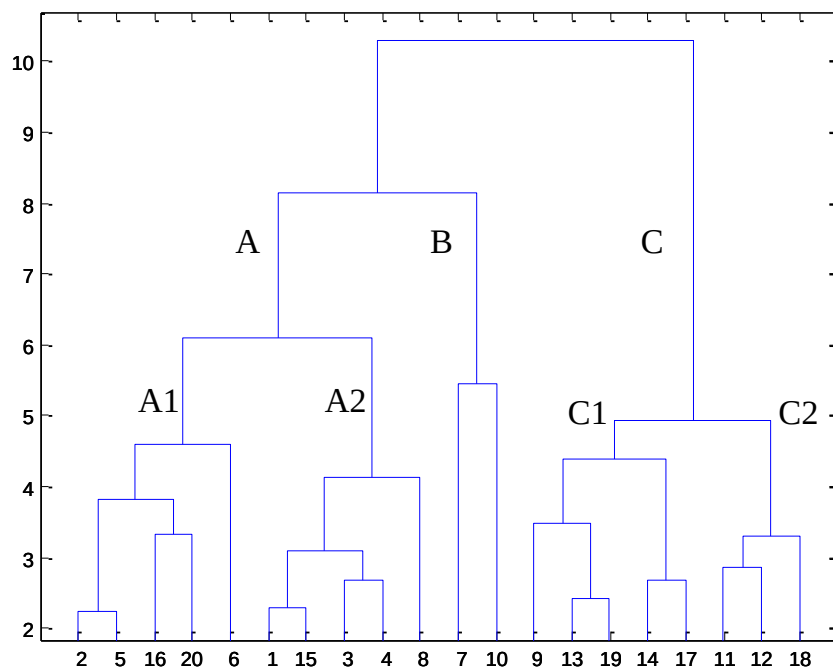
U grupi C izdvajaju se dve podgrupe:

- Podgrupa C1– RP stacionarne faze N° 9, 13, 14, 17 i 19,
- Podgrupa C2– RP stacionarne faze N° 11, 12 i 18.

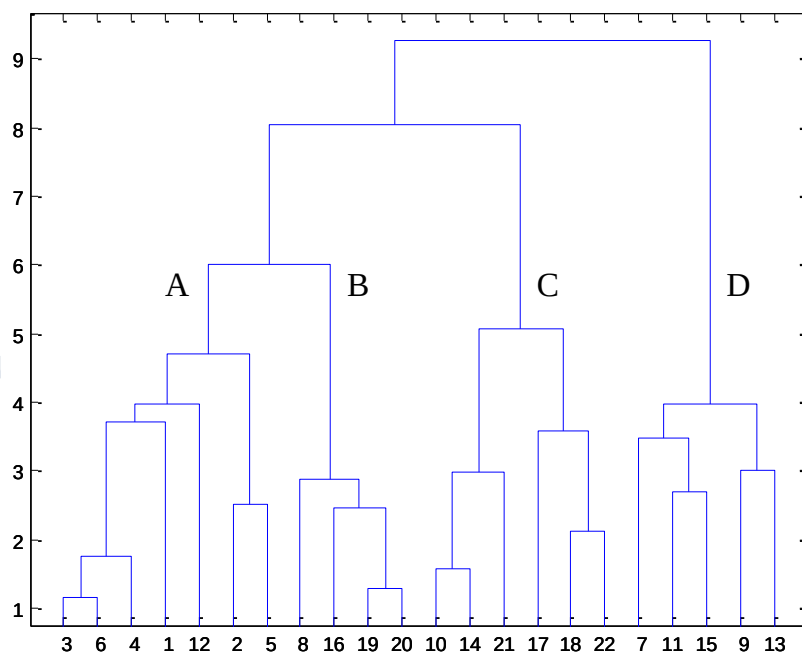
Dendogram koji je konstruisan za hromatografske parametre (Slika 50b.) pokazuje četiri glavne grupe (A, B, C i D):

- Grupa A– hromatografski parametri N° 1-6 i 12,
- Grupa B– hromatografski parametri N° 8, 16, 19 i 20,
- Grupa C– hromatografski parametri N° 10, 14, 17, 18, 21 i 22,
- Grupa D– hromatografski parametri N° 7, 9, 11, 13 i 15.

a)



b)

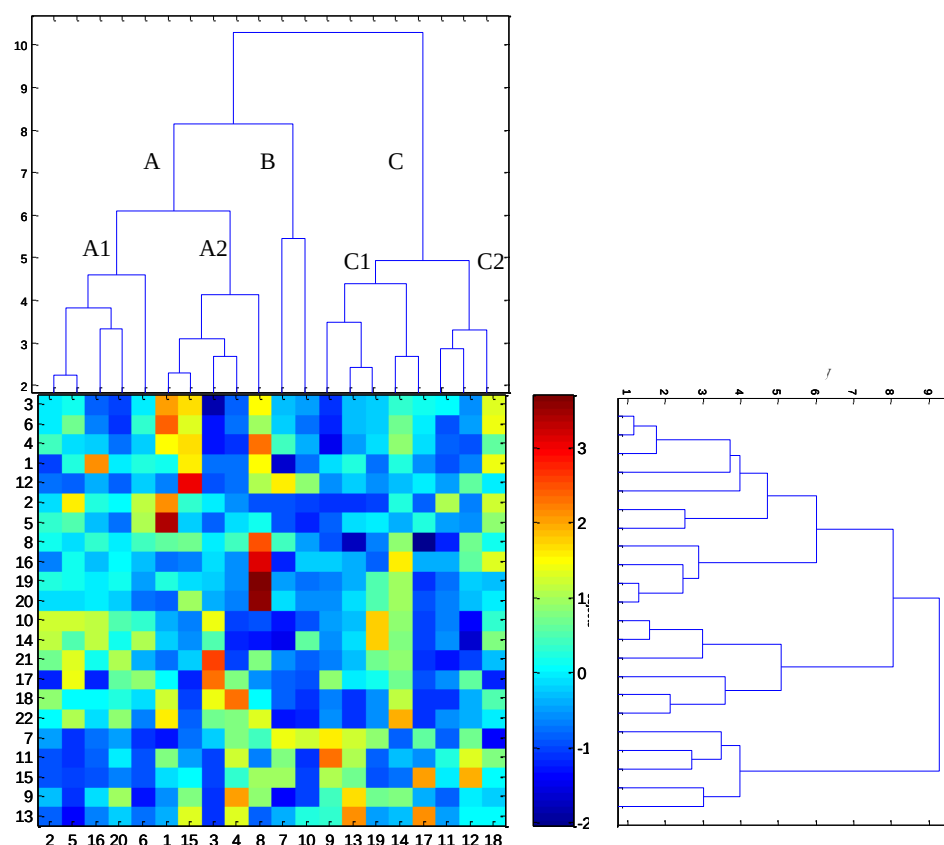


Slika 50. Dendrogrami: (a) analizirani sistemi (različite RP stacionarne faze) u funkcionalnom prostoru varijabli (hromatografski parametri) i (b) varijable (hromatografski parametri) u funkcionalnom prostoru 20 analiziranih sistema (različite RP stacionarne faze)

Rezultati AHC analize su bili u saglasnosti sa rezultatima PCA studije za svih 20 RP stacionarnih faza. Grupe 3 i 4 (Slika 46a.) iz PCA analize (stacionarne faze N° 1-6, 8, 15, 16 i 20) su veoma slične sa podgrupama A1 (stacionarne faze N° 2, 5, 6, 16 i 20) i A2 (stacionarne faze N° 1, 3, 4, 8 i 15) (Slika 50a.). Grupe 1 i 2 (Slika 46a.) nastale u PCA studiji (stacionarne faze N° 9, 11-14, 17-19), su veoma slične sa podgrupama C1 (stacionarne faze N° 9, 13, 14, 17 i 19) i C2 (stacionarne faze N° 11, 12 i 18) (Slika 50a.).

Optimalne RP stacionarne faze Waters Spherisorb[®] ODS 1 (4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm), Waters Spherisorb[®] ODS 2 (4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm), i Nucleosil[®] 100-5 C18 (4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm), (N° 9, 13, i 18), koje su odabrane PCA analizom (grupa 1, Slika 46a.), su smeštene u istoj grupi – C u AHC analizi (Slika 50a.).

Dendogram prikazuje strukturu podataka (npr. podgrupe analiziranih sistema), ali njime se ne mogu interpretirati dobijeni rezultati analize grupisanja u odnosu na originalne varijable (hromatografske parametre). Da bi se prikazao dobijeni model u odnosu na originalne varijable predložena je jednostavna metoda vizuelizacije. Ispitivani set podataka je organizovan u matricu **X** (20 x 22) na osnovu redosleda u dobijenim dendogramima (Slika 50.). Na osnovu *Ward*-ove metode povezivanja podaci su prikazani obojenom mapom kao dendogrami 20 RP stacionarnih faza u funkcionalnom prostoru 22 hromatografska parametra i hromatografskih parametara u funkcionalnom prostoru 20 RP stacionarnih faza (Slika 51.).



Slika 51. Dendrogrami (RP stacionarnih faza u prostoru hromatografskih parametara i hromatografski parametri u funkcionalnom prostoru 20 RP stacionarnih faza) i obojena mapa sa sortiranim podacima na osnovu Ward-ove metode grupisanja

Na osnovu analize rezultata AHC metode, oba dendograma odvojeno (Slika 50.) i obojene mape (Slika 51.), moglo se zaključiti sledeće:

- Stacionarne faze koje pripadaju grupi A karakteriše veća R_s , α za par *nepoznata nečistoća*/nečistoća IV (R_s -Unknown Imp/Imp IV, α -Unknown impurity/Imp IV), broj teoretskih platoa za ziprasidon i nečistoću V (N-Zip i N-Imp V), (parametri N° 10, 14, 18 i 22) i relativno niži *tejl*ing faktor ziprasidona, R_s i α za par nečistoća IV/V (T-Zip USP, R_s -Imp IV/Imp V i α -Imp IV/Imp V) (parametri N° 7, 11, i 15) u odnosu na ostale stacionarne faze.
- RP stacionarne faze grupe B karakterišu veći faktori simetrije za nečistoće II, III i V (SF-Imp II, SF-Imp III, i SF-Imp V), i α za par ziprasidon/nečistoća III (α -Zip/Imp III)

(parametri N° 1, 3, 6 i 12), i takođe najviše vrednosti faktora simetrije za *nepoznatu nečistoću* (parametar N° 4).

- RP stacionarne faze Spherisorb ODS1, Spherisorb ODS 2, ODS Hypersil, Zorbax SB Phenyl, Zorbax SB CN, Supelcosil LC-8DB, Zorbax Eclipse XDBC8 i Nucleosil100-5 C18 (analizirani sistemi N° 9, 11-14, 17-19) u grupi **C**, karakterišu relativno niske vrednosti: faktora simetrije ziprasidona (SF-Zip), R_s i α za par *nepoznata nečistoća*/nečistoća IV (R_s -Unknown Imp/Imp IV, α -Unknown Imp/Imp IV), i broja teoretskih platoa nečistoće IV (N-Imp IV), (parametri N° 2, 10, 14 i 21).

- RP stacionarne faze Spherisorb ODS1, Zorbax Eclipse XDBC8, ODS Hypersil, Zorbax SB Phenyl i Zorbax SB CN (analizirani sistemi N° 9, 12, 19, 14 i 17) u podgrupi **C1**, imaju relativno više vrednosti: T-Zip USP, R_s i α za parove nečistoća III /*nepoznata nečistoća* i nečistoća IV/ V (R_s -Imp III/Unknown Imp, R_s -Imp IV/Imp V, α -Imp III/Unknown Imp i α -Imp IV/Imp V) (parametri N° 7, 9, 11, 13 i 15) u odnosu na ostale stacionarne faze.

- Zapažene su jedinstvene osobine RP stacionarnih faza Spherisorb ODS1 i Spherisorb ODS2 (analizirani sistemi N° 9 i 13), s obzirom na najveći broj teoretskih platoa za ziprasidon (N-Zip) i R_s za par nečistoća IV i V (R_s -Imp IV/Imp V) (parametri N° 18 i 11).

Na osnovu rezultata PCA i HCA analize utvrđeno je da su stacionarne faze Waters Spherisorb® ODS 1, Waters Spherisorb® ODS 2 i Nucleosil® 100-5 C18 (grupa **1** PCA ili grupa **C** AHC) optimalne za razdvajanje ziprasidona i njegovih nečistoća što je u skladu sa eksperimentalno dobijenim podacima (Slike 44., 1B. i 2B.). Razdvajanje kritičnog para ziprasidon/nečistoća II je postignuto samo na ove tri stacionarne faze. S obzirom na najbolju simetriju svih pikova ($0,8 < SF < 1,3$) i faktore retencije ($1 < k' < 10$) odabrana je Waters Spherisorb® ODS 1 kao najoptimalnija stacionarna faza za ispitivanje ziprasidona i njegovih nečistoća (Slika 44.). Razvojem i optimizacijom metode primenom više metoda eksperimentalnog dizajna određeni su optimalni uslovi za ispitivanje kompleksne smeše supstanci veoma različite polarnosti u jednom sistemu. Optimalni hromatografski uslovi na stacionarnoj fazi Waters Spherisorb® ODS 1, (250x4,6 mm, 5 μ m) su: gradijentno eluiranje (t (min) / % B: 0 min/10%, 6 min /25%, 10 min /25%, 20 min /100%, 20,1 min /10%, 30 min /10%) na temperaturi stacionarne faze od 25 °C i pri protoku od 1,5 mL min⁻¹. Mobilnu fazu čine mobilna faza A (pufer–

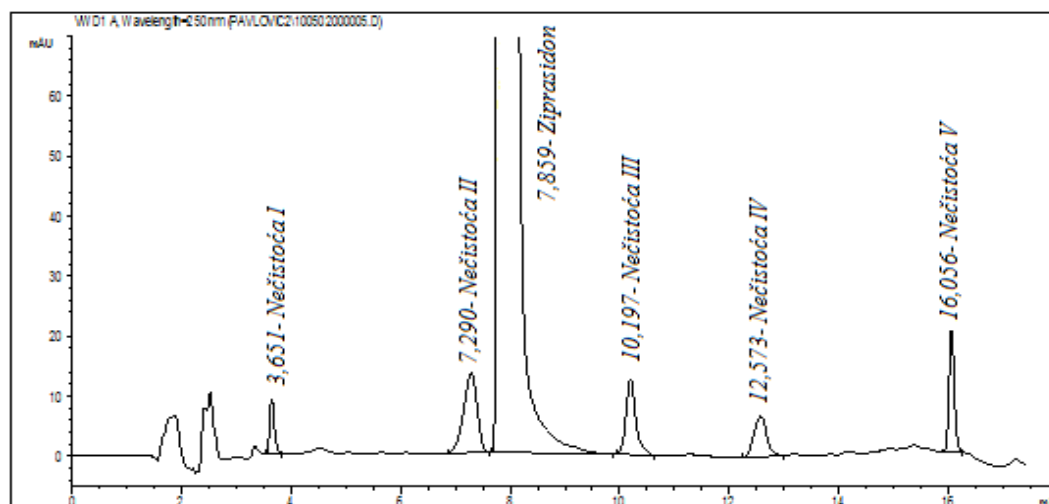
ACN (80+20, v/v)) i B (pufer–ACN (10+90, v/v)). Komponente pufera su 50 mM rastvor KH_2PO_4 sa 10mL L^{-1} TEA (1% TEA), čija je pH vrednost 2,5 podešena ortofosfornom kiselinom. Talasna dužina detekcije je 250 nm (DAD). Volumen injektovanja je 40 μL (za ispitivanje sadržaja nečistoća), odnosno 10 μL (za određivanje sadržaja ziprasidona). Dobijeni hromatografski uslovi su primenjeni za određivanje sadržaja ziprasidona i njegovih nečistoća I-V u sirovini aktivne supstance, kapsulama i prašku za rastvor za injekcije.

4.2. VALIDACIJA RP-HPLC METODE ZA ODREĐIVANJE ZIPRASIDONA I NJEGOVIH NEČISTOĆA

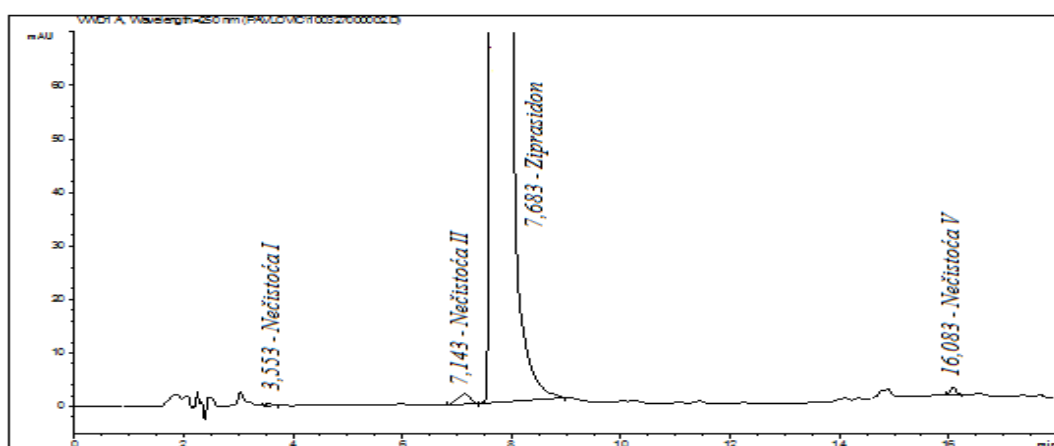
RP-HPLC metoda za određivanje ziprasidona i njegovih nečistoća je validirana u skladu sa zahtevima ICH regulative [196]. Tom prilikom su ispitivani sledeći parametri: robusnost, selektivnost, linearnost i opseg, preciznost, tačnost, limit detekcije i limit kvantifikacije. Validacija je izvedena pod hromatografskim uslovima prikazanim u prethodnom poglavlju.

Za procenu *selektivnosti* RP-HPLC metode upoređeni su hromatogrami rastvora R_{sm} , rastvora *placeba* i rastvora *uzoraka kapsula i praška za rastvor za injekcije* (priprema v. poglavlje 3.3.1.). Rastvor standarda R_{sm} sadrži ziprasidon u količini od 100% i njegove nečistoće u količini od 0,2% tj. 0,3% (nečistoća II) u odnosu na radnu koncentraciju ziprasidona u rastvoru uzorka. Hromatogrami su prikazani na Slici 52.

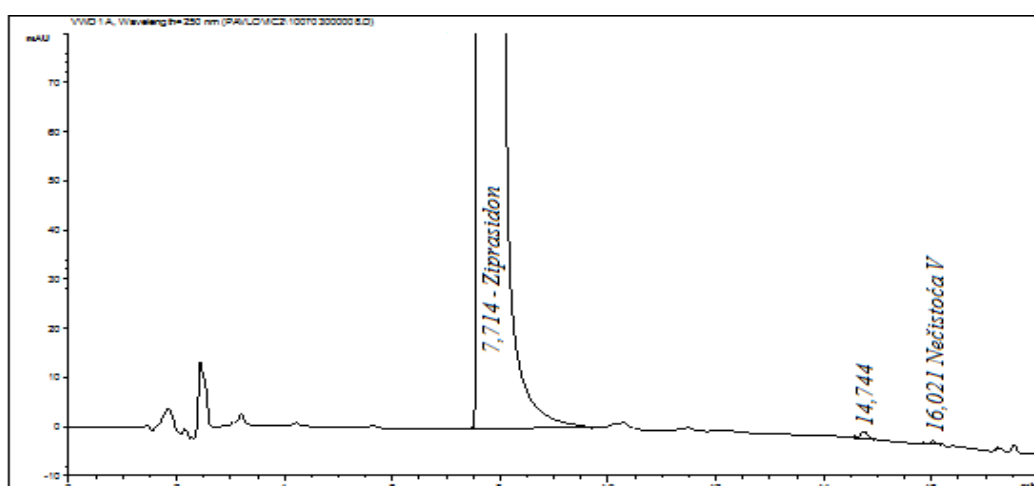
a)



b)



c)

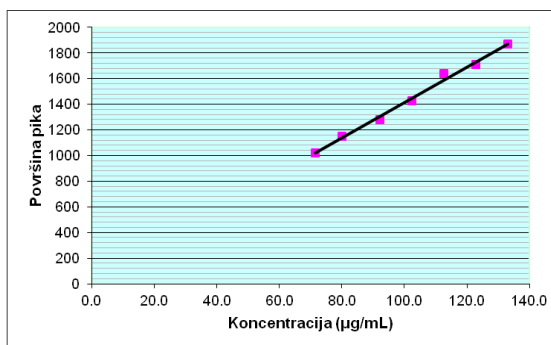


Slika 52. Hromatogrami rastvora: a) smeše za optimizaciju- R_{sm} , b) uzorka kapsula od 40 mg i c) uzorka praška za rastvor za injekcije, 20mg/mL

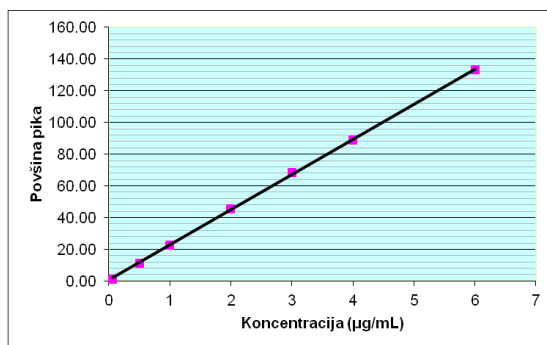
Na dobijenim hromatogramima rastvora uzoraka nisu uočeni hromatografski pikovi sa retencionim vremenima koja odgovaraju hromatografskim pikovima ziprasidona i ispitivanih nečistoća, čime je potvrđena selektivnost metode tj. odsustvo interferencije pomoćnih supstanci.

Za ispitivanje *linearnosti* pripremljeno je sedam standardnih rastvora, različitih koncentracija za ziprasidon i njegove nečistoće I-V i rastvori su injicirani u hromatografski sistem po tri puta. Koncentracije rastvora su obuhvatale opseg od 70–130 $\mu\text{g/mL}$ za ziprasidon, i za nečistoće I-V od odgovarajuće LOQ vrednosti, za datu nečistoću, do 6 $\mu\text{g/mL}$.

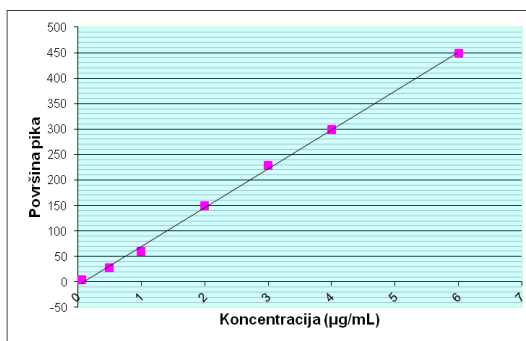
Analizirana je zavisnost površine pikova ispitivanih supstanci u funkciji koncentracije. Kalibracione krive su konstruisane metodom najmanjih kvadrata, a svaka tačka dobijena je kao srednja vrednost tri injektovanja odgovarajućih rastvora. Kalibracione krive ispitivanih jedinjenja prikazane su na slikama od 53. do 58., a dobijeni rezultati sumirani u Tabeli 8.



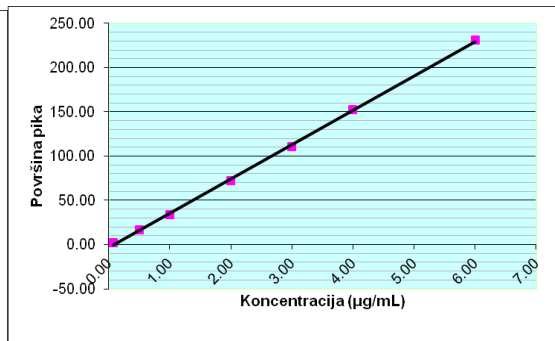
Slika 53. Kalibraciona kriva ziprasidona



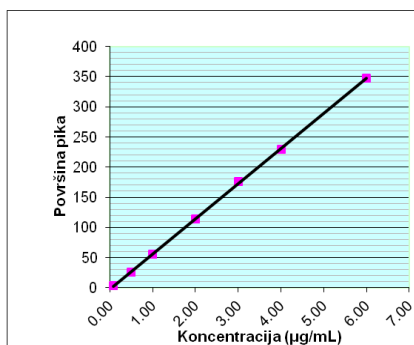
Slika 54. Kalibraciona kriva nečistoće I



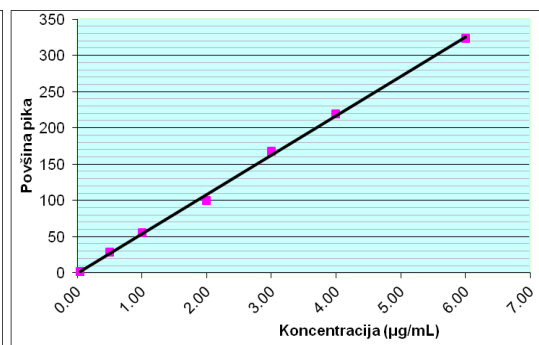
Slika 55. Kalibraciona kriva nečistoće II



Slika 56. Kalibraciona kriva nečistoće III



Slika 57. Kalibraciona kriva nečistoće IV



Slika 58. Kalibraciona kriva nečistoće V

Linearna zavisnost između površine pika i koncentracije je dokazana za sve ispitivane supstance u izabranom opsegu, jer je koeficijent korelacije za sve nečistoće bio veći od 0,999, a za ziprasidon od 0,997.

Tabela 8. Rezultati ispitivanja linearnosti metode

Ispitivana supstanca	Opseg koncentracija (µg/mL)	Kalibraciona kriva, $y=a+bx$	r	LOQ (µg/mL)	LOD (µg/mL)
Ziprasidon	70-130	$y = 28,30+13,85x$	0,997	/	/
Nečistoća I	LOQ-6	$y = 0,57+22,21x$	0,9999	0,06	0,016
Nečistoća II	LOQ-6	$y = -6,53+76,30x$	0,9993	0,06	0,017
Nečistoća III	LOQ-6	$y = -3,55+3,89x$	0,9997	0,08	0,024
Nečistoća IV	LOQ-6	$y = -1,65+58,22x$	0,9999	0,07	0,021
Nečistoća V	LOQ-6	$y = 0,03+54,20x$	0,9993	0,04	0,012

a odsečak, b nagib kalibracione krive, r koeficijent korelacije; LOQ-limit kvantifikacije, LOD-limit detekcije

Određivanje *limita detekcije (LOD)* i *kvantifikacije (LOQ)* urađeno je kombinacijom eksperimentalnog rada i procene odnosa signal/šum. Injektovane su serije razblaženja rastvora niskih koncentracija i ispitivan je njihov odgovor tj. najmanja koncentracija koja može da se kvantifikuje odnosno detektuje, a zatim je računat odnos signal/šum za svaku ispitivanu supstancu u svim koncentracijama. LOD je ona

koncentracija koja ima odnos signal/šum najmanje 3:1, dok je LOQ ona koncentracija koja ima odnos signal/šum najmanje 10:1 (Tabela 8.). LOQ i LOD vrednosti za 6-hloro-5-(2-hloroetil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-on (nečistoća IV) su 0,007 i 0,002% što pokazuje da je metoda značajno osetljivija za određivanje ove potencijalno genotoksične nečistoće u odnosu na prethodno publikovanu [49,54] gde su vrednosti LOQ i LOD iznosile 0,06 i 0,02%. Takođe, na osnovu zahteva regulatornih tela za potencijalno genotoksične nečistoće [55], prag toksikološkog limita (TTC) za nečistoću IV je 0,004% za *Zeldox*[®] prašak za rastvor za injekcije. Kako je LOD vrednost u ovoj metodi niža od TTC vrednosti, maksimalan prihvatljivi nivo ove nečistoće može biti detektovan ovom metodom. Dobijeni rezultati za LOQ i LOD za ostale nečistoće pokazuju da je metoda dovoljno osetljiva i da se može koristiti za praćenje njihovih koncentracija u aktivnoj supstanci i farmaceutskim oblicima (kapsule i prašak za rastvor za injekcije).

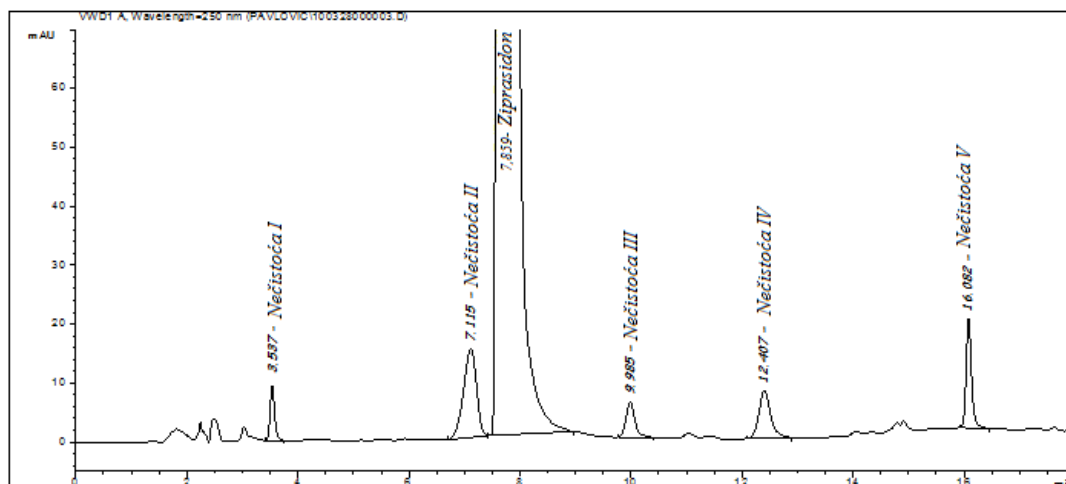
Nakon procene linearnosti metode, ispitana je *preciznost* metode. Preciznost predstavlja međusobno slaganje serije rezultata dobijenih određivanjem iz istog homogenog uzorka pod propisanim uslovima i najčešće se izražava relativnom standardnom devijacijom (*RSD*). Ponovljivost predstavlja preciznost procenjenju pod istim uslovima u kratkom vremenskom periodu [196]. Kao zahtev je postavljeno da *RSD* vrednost za ponovljena određivanja ziprasidona bude manja od 2%, a za nečistoće manja od 5%. Preciznost odnosno ponovljivost metode za određivanje sadržaja nečistoća je ispitivana analizom *rastvora smeše za optimizaciju- R_{sm}* gde je koncentracija ziprasidona bila 1mg/mL, sa nečistoćama u koncentraciji 0,2 % odnosno 0,3 % (nečistoća III) u odnosu na koncentraciju ziprasidona. Za ispitivanje preciznosti određivanja sadržaja ziprasidona korišćen je rastvor koji je sadržao 100 µg/mL ziprasidona. Pravljen je po šest rastvora iste koncentracije i svaki injiciran po tri puta. Obradom podataka izračunati su statistički parametri (standardna devijacija (*SD*) i *RSD*) i prikazani u Tabeli 9. Za sve ispitivane supstance vrednosti *SD* i *RSD* su u okviru dozvoljnih granica čime je potvrđena preciznost predložene RP-HPLC metode.

Tabela 9. Rezultati ispitivanja preciznosti metode

Ispitivana supstanca	Injektovano (µg/mL)	Nađeno (µg/mL)	RSD (%)
Ziprasidon	100	99,50±0,23*	0,22
Nečistoća I	2	1,98±0,01*	0,23
Nečistoća II	3	3,04±0,02*	0,52
Nečistoća III	2	1,96±0,02*	0,94
Nečistoća IV	2	1,98±0,01*	0,68
Nečistoća V	2	2,04±0,02*	0,93

*standardna devijacija, SD (n=6) ,
RSD –relativna standardna devijacija

Tačnost predstavlja međusobno slaganje prave ili referentne vrednosti i rezultata dobijenog određivanjem pod propisanim uslovima, a izražava se kao procenat prinosa, odnosno *Recovery* vrednost od poznate, dodate količine analita u uzorak [196]. Tačnost je ispitivana metodom standardnog dodatka, analizom devet *rastvora uzorka kapsula* (v. poglavlje 3.3.4.) koji su opterećeni odgovarajućim poznatim koncentracijama nečistoća I-V i ziprasidona u tri različite koncentracije (80%, 100% i 120% u odnosu na specifikacijske granice proizvođača za nečistoće i u odnosu na deklarirani sadržaj ziprasidona) (Slika 59.).



Slika 59. Hromatogram rastvora uzorka kapsula opterećen poznatima koncentracijama standarda ispitivanih supstanci (100%)

Svaki opterećeni rastvor je injektovan tri puta. *Recovery* vrednost je računata na osnovu dobijene kalibracione krive za svaku supstancu. i rezultati su prikazani u Tabeli 10.

Tabela 10. Rezultati ispitivanja tačnosti metode

Ispitivana supstanca	Injektovano (µg/mL)	Nađeno (µg/mL)	Recovery (%)	RSD (%)
Ziprasidon	80	80,71	100,9	0,85
	100	99,72	99,72	0,7
	120	121,56	101,3	0,9
Nečistoća I	1,636	1,611	98,47	3,77
	2,045	2,020	98,78	2,60
	2,454	2,576	104,96	1,64
Nečistoća II	2,44	2,248	92,15	0,74
	3,05	2,831	92,82	1,63
	3,66	3,410	93,18	0,49
Nečistoća III	1,62	1,616	99,77	3,76
	2,025	2,039	100,69	0,85
	2,431	2,453	100,90	0,46
Nečistoća IV	1,636	1,551	94,8	1,62
	2,045	2,068	101,13	1,01
	2,454	2,453	99,95	0,29
Nečistoća V	1,645	1,592	96,78	1,18
	2,056	2,061	100,22	0,76
	2,467	2,442	98,98	2,64

RSD-relativna standardna devijacija

Izračunavanjem *Recovery* vrednosti koja se za sve ispitivane supstance i koncentracije kretala u dozvoljenim granicama (od 92,15 do 104,96%), kao i *RSD* vrednosti (od 0,29 do 3,77%), potvrđena je dobra tačnost metode u ispitivanom opsegu. Takođe, ovakvim pristupom je još jednom potvrđeno odsustvo interferencije pomoćnih supstanci, čime je dodatno dokazana specifičnost metode.

Robusnost metode je ispitivana namernim malim promenama sledećih hromatografskih uslova: pH vrednosti pufera ($\pm 0,2$ pH), koncentracije KH_2PO_4 (0,025-0,075 mM), protoka ($1,0$ - $2,0 \text{ mL min}^{-1}$), temperature stacionarne faze ($\pm 5^\circ\text{C}$ od optimalne vrednosti) i koncentracije TEA (0,5-1,0 %) [196]. Ispitivanje i rezultati razdvajanja ziprasidona i njegovih nečistoća na različitim stacionarnim fazama su opisani u poglavlju 4.1.2.2. Na osnovu podataka sumiranih u Tabeli 11. može se zaključiti da je predložena metoda robusna prilikom promene hromatografskih uslova u navedenim opsezima.

Vrednosti validacionih parametara robusnosti, selektivnosti, linearnosti, preciznosti, tačnosti, LOQ i LOD ukazuju da validirana RP-HPLC metoda odgovara njenoj planiranoj nameni za određivanje ziprasidona i njegovih nečistoća u aktivnoj supstanci i u doziranim oblicima.

Tabela 11. Rezultati ispitivanja robusnosti

Hromatografski uslovi	Nečistoća I		Nečistoća II		Ziprasidon		Nečistoća III		Nečistoća IV		Nečistoća V	
	t _R	R _s	t _R	R _s	t _R	R _s	t _R	R _s	t _R	R _s	t _R	R _s
Temperatura stacionarne faze, 20°C	3.81	-	7.78	11.54	8.33	1.32	10.85	7.92	13.51	8.07	16.40	11.73
Temperatura stacionarne faze, 25°C	3.72	-	7.45	12.27	8.04	1.57	10.53	8.16	12.93	6.30	16.18	10.65
Temperatura stacionarne faze, 30°C	3.77	-	7.46	12.39	8.09	1.78	10.76	8.61	12.91	5.50	16.16	10.54
Protok, 1 ml/min	5.48	-	10.04	12.97	10.67	1.38	13.68	7.43	16.20	7.64	18.41	10.08
Protok, 1.5 ml/min	3.65	-	7.29	12.1	7.86	1.55	10.2	8.01	12.57	6.56	16.06	11.79
Protok, 2 ml/min	2.76	-	5.86	11	6.41	1.59	8.63	8.66	10.2	4.81	14.77	16.04
pufer, pH 2.3	3.6	-	7.19	11.89	7.76	1.54	10.1	7.98	12.58	6.41	16.07	10.88
pufer, pH 2.5	3.65	-	7.29	12.07	7.86	1.55	10.2	8.01	12.57	6.56	16.06	11.79
pufer, pH 2.7	3.65	-	7.32	11.98	7.90	1.55	10.33	8.05	12.52	6.20	16.15	12.83
cKH ₂ PO ₄ , 0.025 M	3.64	-	7.41	11.95	8.01	1.53	10.89	8.30	13.30	5.81	16.40	11.5
cKH ₂ PO ₄ , 0.05 M	3.72	-	7.45	12.27	8.04	1.57	10.53	8.16	12.93	6.30	16.18	10.65
cKH ₂ PO ₄ , 0.075 M	3.62	-	7.24	11.96	7.83	1.57	10.18	7.84	12.64	6.46	16.10	10.98
% TEA, 0.5	3.89	-	7.86	12.22	8.40	1.30	11.47	8.76	12.87	3.49	16.68	12.6
% TEA, 1.0	3.65	-	7.29	12.07	7.86	1.55	10.2	8.01	12.57	6.56	16.06	11.79
% TEA, 1.5	3.48	-	6.94	11.75	7.54	1.63	9.65	7.49	12.55	7.88	15.82	10.34

t_R – retenciono vremeR_s - rezolucija

Kvalitativna i kvantitativna analiza kapsula i praška za rastvor za injekcije

Za određivanje sadržaja ziprasidona i njegovih nečistoća I-V, predloženom RP-HPLC metodom u kapsulama i prašku za rastvor za injekcije, u hromatografski sistem su injektovani: *rastvor smeše za optimizaciju- R_{sm}* (priprema v. poglavlje 3.2.1.) i ispitivanje linearnosti (priprema v. poglavlje 3.3.2.) kao i rastvori uzoraka (priprema v. poglavlje 3.2.1.). Za svaki uzorak napravljena su po tri rastvora i svaki je injiciran tri puta.

Pod navedenim hromatografskim uslovima (poglavlje 3.3.7.) dobijeni su dobro definisani i razdvojeni hromatografski pikovi ispitivanih jedinjenja. Hromatografski parametri RP-HPLC analize prikazani su u Tabeli 12.

Tabela 12. Hromatografski parametri za RP-HPLC analizu ziprasidona i nečistoća I-V

Ispitivana supstanca	$t_{R,min}$	Broj teoretskih platoa(N)	Faktor retencije (k)	Simetrija pika (A_s)	Faktor selektivnosti (α)	Rezolucija (R_s)
Nečistoća I	3,7	39575	1,1	0,81	/	/
Nečistoća II	7,3	16528	3,2	1,28	2,22	12,1
Ziprasidon	7,9	50258	3,5	/	1,09	1,55
Nečistoća III	10,3	72764	4,8	0,81	1,33	8,01
Nečistoća IV	12,6	57182	6,2	1,08	1,25	6,56
Nečistoća V	16,1	577085	8,2	0,85	1,29	11,79

t_R – retenciono vreme

Svi hromatografski parametri se nalaze u dozvoljenim granicama koje garantuju dobro razdvajanje i određivanje ispitivanih supstanci. Rezolucije su veće od 1,5 što se smatra razdvajanjem na baznoj liniji. Faktor retencije ($1 < k < 10$) prvog pika nečistoće I je 1,1 tako da je garantovano dobro razdvajanje od pika mobilne faze. Simetrija pika je u granicama $0,8 < A_s < 1,3$, što omogućava dobru integraciju pikova i kvantifikaciju svih jedinjenja.

Određivanje sadržaja ispitivanih supstanci rađeno je metodom kalibracione krive, preko površine pikova. Identifikacija ispitivanih supstanci je izvršena preko retencionih vremena i UV-spektra snimljenog na DAD detektoru. Rezultati

kvantitativne analize su predstavljeni u Tabeli 13., a hromatogrami rastvora uzoraka na Slici 52.

Tabela 13. Rezultati određivanja sadržaja ziprasidona i njegovih nečistoća u farmaceutskim doziranim oblicima

Sadržaj ziprasidona		Nečistoće (%), $\pm$ RSD ^b				
Uzorak	(%), $\pm$ RSD ^a	I	II	III	IV	V
Zeldox kapsule	99,8 $\pm$ 1,2	0,001 $\pm$ 3,24	0,005 $\pm$ 2,93	ND	ND	0,002 $\pm$ 2,65
Zeldox, prašak za rastvor za injekcije	100,3 $\pm$ 1,1	ND	ND	ND	ND	0,007 $\pm$ 1,78

^aU odnosu na deklarirani sadržaj

^bU odnosu na sadržaj ziprasidona

ND – nije detektovana (ispod LOD)

Upoređivanjem dobijenih vrednosti za sadržaj ispitivanih supstanci sa specifikacijskim zahtevima proizvođača, ustanovljeno je da proizvod zadovoljava definisane zahteve iz specifikacije u roku upotrebe proizvoda. U uzorcima nije detektovana potencijalna genotoksična nečistoća (IV). Na hromatogramu *rastvora uzorka praška za rastvor za injekcije* detektovana je nepoznata nečistoća na retencionom vremenu $t_R = 14,7$ min (Slika 52c.)

4.3. QSRR STUDIJE DERIVATA ZIPRASIDONA

Ispitivanje kvantitativnog odnosa strukture i retencije izvršeno je sa ciljem da se uspostavi korelacija između izračunatih molekulskih parametara ziprasidona i ispitivanih derivata i vrednosti t_R u RP-HPLC sistemu. Zavisno promenljive (Y) su eksperimentalno dobijene vrednosti retencionih vremena (t_R) ziprasidona i nečistoća I-V, a nezavisno promenljive (X) - molekulski deskriptori tj. fizičko – hemijski parametri izračunati direktno iz molekulske strukture ispitivanih jedinjenja odgovarajućim softverskim metodama (engl. *computer assisted methods*, v. poglavlje 3.8.2.). Na osnovu eksperimentalno dobijenih podataka (t_R) i izračunatih deskriptora uspostavljena je kvantitativna zavisnost između strukture i retencije za ispitivani set jedinjenja

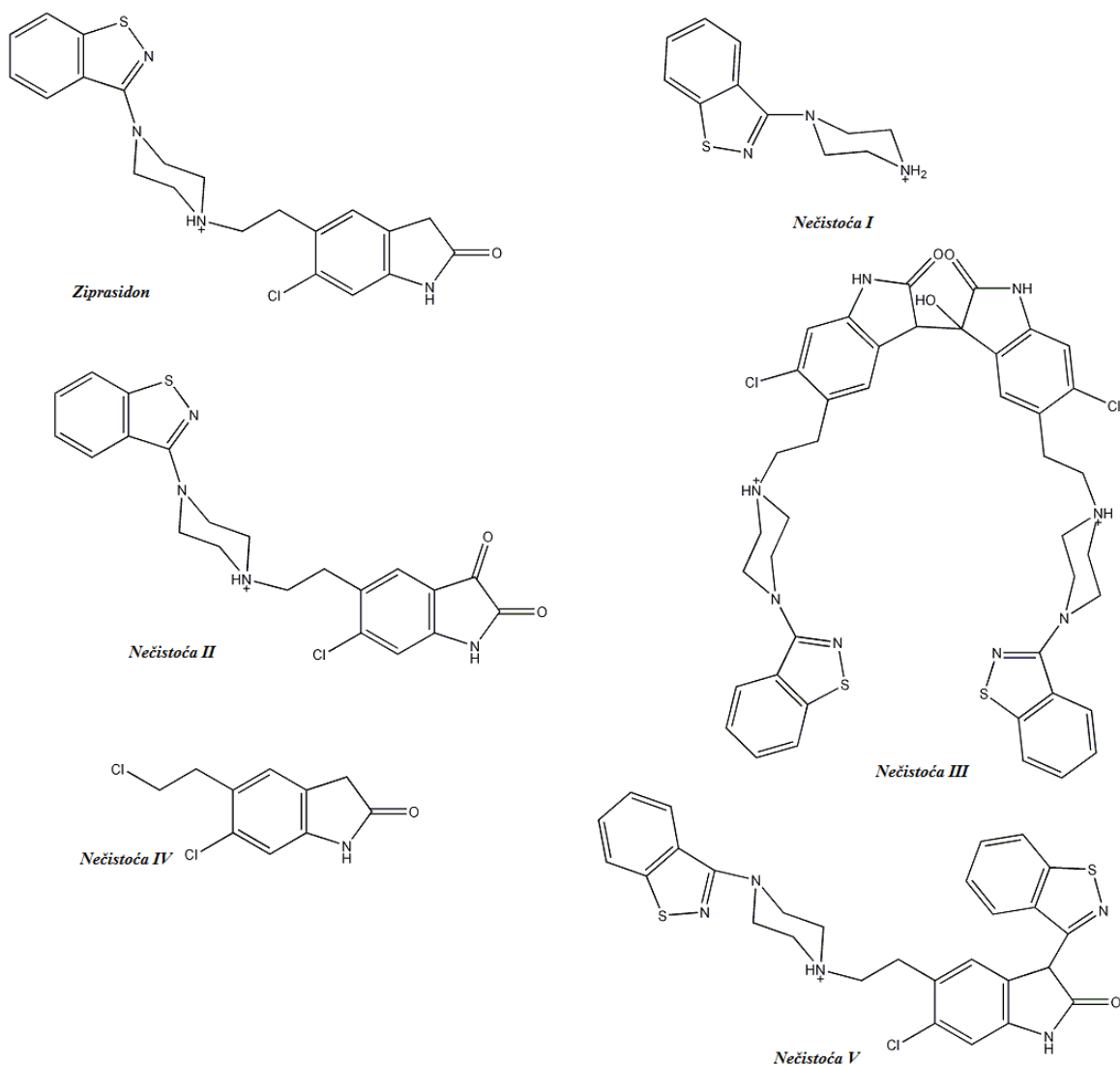
primenom linearnih (PLS) i nelinearnih (ANN) statističkih metoda. Sposobnost predviđanja t_R kod ovako složenih sistema je poređena preko vrednosti srednje kvadratne greške predviđanja (RMSEP) i r (koeficijenta korelacije, dobijenog u odnosu na predviđeno t_R). Odabran je regresioni model PLS-QSRR, na osnovu kojeg se sa visokim stepenom pouzdanosti može predvideti retencija ziprasidona i ispitivanih derivata i izdvojiti najznačajniji molekularni parametri koji utiču na ponašanje ispitivanih jedinjenja u RP-HPLC sistemu. Razvijeni QSRR model je dalje korišćen za predviđanje razdvajanja drugih derivata ziprasidona. Takođe, na osnovu retencije detektovane nove nepoznate nečistoće, QSRR modelom je pretpostavljena njena struktura.

Formiranje QSRR modela se odvijalo u nekoliko faza:

- odabir molekularnog seta podataka za QSRR studiju (ziprasidon i nečistoće I-V)
- izračunavanje molekularnih deskriptora
- odabir molekularnih deskriptora tj. nezavisno promenljivih sa najvećim uticajem na zavisno promenljivu (t_R) primenom odgovarajućeg statističkog metoda (PLS: VIP metoda)
- formiranje QSRR modela primenom linearnih (PLS) i nelinearnih statističkih metoda (MLP-ANN)
- validacija modela

4.3.1. QSRR analiza

Hemijske strukture ispitivanih jedinjenja konstruisane su u ChemDrawUltra 7.0.0. program [172]. Za sva ispitivana jedinjenja izračunate su pKa vrednosti i odabrani dominantni molekularni/katjonski oblici pri eksperimentalnim uslovima pH 2,5 pomoću MarvinSketch programa [173]. Izračunata pKa vrednost ziprasidona (7,1) je bliska eksperimentalno dobijenoj pKa vrednosti (oko 6,7 [42]) što pokazuje da je odabran najverovatniji dominantni oblik za dalje ispitivanje. Određivanje najstabilnijih konformacija odabranih molekularnih/katjonskih oblika ispitivanih jedinjenja pri pH 2,5 izvršeno je primenom Parametric Method Vs.3 (PM3) metode u Molecular Orbital PACkageprogramu (MOPAC/PM₃) [174,175] (Slika 60.).



Slika 60. Hemijske strukture dominantnih oblika ziprasidona i njegovih glavnih nečistoća na pH 2,5

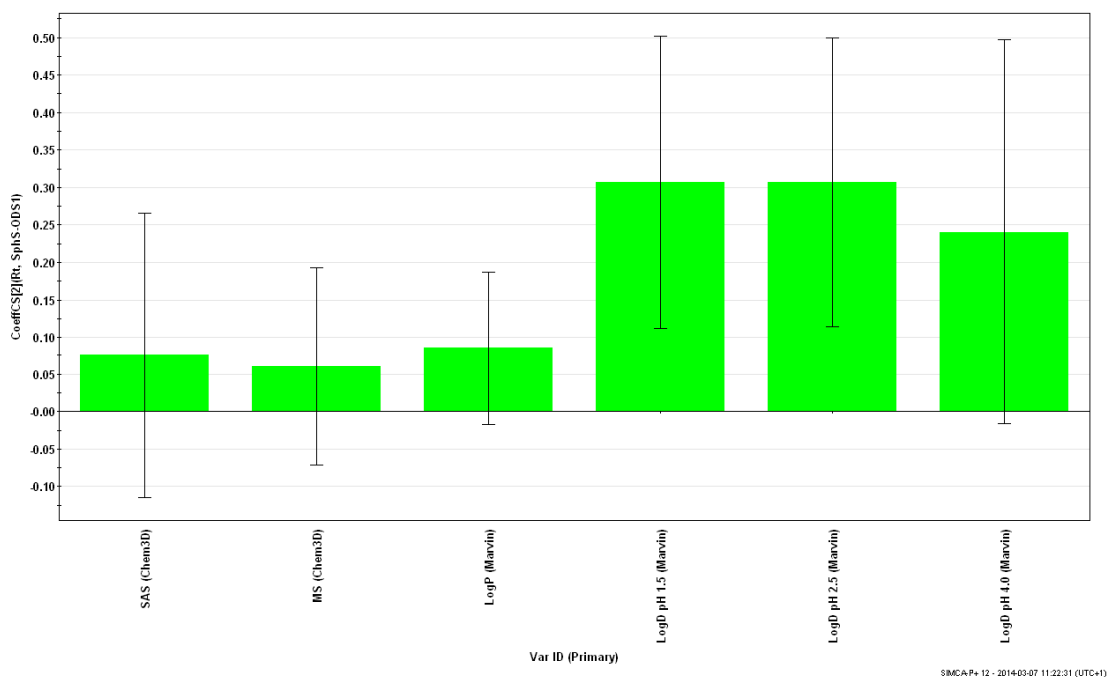
Za QSRR studiju jedinjenja ziprasidona izračunati su sledeći molekularni deskriptori: molarna refraktivnost (MR), površina dostupna rastvaraču (SAS, engl. *Connolly Accessible Area*), molekularna površina (MS, engl. *Connolly Molecular Area*), logaritam podeonog koeficijenta ($\log P$), logaritam distribucionog koeficijenta oktanol-voda pri pH 1,5, 2,5 i 4,0 ($\log D_{1.5}$, $\log D_{2.5}$, $\log D_{4.0}$), površina polarnog dela molekule (PSA, engl. *Polar Surface Area*), broj donora vodonične veze (HBD, engl. *Hydrogen Bond Donor*), broj akceptora vodonične veze (HBA, engl. *Hydrogen Bond Acceptor*), dipol, energija najviše popunjene molekulske orbitale (HOMO, engl. *Highest Occupied Molecular Orbital*), energija najniže nepopunjene molekulske orbitale (LUMO, engl.

Lowest Unoccupied Molecular Orbital), hemijski potencijal (μ), elektronegativnost (χ), otpornost na transfer elektrona (η , engl. *hardness*), sposobnost delokalizacije naelektrisanja (S , engl. *global softness*), indeks elektrofilnosti (ω). Deskriptori μ , χ , η , S , ω , su kvantno-hemijski deskriptori koji proizilaze iz funkcionalne teorije napona (engl. *The Density Functional Theory*, DFT), i kao indeksi reaktivnosti su korišćeni za interpretaciju različitih mehanizama reakcija i hemijskog vezivanja [180-184]. Programi korišćeni za izračunavanje sternih, fizičko-hemijskih i elektronskih osobina analiziranih jedinjenja i izračunati deskriptori su navedeni u poglavlju 3.8.2.

Sledeći korak je bio ispitivanje i identifikacija molekulskih deskriptora sa najvećim uticajem na retenciono ponašanje (t_R), primenom linearne regresione metode parcijalnih najmanjih kvadrata – PLS. Pomoću programa SIMCA je izračunat je uticaj svakog deskriptora (X_k) na t_R (Y_k) u modelu i to je predstavljeno kao VIP_k parametar (*Variable Importance in the Projection*). Nezavisno promenljive X sa VIP vrednostima većim od 1 imaju najveći uticaj na formirani model, dok X varijable sa VIP parametrom manjim od 1,0 ($1,0 > VIP$) imaju manji uticaj na regresioni model [98]. Od izračunatih molekulskih deskriptora samo oni sa najvišim VIP vrednostima su razmatrani u formiranju modela i najrelevantniji deskriptori, sa visokim VIP vrednostima su odabrani za PLS modelovanje. Optimalna kombinacija najrelevantnijih deskriptora za formiranje PLS modela je odabrana na osnovu najviših vrednosti koeficijenta determinacije (R^2) i validacionog regresionog faktora (LOO-CV, Q^2) i najnižih vrednosti srednje kvadratne greške predviđanja (RMSEP) dobijenih modela. Statistički najznačajniji model dobijen PLS analizom (VIP metoda) je odabrao šest molekulskih deskriptora koji su najviše uticali na retenciono ponašanje ziprasidona i njegovih nečistoća: **MS**, **SAS**, **LogP**, **LogD_{pH 2.5}**, **LogD_{pH 1.5}** i **LogD_{pH 4.0}** [194].

Formiranje QSRR modela vršeno je primenom linearnih (PLS) i nelinearnih statističkih metoda (MLP-ANN). PLS-QSRR model sa dve značajne komponente ($A=2$), regresionim parametrom $R^2 = 0,833$ i validacionim parametrima $Q^2 = 0,633$, najnižom greškom predviđanja $RMSEP = 1,621$ i najvišim koeficijentom korelacije r predviđenih u odnosu na dobijene vrednosti ($r = 0,913$) je odabran za dalja ispitivanja. (Tabela 14.). Dobijeni statistički parametri PLS-QSRR modela ukazivali su na dobru tačnost predviđanja modela. Ovaj statistički najznačajniji PLS-QSRR model je formiran sa 6 odabranih deskriptora:

$$t_R(\text{PLS}) = f(\text{MS}; \text{SAS}; \text{LogP}; \text{LogD}_{\text{pH } 1.5}; \text{LogD}_{\text{pH } 2.5}; \text{LogD}_{\text{pH } 4.0}) \quad (21)$$



Slika 61. Grafikon PLS-koeficijenata

Intenzitet uticaja i vrsta korelacije svakog od izabranog molekuskog deskriptora sa retencionim vremenom (t_R) za formirani PLS-QSRR model je prikazana na Slici 61. Uočava se pozitivna korelacija svih deskriptora sa t_R vrednostima.

Tabela 14. Eksperimentalno dobijene i predviđene vrednosti t_R statistički značajnim **PLS-QSRR** modelom i primenjeni molekulski deskriptori

JEDINJENJE	SAS	MS	LogD pH 1,5	LogD pH 2,5
Nečistoća I	399,318	205,444	-2,02	-1,31
Nečistoća II	578,710	331,072	0,71	1,41
Ziprasidon	649,768	359,486	0,17	0,71
Nečistoća III	892,016	567,532	-0,53	0,57
Nečistoća VI	390,659	197,267	2,55	2,55
Nečistoća V	770,858	444,459	2,24	2,84
JEDINJENJE	LogD pH 4,0	LogP	Eksperimentalna t_R [min]	Predviđena t_R [min] PLS-QSRR modelom
Nečistoća I	-1,03	2,21	3,651	2,5409
Nečistoća II	2,64	4,83	7,290	10,4748
Ziprasidon	1,35	4,30	7,860	8,6666
Nečistoća III	1,89	7,75	10,197	9,7429
Nečistoća VI	2,55	2,55	12,573	11,9067
Nečistoća V	3,49	6,43	16,056	14,2951
r				0,91315
MSEP				2,62946
RMSEP				1,62156

r - koeficijent korelacije predviđenih u odnosu na dobijene vrednosti

Najznačajniji molekulski parametri u optimalnom PLS modelu predstavljeni su u Tabeli 15. i pripadaju 2D i 3D-deskriptorima.

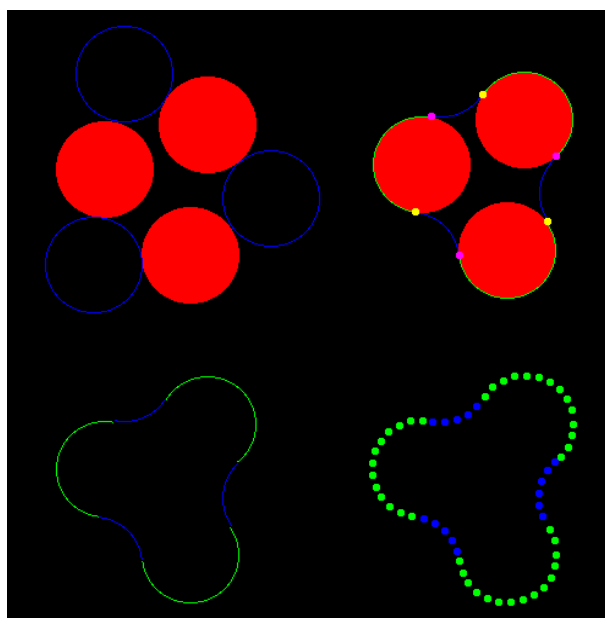
Tabela 15. Najznačajniji molekulski deskriptori u optimalnom QSRR modelu

Odabrani deskriptori	Klasa deskriptora	Opis	Tip deskriptora**	Prema osobini koju opisuju
MS*	Sterni deskriptori	Molekulska površina	3D	Sterni parametri
SAS*	Sterni deskriptori	Površina dostupna rastvaraču	3D	Sterni parametri
LogP	Molekulska osobina	Logaritam particionog koeficijenta	2D	Parametri lipofilnosti
LogD_{pH 1.5}	Molekulska osobina	Logaritam distribucionog koeficijenta oktanol-voda pri pH 1.5	2D	Parametri lipofilnosti
LogD_{pH 2.5}	Molekulska osobina	Logaritam distribucionog koeficijenta oktanol-voda pri pH 2.5	2D	Parametri lipofilnosti
LogD_{pH 4.0}	Molekulska osobina	Logaritam distribucionog koeficijenta oktanol-voda pri pH 4.0	2D	Parametri lipofilnosti

* MS, SAS [197]; ** u odnosu na način računanja

Molekulska površina (**MS**, engl. *Connolly Molecular Area*) i površina dostupna rastvaraču (**SAS**, engl. *Connolly Accessible Area*) su pojmovi uvedeni još sedamdesetih godina dvadesetog veka [198,199] kada je trebalo objasniti ponašanje velikih molekula (npr. proteina i nukleinskih kiselina) u rastvaraču. Unutrašnji savijeni delovi konformacija su delovi *van der Waals*-ove površine potpuno nedostupni interakcijama sa rastvaračem što uglavnom određuje ponašanje molekula u rastvaraču. Prvo je uveden pojam „površina molekula dostupna rastvaraču” [198]. To je površinu kroz koju prolazi sferna aproksimacija rastvarača kada sfera rastvarača okružuje *van der Waals*-ovu površinu molekule. Ova površina pokazuje samo atome koji su dostupni rastvaraču.

Ako ima nekoliko pukotina ili brazdi na *van der Waals*-ovoj površini molekule gde sfera rastvarača ne može da okruži molekul, onda se SAS značajno razlikuje od *van der Waals*-ove površine. Nekoliko godina kasnije Ričards je dao novu definiciju molekulske površine dostupne rastvaraču definisavši je kao „*molekulska površina*“ (engl. *molecular surface*, MS) [199] koja je podeljena na kontaktnu površinu i površinu ponovnog ulaza (engl. *reentrant surface*). Kontaktna površina je deo *van der Waals*-ove površine koja je dostupna sferi rastvarača. Površina ponovnog ulaza je unutrašnja površina sfere rastvarača koja dodiruje više od jednog atoma. Na Slici 62. kontaktna površina je obeležena zelenom bojom, a površina ponovnog ulaza plavom.



Slika 62. Dvodimenzionalni prikaz molekulske površine koju čine kontaktna i površina ponovnog ulaza

Konoli je razvila kompjuterske algoritme za proračun navedenih površina [197], po kojoj su ovi deskriptori i dobili naziv. Proračun *molekulske površine* - MS se zasniva na predstavljanju površine molekula kao skupa delova konveksnih, površina u obliku sedla i konkavnih sfernih regiona koji se povezuju u kružne lukove. Svaka površina je definisana u odnosu na koordinate atoma, *van der Waals*-ov radius i radius rastvarača [152].

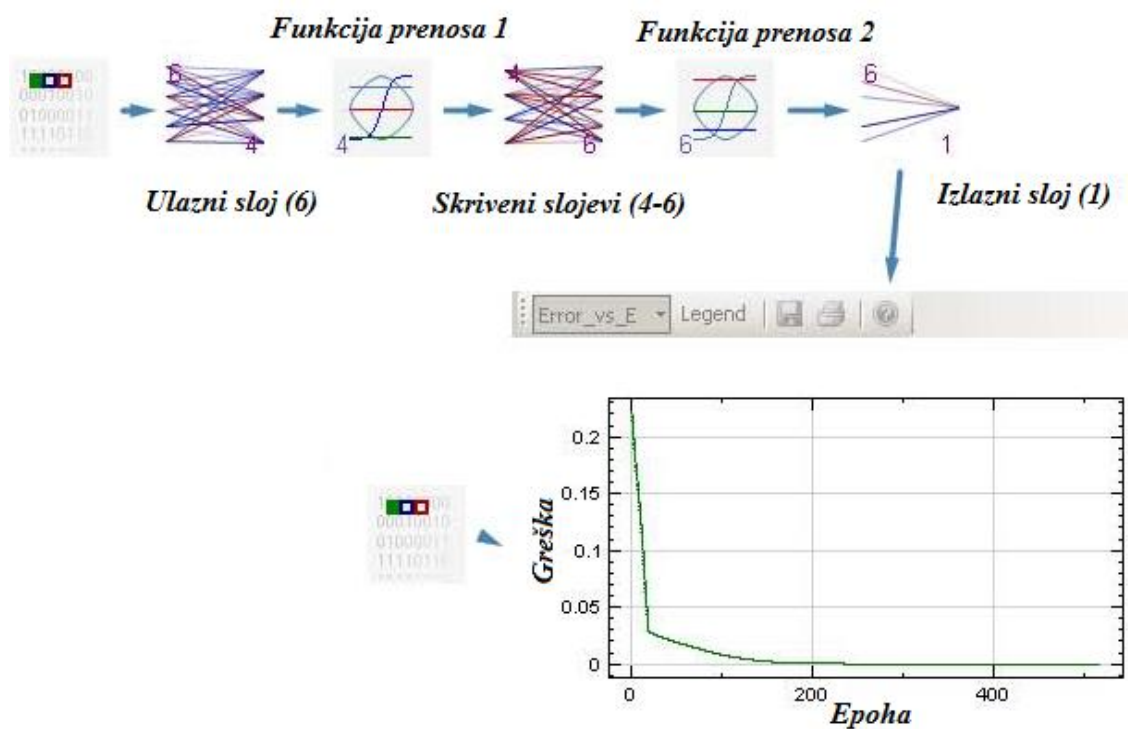
LogP (logaritam particionog koeficijenta oktanol-voda) /**logD** (logaritam distribucionog koeficijenta) deskriptori su parametri lipofilnosti, ili fizičko-hemijski

deskriptori [99]. Lipofilnost jedinjenja izražena kao logP ili ako su prisutne jonizovane forme jedinjenja kao logD, predstavlja jedan od najvažnijih parametara u ADME (*Absorption, Distribution, Metabolism, Elimination*) karakteristikama leka kao i u određivanju njegovog farmakološkog i toksikološkog profila [200]. Takođe, logP i logD su jedan od najvažnijih parametara u QSRR modelima. Ako molekul ima veliku vrednost logP onda je lipofilan, a ako je mala onda je hidrofilan. Za razliku od logP koji je mera lipofilnosti samo jedne forme leka (nejonizovane), distribicioni koeficijent D je mera lipofilnosti pri bilo kojoj pH vrednosti. Distribicioni koeficijent predstavlja odnos koncentracije nejonizovane forme leka u oktanolu i zbira koncentracija jonizovane i nejonizovane forme leka u vodi. Pošto logD uzima u obzir sve molekulске oblike (jonske i neutralne) koji mogu postojati pri datoj pH vrednosti, smatra se da je ovaj deskriptor bolji parametar lipofilnosti u poređenju sa logP, a naročito u razumevanju lipofilne prirode molekula u različitim fiziološkim sistemima [201].

Ispitivana jedinjenja koja imaju jonizujuće grupe (piperazinski prsten) prisutna su u rastvoru kao smeša različitih jonskih formi, a jonizacija ovih grupa zavisi od pH vrednosti rastvora. U kiselim rastvorima (npr. 1,5; 2,5; 4,0), sva ispitivana jedinjenja, osim nečistoće IV, su u jonizovanom obliku. **LogD_{pH 1.5}**, **LogD_{pH 2.5}**, **LogD_{pH 4.0}** su oktanol-voda distribicioni koeficijenti izračunati u MarvinSketch programu [173]. Pripadaju grupi deskriptora koji opisuju molekulске osobine i mera su lipofilnosti jedinjenja pri pH vrednostima 1,5; 2,5 i 4,0. Izračunate **LogD_{pH 1.5}** i **LogD_{pH 2.5}**, a zatim **LogD_{pH 4.0}** i **logP** vrednosti su pokazale najveći uticaj na retenciju ispitivanih jedinjenja u QSRR studiji. Imaju pozitivnu korelaciju sa t_R vrednostima što ukazuje da lipofilnija jedinjenja pri datim vrednostima pH (1,5; 2,5 i 4,0) imaju veći afinitet prema nepolarnoj stacionarnoj fazi (Slika 61.).

Nakon formiranja PLS-QSRR modela linearnom PLS metodom, primenjena je nelinearna statistička metoda – ANN i formiran je MLP-ANN-QSRR model. Nelinearne metode se često koriste u QSRR modelovanju zbog složenosti veze između retencije i strukture molekule što bi moglo da vodi dobijanju modela sa boljim sposobnostima predviđanja [137]. Deskriptori odabrani PLS modelom su korišćeni kao ulazi kod MLP-ANN modela (6 neurona), a kao izlazi t_R ispitivanih jedinjenja (1 neuron). Višeslojni perceptron (MLP) uz *back propagation* (BP) algoritam je odabran za nelinearno QSRR

modelovanje. Dizajnirana je četvoroslojna mreža gde se u dva skrivena sloja nalazi 4 i 6 neurona čiji je optimalan broj definisan prilikom treniranja mreže (Slika 63.).



Slika 63. Arhitektura veštačke neuronske mreže za t_R -MLP-ANN model i odgovarajući grafik greške treniranja

Međutim, linearna statistička metoda (PLS) je bila bolja u odnosu na nelinearnu (ANN) metodu. Formirani linearni model je imao bolje statističke parametre u odnosu na ANN modele. MLP-ANN-QSRR model je imao više vrednosti grešaka predviđanja (RMSEP) u odnosu na PLS-QSRR model. Dakle, pokazana je linearna zavisnost između odabranih molekulskih deskriptora (MS, SAS, LogP, LogD_{pH 2.5}, LogD_{pH 1.5} i LogD_{pH 4.0}) i retencije (t_R) za ispitivana jedinjenja u QSRR modelu. Takođe, na osnovu opisa odabranih deskriptora može se zaključiti da ova korelacija ima fizičko-hemijski smisao [152] tj. značenje primenjenih deskriptora se može jasno interpretirati u funkciji ispitivane osobine (retencije) uz istovremenu dobru moć predviđanja QSRR modela čime je obostrano potvrđen kvalitet regresione jednačine.

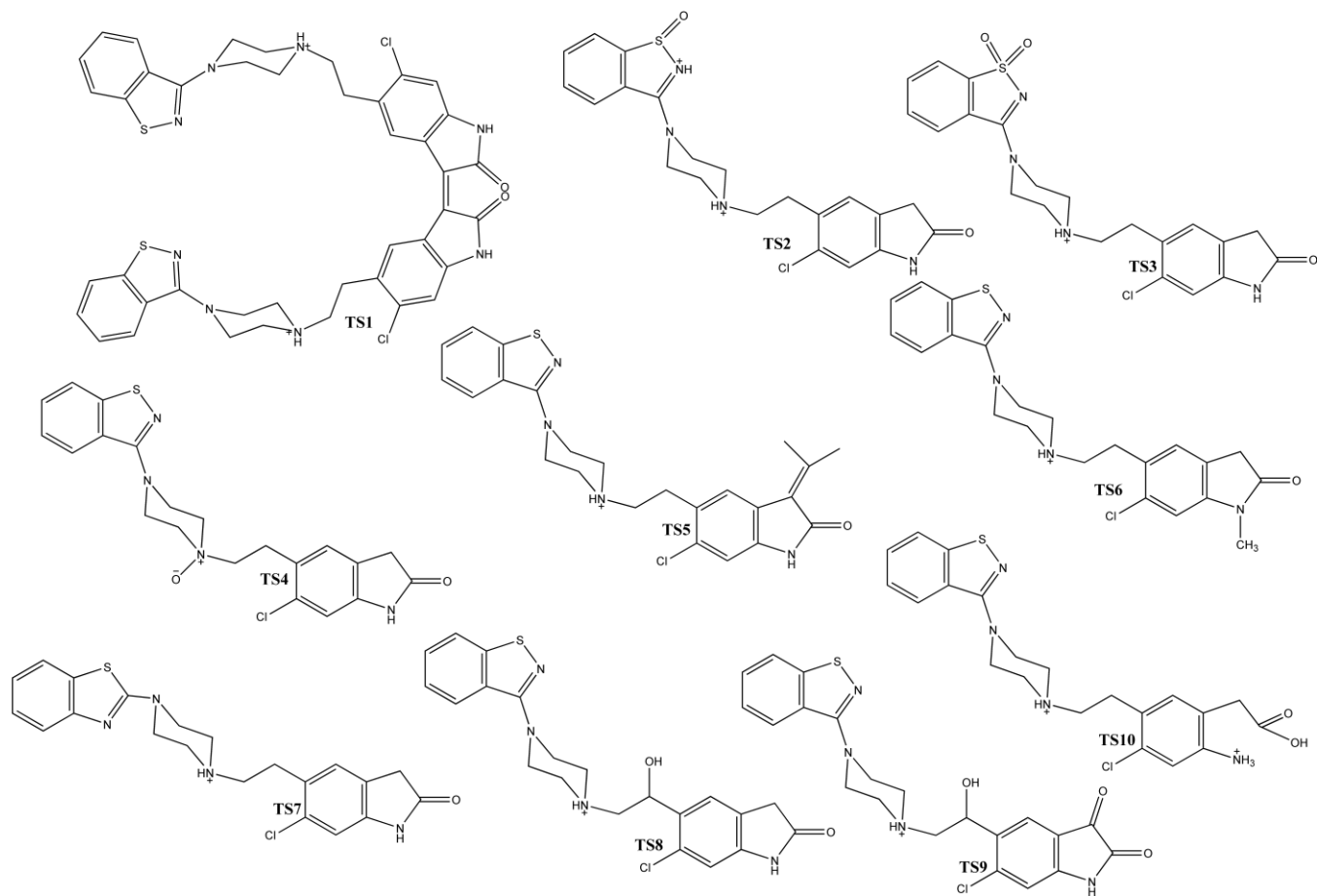
S obzirom na mali broj podataka nije bilo moguće izdvojiti trening i test set, pa je odabrana najjednostavnija metoda unutrašnje ukrštene validacije modela – “izostavi jednu vrednost” (LOO-CV) (v. poglavlje 1.4.). Ukrštena validacija i validacioni

regresioni faktor (Q^2) su korišćeni kao kriterijumi za ispitivanje robusnosti, pouzdanosti i tačnosti predviđanja statističkih modela.

4.3.2. Primena QSRR modela za predviđanje retencije Test set jedinjenja

Predviđanje hromatografskog ponašanja na osnovu molekulske strukture analita jedan je od glavnih ciljeva metodologije povezivanja strukture jedinjenja i retencije (QSRR). U QSRR studiji ispitivanih jedinjenja formirani linearni model (PLS-QSRR) imao je bolje validacione parametre u odnosu na MLP-ANN modele što je izdvojilo ovaj regresioni model kao pouzdaniji za predviđanje retencionog ponašanja derivata ziprasidona. Ova činjenica je potvrđena kada su predviđana retencionna vremena u test setu jedinjenja derivata ziprasidona koji nisu korišćeni u formiranju pomenutih modela, a čije su strukture bile dostupne u literaturi. PLS-QSRR model je izdvojio dva kandidata iz test seta kao potencijalne strukture za *nepoznatu nečistoću* sa približnijim retencionim vremenima u odnosu na eksperimentalno dobijena. MLP-ANN-QSRR model je izdvojio tri kandidata.

Kao test jedinjenja (TS1-TS10) odabrani su derivati ziprasidona, degradacioni proizvodi i metaboliti (Slika 64.). Supstance **TS2** (ziprasidon sulfoksid) i **TS3** (ziprasidon sulfon) predstavljaju primarne oksidativne metabolite ziprasidona [38], **TS1**, **TS5-TS9** su nečistoće iz literature [40,49,51,58,60]. Test supstanca obeležena kao **TS10**, ziprasidon otvoreni prsten (**USP: ziprasidone open ring; Ph. Eur.: Impurity C**), je nečistoća specificirana u monografiji obe farmakopeje [43,44]. **TS4** je jedinjenje čija je struktura dobijena u ličnoj komunikaciji sa proizvođačem [194]. Predviđena retencionna vremena test jedinjenja PLS-QSRR modelom su navedena u Tabeli 16.



Slika 64. Hemijske strukture dominantnih molekulskih/katjonskih oblika derivata ziprasidona (TS1-TS10) pri eksperimentalnim uslovima pH 2,5

Tabela 16. Predviđena retenciona vremena derivata ziprasidona (TS1-TS10) PLS-QSRR modelom

Derivati ziprasidona (nečistoće/metaboliti)	Predviđena t_R [min] PLS-QSRR modelom
TS1	12,055
TS2	2,211
TS3	6,523
TS4	13,881
TS5	11,780
TS6	8,402
TS7	9,045
TS8	6,665
TS9	8,815
TS10	6,302
Nepoznata nečistoća, eksperimentalno t_R	11,270

U toku razvoja i optimizacije RP-HPLC metode razdvojena je i detektovana jedna *nepoznata nečistoća* čije je retenciono vreme bilo $t_R = 11,270$ min. Nečistoća je detektovana u *rastvoru smeše za optimizaciju* - R_{sm} koji je čuvan 24h na sobnoj temperaturi (poglavlje 3.2.1.). Retenciono vreme *nepoznate nečistoće* je poređeno sa retencionim vremenima test jedinjenja (TS1-TS10) koje je predvideo model (Tabela 16.). PLS-QSRR model je izdvojio strukture supstanci **TS1** (12,055 min) i **TS5** (11,780 min) (Slika 64.) kao potencijalne kandidate za *nepoznatu nečistoću* na osnovu predviđenih retencionih vremena koja su bila bliska eksperimentalnom $t_R = 11,270$ min. Karakterizacija *nepoznate nečistoće* u LC-MS studiji tripl kvadrupolskim masenim analizatorom (v. poglavlje 4.4.2.) je potvrdila da struktura *nepoznate nečistoće* odgovara strukturi **TS1**. Na ovaj način pokazano je dobro slaganje između LC-MS rezultata i rezultata predviđanja QSRR studije, čime je nedvosmisleno potvrđen veliki prognostički potencijal kreiranog QSRR modela. Takođe, predviđene t_R vrednosti test jedinjenja TS1-TS10 se u biti razlikuju od t_R ziprasidona i nečistoća I-V. Ovi rezultati pokazuju da se razvijeni QSRR model može uspešno koristiti za predviđanje retencije ziprasidona i njemu srodnih supstanci, ali i za uzorke koji sadrže nepoznate strukture.

S obzirom da je ziprasidon nova molekula koja je skoro uvedena u terapiju šizofrenije [1,6], razvijeni QSRR model ima značajan naučni doprinos jer se njime

može predvideti retenciono ponašanje novih strukturno sličnih derivata ziprasidona poznatih i/ili pretpostavljenih struktura koji nastaju primenom različitih reakcionih uslova za sintezu ziprasidona kod sve većeg broja generičkih lekova. Ovakav pristup bi imao značajan uticaj na optimizaciju procesa sinteze aktivne supstance i posledično na dobijanje stabilnije formulacije leka.

Ovo istraživanje predstavlja prvu studiju o QSRR modelu koja povezuje strukturu derivata ziprasidona sa hromatografskom retencijom [194].

4.4. KARAKTERIZACIJA NEPOZNATE DEGRADACIONE NEČISTOĆE PRIMENOM MASENE SPEKTROSKOPIJE

Karakterizacija nepoznate nečistoće je ključna u identifikaciji novih jedinjenja sa genotoksičnim potencijalom i stoga je karakterizacija nečistoće kritična u proceni kvaliteta, efikasnosti i bezbednosti leka [202].

Kako primenom HPLC-UV sistema nije bilo moguće identifikovati *nepoznatu nečistoću* (t_R : 11,270 min) razvijena je osetljiva UPLC-MS-MS (engl. *Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*) metoda za određivanje ziprasidona i njegovih nečistoća sa kraćim vremenom izvođenja analize uz istovremenu mogućnost karakterizacije *nepoznate nečistoće*. Za detekciju hromatograma primenjena je masena spektrometrijska metoda uz upotrebu tripl kvadrupolskog masenog analizatora. Kod primene tečne hromatografije spregnute sa masenom spektrometrijom potrebno je postići hromatografsko razdvajanje kod sličnih analita sa identičnim ili nerazlikujućim masama molekula i fragmenata, pogotovu kada je u rastvoru prisutna nečistoća nepoznate strukture kako bi se posebno pratio mehanizam fragmentacije [83,203,204]. Postupak razvoja i optimizacije UPLC-MS-MS metode detaljno je opisan u poglavlju 4.5. Prednost metode je bilo vreme izvođenja analize (7 min), i što je postignuto hromatografsko razdvajanje nepoznate nečistoće na 5,13 min. Da bi se odredili njeni fragmenti podešeno je da eluat od 4,8 do 7 min ide u maseni detektor, a prethodni eluat (od 0 do 4,8 min) u otpad.

4.4.1. Optimizacija uslova na masenom detektoru

Molekulski jon i njegovi odgovarajući fragmenti čine maseni spektar ispitivane supstance koji služi za njenu identifikaciju. Praćenjem nastalih fragmenata i njihove

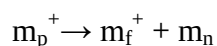
zastupljenosti u masenom spektru može se pretpostaviti struktura ispitivane supstance, a na osnovu m/z odnosa molekulskog jona i njena molekulska masa. Jedan molekularski jon se pod istim uslovima uvek fragmentiše na isti način pa je neophodno pre karakterizacije nepoznate nečistoće optimizovati uslove na masenom detektoru pod kojima će se ispitivanje odvijati [205].

Kao jonski izvor odabrana je elektrosprej jonizacija na povišenoj temperaturi (HESI). Izvršen je izbor moda u kojem će se vršiti ispitivanje molekulskih jona i fragmenata i izvršena je optimizacija signala. HESI predstavlja tzv. najmanje destruktivnu tehniku jonizacije, jer se joni stvaraju direktno iz rastvora, pa je pri manjim energijama jonizacije, na masenom spektru najdominantniji molekularski jon [203,205,206]. Polaritet HESI izvora je odabran prema prirodi ispitivanih jedinjenja. Pošto je korišćena mobilna faza sa kiselim osobinama (pH 4,7) u njoj je bilo favorizovano nastajanje pozitivnih molekulskih jona, osim za nečistoću IV. Pozitivni joni nastaju protonovanjem molekula analita ili gubitkom elektrona iz njegove strukture, a negativno naelektrisani joni primanjem elektrona ili gubitkom protona iz molekula analita. Tako su ziprasidon, nečistoće I-III i V jonizovale u pozitivnom HESI modu $[M+H]^+$, a jedino nečistoća IV u negativnom modu $[M-H]^-$.

Na tripl kvadrupolskom masenom analizatoru optimizacija je vršena upotrebom FIA metode (engl. *Flow Injection Analysis, FIA*). Napravljeni su standardni rastvori supstanci u odgovarajućim koncentracijama (v. poglavlje 3.5.7.) i direktno injektovani u maseni detektor u struji mobilne faze, bez upotrebe hromatografske stacionarne faze, pri čemu su sukcesivno menjani parametri masenog detektora. Na ovaj način su optimizovani sledeći parametri: pritisak gasa za raspršivanje kroz kapilaru pri kružnom i direktnom protoku (engl. *sheat-aux gas pressure*), temperatura uparivača, napon na kapilari, temperatura kapilare, potencijal jonske optike (engl. *Tube Lens Offset*). Sva podešavanja radnih uslova instrumenta vršena su automatskim optimizacionim procedurama TSQ EZ Tune version 2.3.0.1206 SP1 Software-a, osim temperatura kapilare i uparivača koje su podešavane manuelno. Kao gas za raspršivanje i uparavanje korišćen je azot.

Optimizacija uslova tripl kvadrupolskog masenog analizatora za svaku ispitivanu supstancu je vršena posebno čime je omogućena potvrda struktura ispitivanih supstanci. Izvršena je MS-MS fragmentacija pri kojoj je prvi kvadrupol (Q1) korišćen za

izolovanje molekulskog jona $[M+H]^+$ ili $[M-H]^-$, drugi kvadrupol (Q2, kolizijska ćelija) za fragmentaciju, dok je treći kvadrupol (Q3) korišćen za izolovanje fragmenata. Metoda korišćena za fragmentaciju je fragmentacija van izvora – sudarom aktivirana disocijacija (engl. *Collision Activated Dissociation*, CAD) koja se zove još i sudarom indukovana disocijacija (engl. *Collision Induced Dissociation*, CID), i podrazumeva sudare jona sa neutralnim molekulom u gasnoj fazi i u sledećem koraku disocijaciju jona. U kolizijskoj ćeliji pod niskim pritiskom koristi se argon kao inertan gas [207]. Reakcija u masenom analizatoru (MS-MS) se može predstaviti kao:



gde je m_p^+ prekursor jon, m_f^+ fragmentni jon, a m_n predstavlja jednu ili više neutralnih vrsta (neutralni gubitak). Sa stanovništa masa važi: $m_p = m_f + m_n$.

U MS-MS eksperimentima odabrana je metoda praćenja odabrane reakcije (engl. *Selected Reaction Monitoring*, SRM), kada je maseni analizator podešen da prati jedan ili više poznatih jona prekursora i poznatih fragmentnih jona, čime je povećana osetljivost i selektivnost [203,205,206]. U odabranom odgovarajućem modu (HESI+/HESI-) uočen je jedan jonski prelaz koji je određen kao karakterističan za dalja ispitivanja tj. za određivanje sadržaja i identifikaciju. Q1 maseni analizator je podešen tako da se prati jedan jon prekursor - signal m/z molekulskog jona $[M+H]^+$, ili $[M-H]^-$, a analizator Q3 je podešen za praćenje jednog poznatog fragmentnog jona. Izbor fragmentnog jona kod SRM moda podrazumevao je fragment tj. m/z signal maksimalnog intenziteta u MS spektru. Tako da su vrednosti kolizijskih energija (E_{coll}) i potencijali jonske optike (*Tube Lens*, TL) za svako ispitivano jedinjenje podešene prema odabranim tranzicijama tj. jonskim prelazima. E_{coll} i TL su optimizovane kako bi se postigao najveći intenzitet odabranog jona, a time i što bolja osetljivost detektora. E_{coll} je povećavana u deset koraka od 5 do 60 V. Odabrani jonski prelazi za kvantifikaciju i identifikaciju ispitivanih jedinjenja su prikazani u Tabeli 17.

Tabela 17. Molekulski joni i optimalni uslovi za praćenje odabranih reakcija (SRM)

Supstanca (t_R min)	Molekulski jon (m/z)	Jonski prelaz (SRM) Q1→Q3	E_{coll} / TL
Nečistoća I (0,72)	$[M+H]^+$ 220	220→177	20 V/162 V
Ziprasidon (1,11)	$[M+H]^+$ 413	413→194	28 V/ 162 V
Nečistoća II (1,42)	$[M+H]^+$ 428	428→177	29 V/ 162 V
Nečistoća IV (1,6)	$[M-H]^-$ 228	228→192	16 V/68 V
Nečistoća III (3,61)	$[M+H]^+$ 841	841→413	19 V/128 V
Nečistoća V (4,52)	$[M+H]^+$ 546	546→327	31 V/162 V
Nepoznatanečistoća (5,13)	$[M+H]^+$ 823	823→749	35 V/233V

t_R – retenciono vreme

SRM – praćenje odabranih reakcija (engl. *Selected Reaction Monitoring*)

E_{coll} – kolizijska energija

TL – potencijal jonske optike (engl. *Tube Lens*)

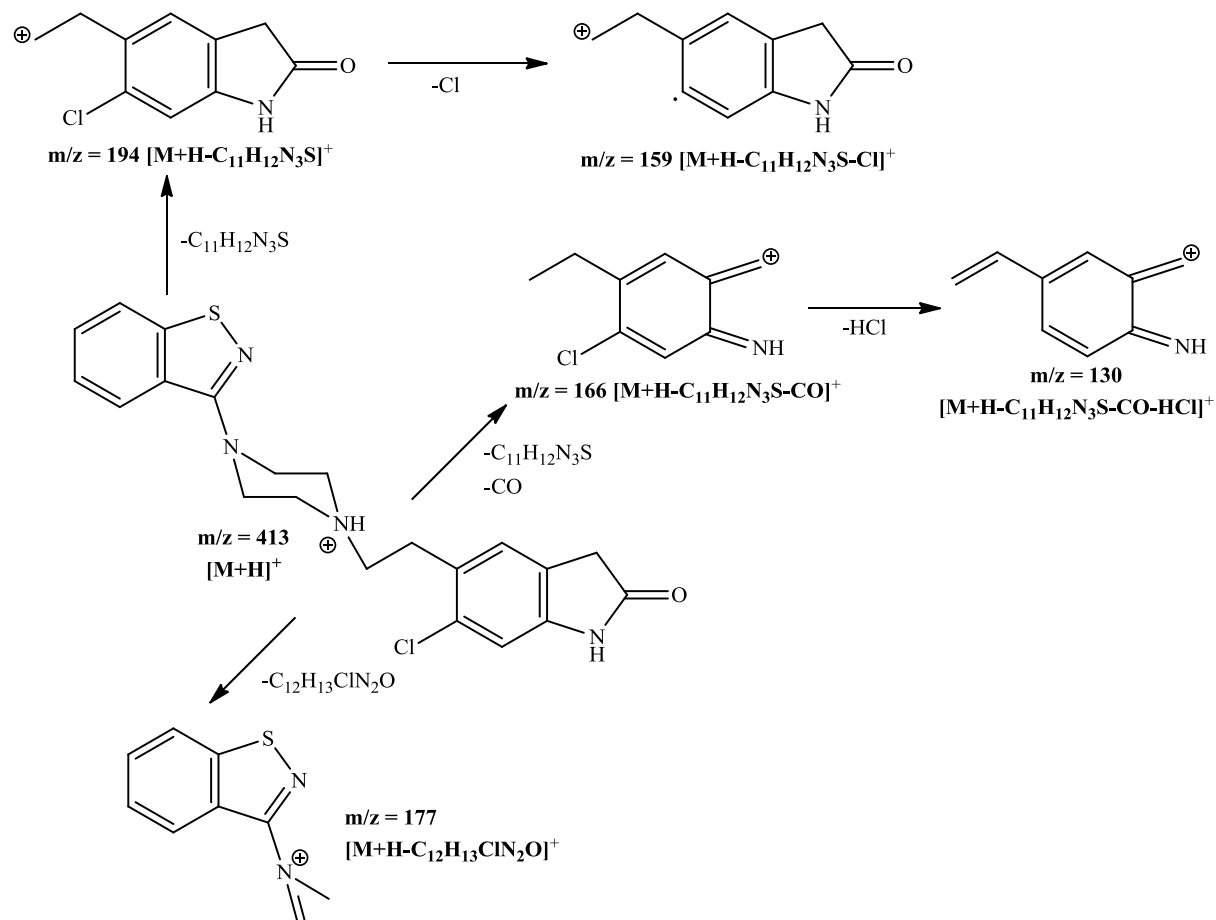
4.4.2. Fragmentacija ziprasidona i njegovih nečistoća

Direktnim injektovanjem u maseni detektor (*FIA* metoda) dobijeni su CID maseni spektri za poznata jedinjenja, ziprasidon i nečistoće I-V. Sva jedinjenja su identifikovana i precizno su izmerene mase. U Tabeli 18. prikazani su glavni fragmenti dobijeni MS-MS analizom. Predloženi mehanizam fragmentacije ziprasidona i nečistoća I-V je predstavljen na Slikama broj 65. i od 67. do 71.

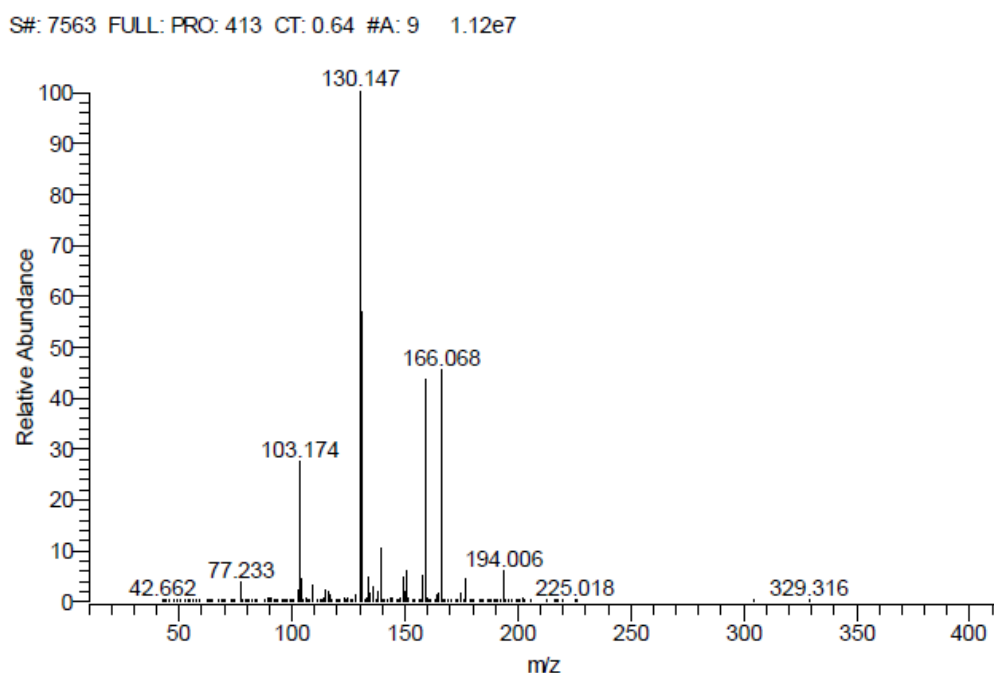
Tabela 18. MS-MS fragmentacija ziprasidona i njegovih nečistoća

Supstanca (t_R min)	Molekulski jon (m/z)	Glavni fragmenti (m/z)
Nečistoća I (0,72)	$[M+H]^+$ 220	177, 136, 134
Ziprasidon (1,11)	$[M+H]^+$ 413	194, 177, 166, 159, 130
Nečistoća II (1,42)	$[M+H]^+$ 428	363, 203, 180, 177
Nečistoća IV (1,6)	$[M-H]^-$ 228	192, 156
Nečistoća III (3,61)	$[M+H]^+$ 841	415, 413, 196, 194
Nečistoća V (4,52)	$[M+H]^+$ 546	327, 292, 249, 177
Nepoznata nečistoća (5,13)	$[M+H]^+$ 823	749, 413, 411, 196, 194,

S obzirom da je ziprasidon aktivna supstanca usled čije nestabilnosti nastaju nečistoće, pre karakterizacije *nepoznate nečistoće* potrebno je bilo razjasniti mehanizam fragmentacije ziprasidona. Maseni spektar ziprasidona je pokazao protonovani molekulski jon na m/z 413, a CID spektar je pokazao glavne fragmentne jone na m/z 194, 177, 166, 159 i 130 (Slika 65. i 66.). Predloženi mehanizam fragmentacije ziprasidona je predstavljen na Slici 65.

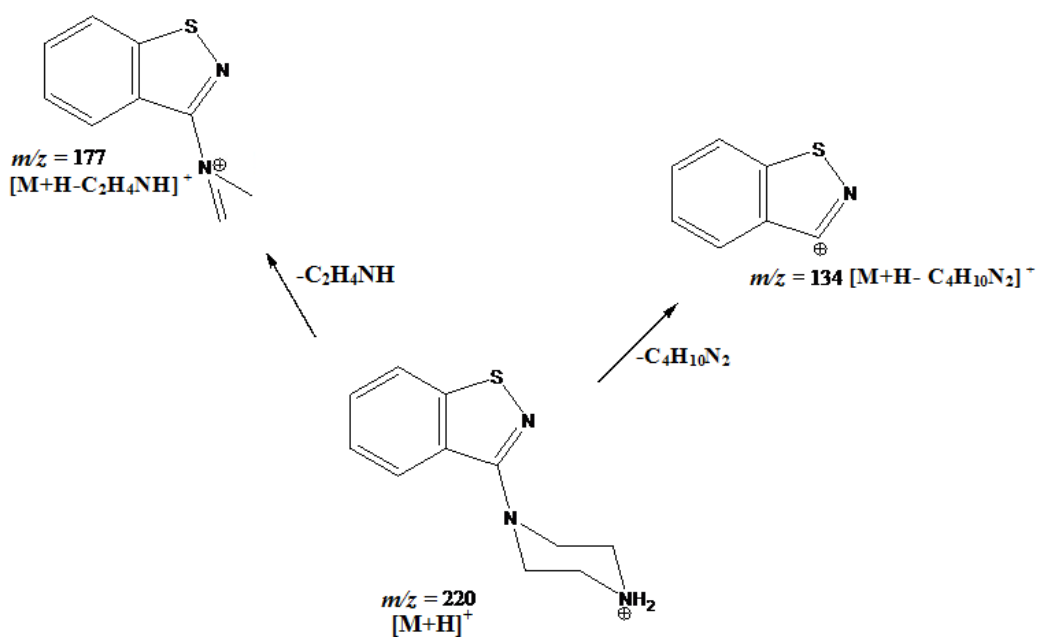


Slika 65. Mehanizam nastajanja glavnih MS-MS fragmenata ziprasidona

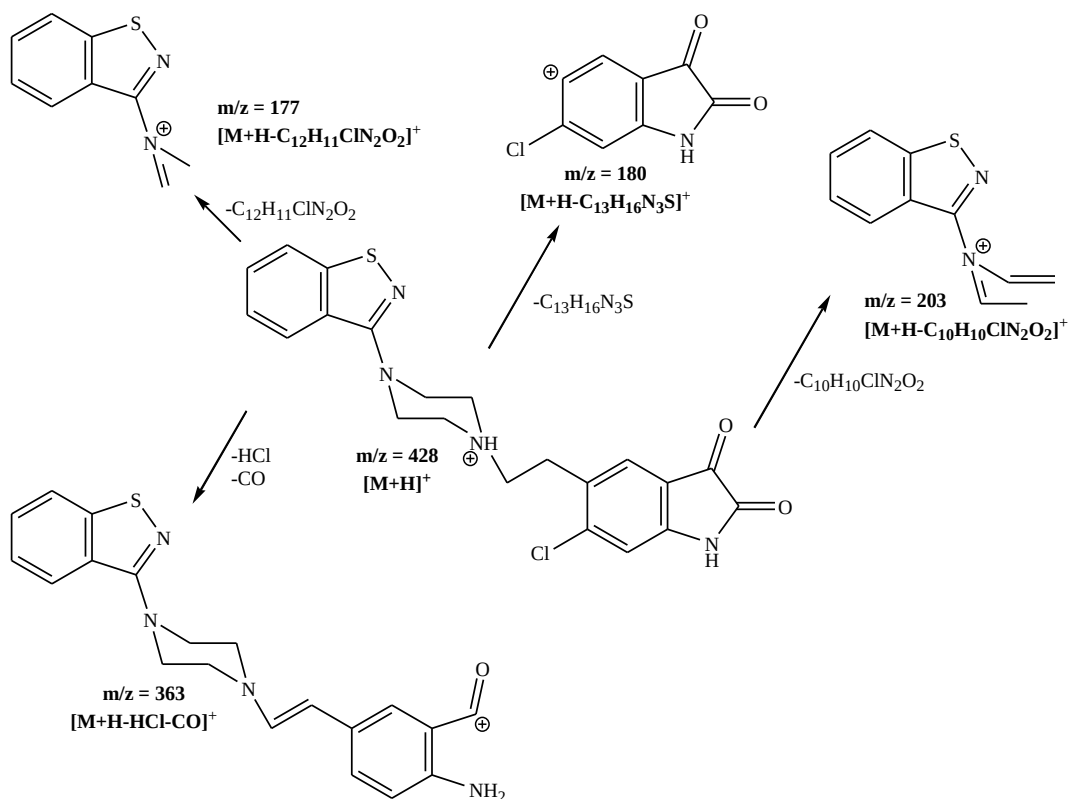


Slika 66. HESI maseni spektar ziprasidona ($[M+H]^+$, 413)

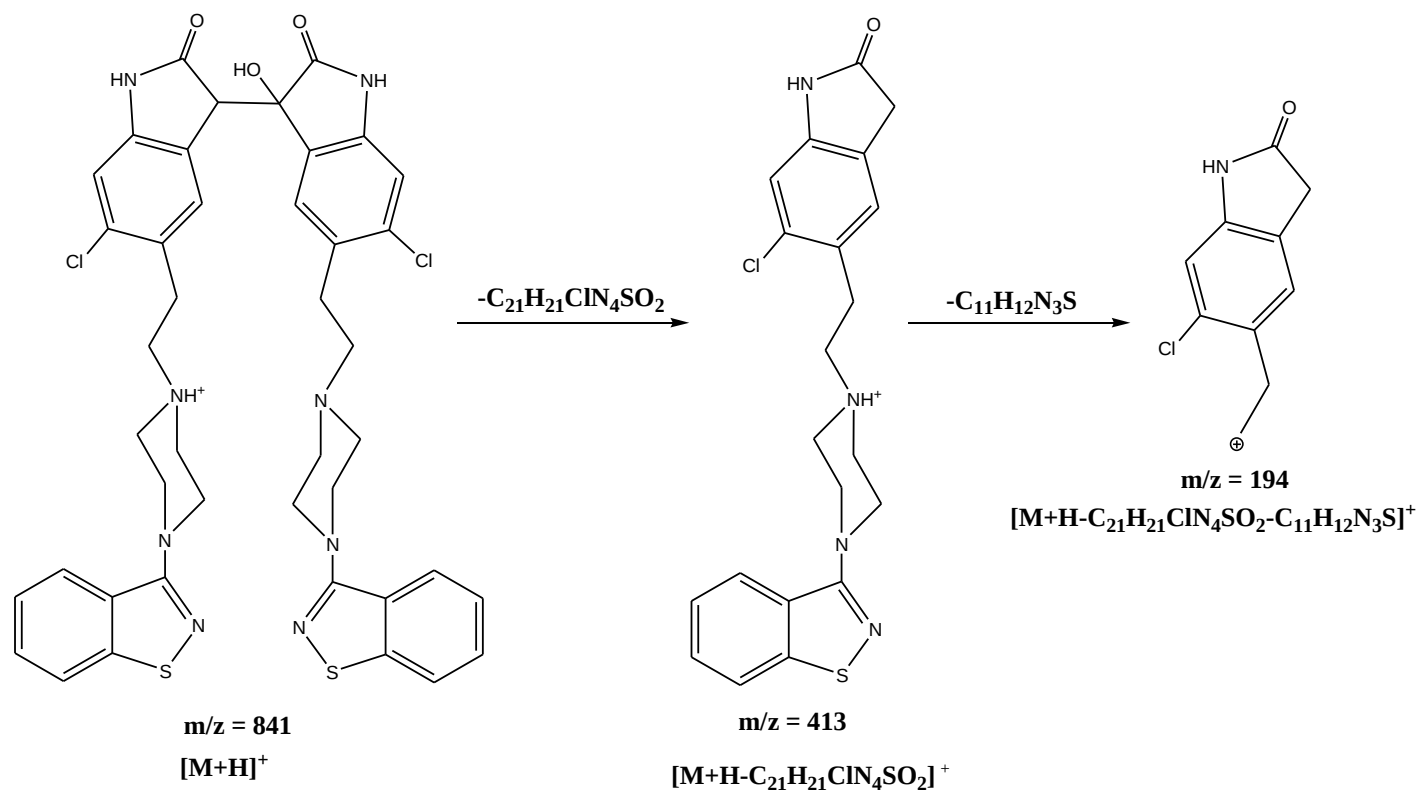
Fragmentni jon na m/z 194 bi mogao da nastane nakon neutralnog gubitka benzoizotiazol-piperazinske strukture čija je molekulska masa 219. Dolazi do cepanja veze između etilenskog lanca i piperazina uz zadržavanje naelektrisanja na C_2 ugljeniku etilenskog lanca $[M+H-C_{11}H_{12}N_3S]^+$. Nakon gubitka mase od 219 može doći do gubitka slobodnog radikala Cl pri čemu nastaje fragment na m/z 159 $[M+H-C_{11}H_{12}N_3S-Cl]^+$, ili do gubitka karbonilne grupe $-CO$ i nastaje fragment na m/z 166 $[M+H-C_{11}H_{12}N_3S-CO]^+$. Nakon gubitka karbonilne grupe može doći do gubitka HCl pri čemu nastaje fragment na m/z 130 $[M+H-C_{11}H_{12}N_3S-CO-HCl]^+$. Pojava fragmenta na m/z 177 što je vrednost za 236 umanjena u odnosu na ziprasidon $[M+H-C_{12}H_{13}ClN_2O]^+$, odgovara strukturi koja nastaje fragmentacijom na piperazinskom prstenu i eliminacijom dela strukture molekule koja sadrži indolinon (Slika 65.). Fragmentni jon m/z 177 se javlja i kod masenih spektara nečistoća I, II i V (Tabela 18., Slike 67., 68. i 71). Takođe, odlaskom piperazinske strukture kod nečistoće I javlja se fragment m/z 134 ($220 \rightarrow 134$: $[M+H-C_4H_{10}N_2]^+$) što ukazuje na intaktnu strukturu i na stabilnost benzoizotiazolskog prstena prema fragmentaciji. Predloženi mehanizam fragmentacije ziprasidona je dodatno podržan prethodno objavljenim rezultatima iz literature [58,80,85].



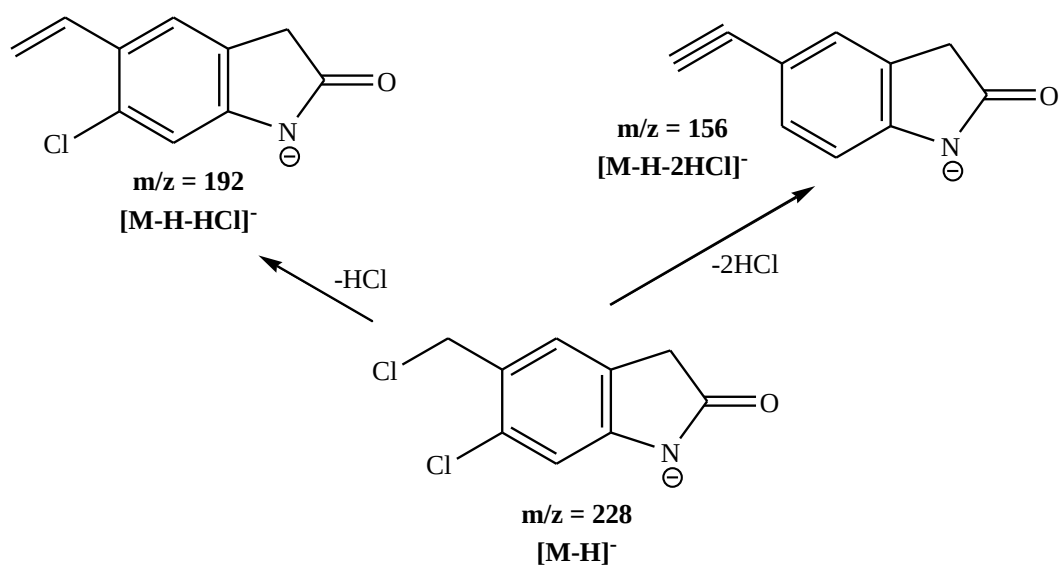
Slika 67. Mehanizam nastajanja glavnih MS-MS fragmenata nečistoće I



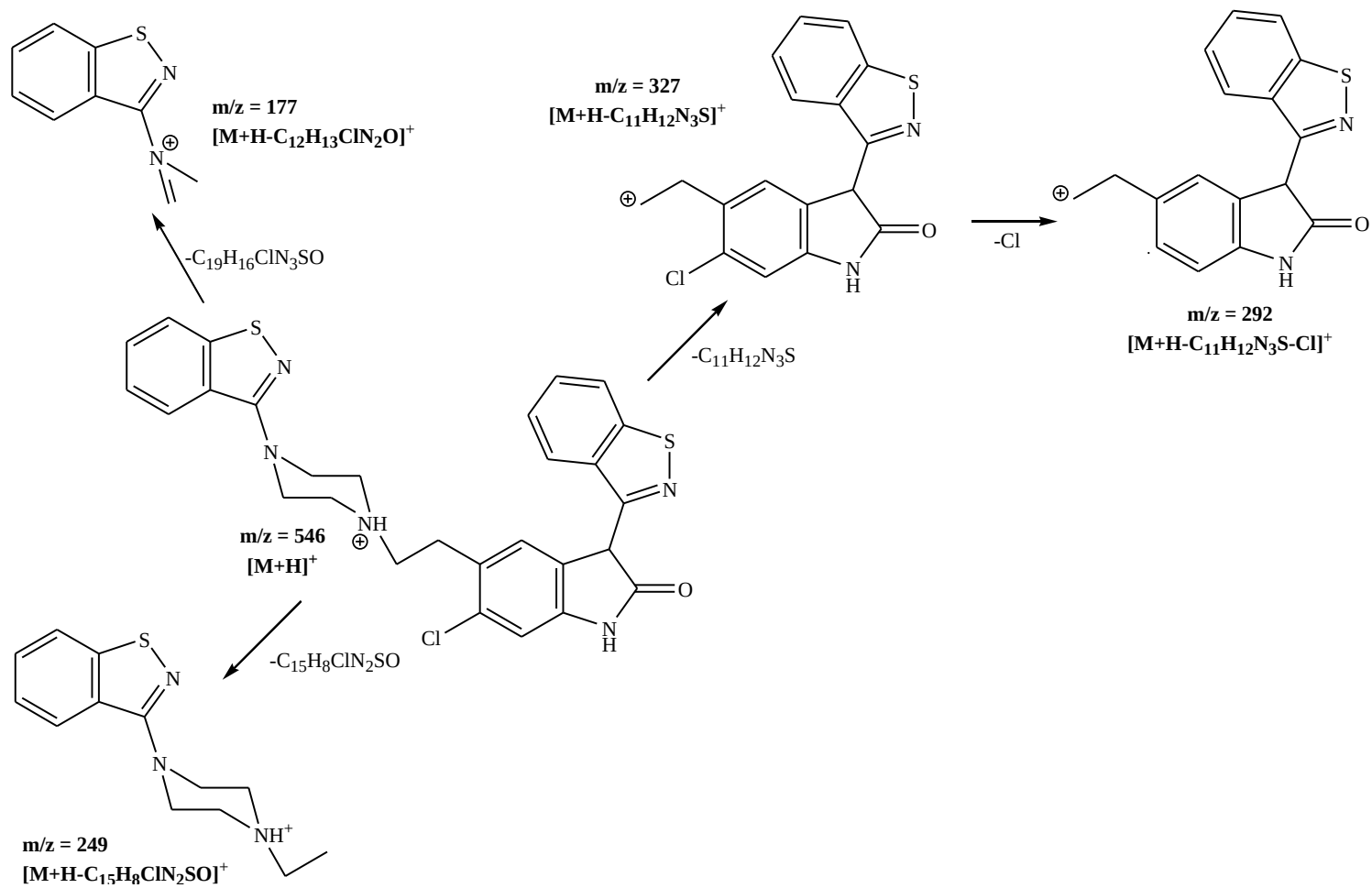
Slika 68. Mehanizam nastajanja glavnih MS-MS fragmenata nečistoće II



Slika 69. Mehanizam nastajanja glavnih MS-MS fragmenata nečistoće III



Slika 70. Mehanizam nastajanja glavnih MS-MS fragmenata nečistoće IV



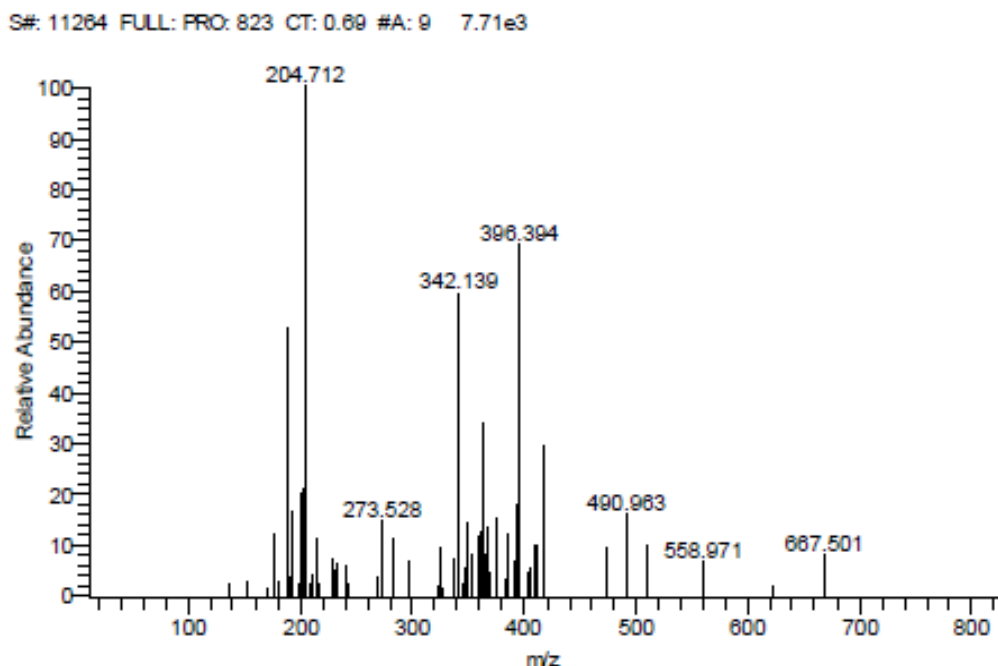
Slika 71. Mehanizam nastajanja glavnih MS-MS fragmenata nečistoće V

Takođe, prisustvo sličnih fragmentnih jona u MS-MS spektrima ziprasidona i njegovih nečistoća, kao što je prikazano u Tabeli 18. i na slikama 65. i od 67. do 71., ukazuje na sličnu strukturu i način fragmentacije, odnosno da supstitucija na α položaju indolinonske strukture ziprasidona ne utiče značajno na način fragmentacije. Tako do cepanja dolazi uglavnom između etilenskog mosta i piperazinskog azota kada nastaju fragmentni joni m/z 194, 196 (ziprasidon, nečistoća III), odnosno fragmentni jon m/z 327 kod nečistoće V koji je za 133 veći u odnosu na isti fragment ziprasidona što ukazuje na supstituciju na indolinonskom prstenu ziprasidona sa benzoizotiazolskom strukturom kod nečistoće V. Na prisustvo dodatne benzoizotiazolske strukture na indolinonskom prstenu ukazuje i fragment m/z 292 koji odgovara mehanizmu fragmentacije ziprasidona za fragment m/z 159 (Slika 71.).

Za *nepoznatu nečistoću* dobijen je signal za protonovan molekulski jon u pozitivnom HESI modu na m/z 823 koji po masi nije odgovarao nijednoj poznatoj nečistoći. Stajanjem rastvora standarda uočen je porast signala na m/z 823 na TIC-u. Urađena je MS-MS fragmentacija ovog molekulskog jona. Dobijeni maseni spektar i put fragmentacije bio je veoma sličan nečistoći III. Gubici sličnih neutralnih struktura kod ove dve nečistoće ukazivali su na to da bi njihove strukture mogle da budu veoma slične tj. na prisustvo skoro istih funkcionalnih grupa.

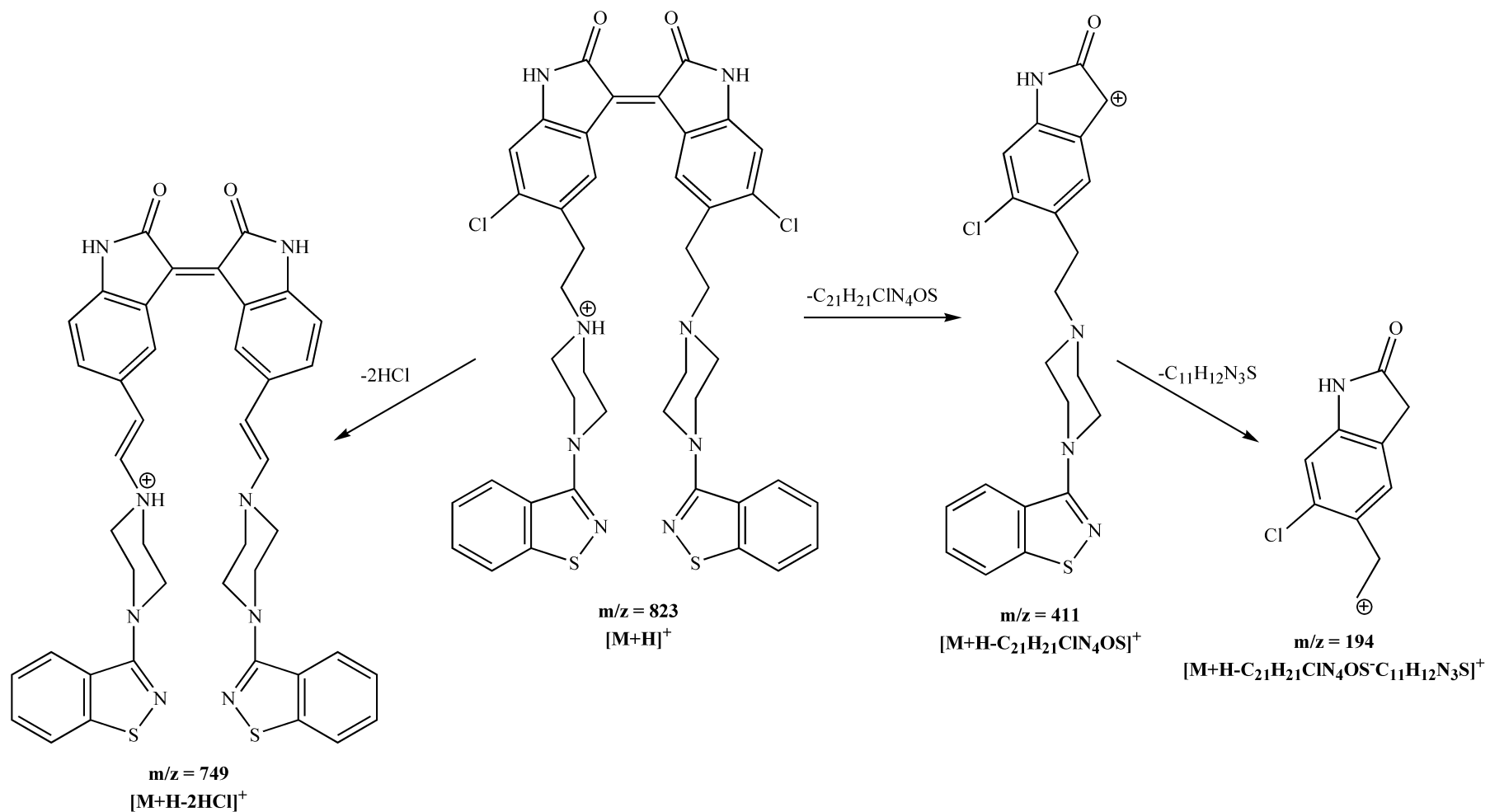
MS-MS fragmentacija *nepoznate nečistoće* dala je glavne fragmentne jone na m/z 749, 413, 411, 196, 194 (Tabela 18.) što je ukazivalo da je način fragmentacije sličan sa nečistoćom III čija je masa molekulskog jona m/z 841.

Signal fragmentnog jona na m/z 749 je vrednost za 74 manja u odnosu na polazni molekulski jon što bi moglo da odgovara eliminaciji 2HCl. Fragmenti, tj. izgled masenog spektra oko signala m/z 411 (413) kod *nepoznate nečistoće* odnosno signala na m/z 413 (415) kod nečistoće III, ukazuje na prisustvo jednog atoma hlora u fragmentu tj. na izotopski obrazac (engl. *pattern*) koji je karakterističan za hlor koji se javlja u obliku dva prirodna izotopa ^{37}Cl i ^{35}Cl (Slika 72.). Naime prisustvo elemenata prirodnih izotopa ima za posledicu pojavu jona na masi m/z $M^+ + 1$, $M^+ + 2$, $M^+ + 3$, $M^+ + 4$ u zavisnosti od vrste i količine prisutnog izotopa [206].



Slika 72. HESI maseni spektar nepoznate nečistoće ($[M+H]^+$, 823)

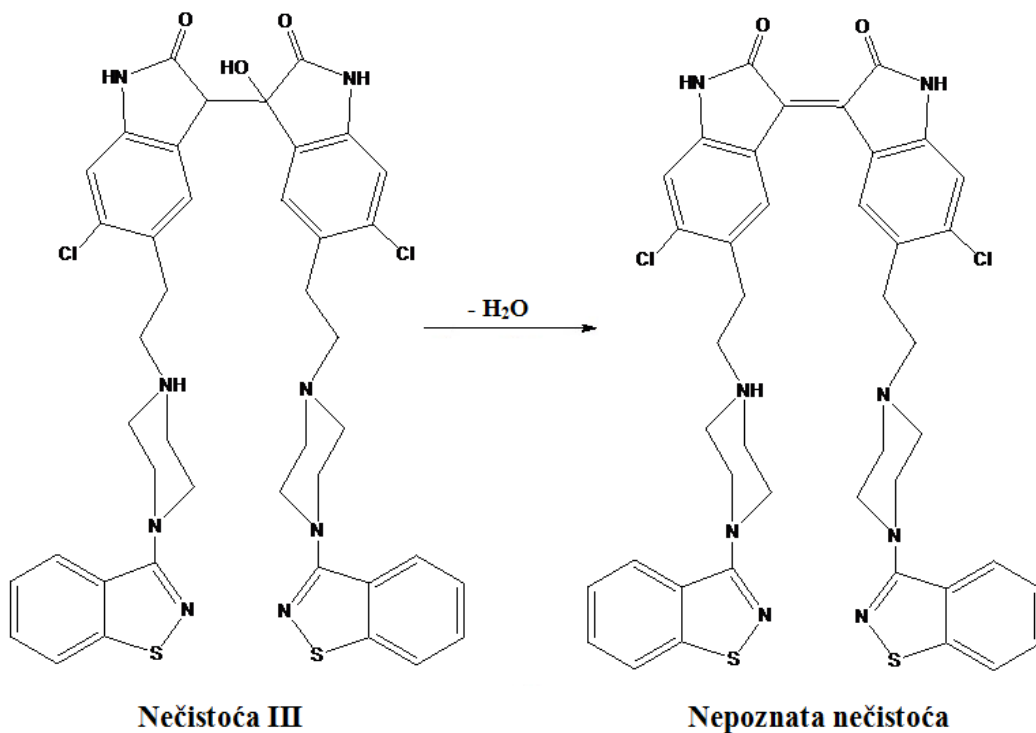
Prisustvo fragmentnog jona na m/z 411 odnosno 413 kod nečistoće III ukazivao je na strukturu koja odgovara molekuli ziprasidona. Kod nečistoće III ona nastaje neutralnim gubitkom mase 428, a kod *nepoznate nečistoće* neutralnim gubitkom mase 412 što je vrednost manja za 16 i mogla bi da odgovara strukturi koja ima 1 kiseonik manje u odnosu na nečistoću III. Na osnovu predloženog mehanizma MS-MS fragmentacije nečistoće III i njene molekulske mase m/z 841, može se pretpostaviti da je i *nepoznata nečistoća* odgovarajući dimer. Razlika u masama između nečistoće III i *nepoznate nečistoće* ukazuje da je masa *nepoznate nečistoće* umanjena za 18, što bi moglo da odgovara odlasku molekula vode. Dakle, s obzirom na signal m/z protonovanog molekulskog jona nepoznate nečistoće koji je iznosio m/z 823 i MS-spektar, odnosno predloženi mehanizam fragmentacije, najverovatnija struktura *nepoznate nečistoće* bi mogla da bude struktura predstavljena na Slici 73.



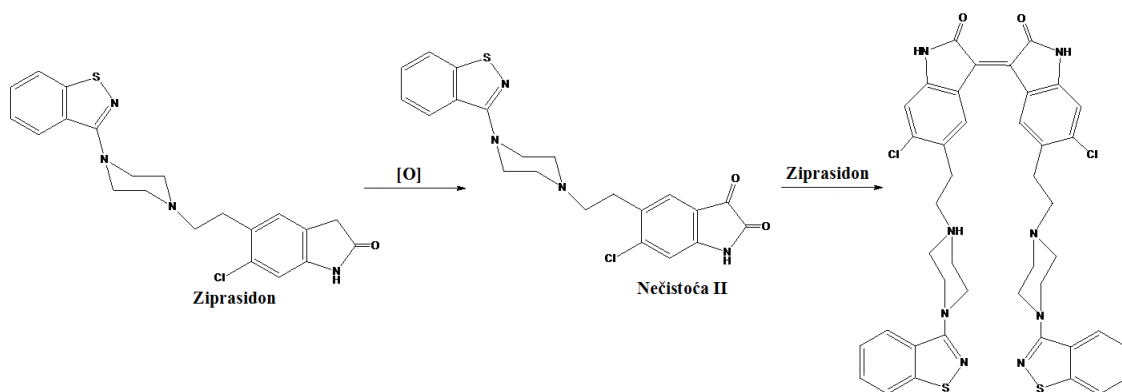
Slika 73. Mehanizam nastajanja glavnih MS-MS fragmenata i predložena struktura *nepoznate nečistoće*

Pretpostavlja se da bi ova nečistoća mogla da nastane dehidratacijom nečistoće III (Slika 74A.).

A)



B)



Slika 74. Potencijalni mehanizmi nastajanja *nepoznate nečistoće*

Pretraživanjem literature nađeno je da je to oksidativna degradaciona nečistoća koja nastaje usled nestabilnosti ziprasidona u kompleksu sa ciklodekstrinima u vodenim rastvorima, a kod ciklodekstrina sa negativnim bočnim grupama, ova degradacija je ubrzana. Naime, prvo nastaje oksidativna nečistoća II (degradant I), a zatim se aldolnom

kondenzacijom između nečistoće II i ziprasidona formira degradant II (*nepoznata nečistoća*), Slika 74B [40].

MS-MS studijom je eksperimentalno potvrđena struktura ove nečistoće koja je pretpostavljena QSRR studijom na osnovu predviđenog retencionog vremena. Na ovaj način je i eksperimentalnim podacima pokazan veliki prognostički potencijal kreiranog QSRR modela (v. *poglavlje 4.3.2.*) što je i jedini način da se sa sigurnošću utvrdi prediktivna moć modela [98].

4.5. RAZVOJ I OPTIMIZACIJA UPLC METODE ZA ODREĐIVANJE ZIPRASIDONA I NJEGOVIH NEČISTOĆA

Nakon razvoja reproduktivne i osetljive RP-HPLC metode, zlatnog standarda u farmaceutskoj analizi, pristupilo se razvoju hromatografske tehnike novije generacije UPLC metode za određivanje ziprasidona u prisustvu sintetskih i degradacionih nečistoća. Prednosti ove metode su kraće trajanje analize, ekonomičnost metode (ušteda rastvarača, manje otpada), veća osetljivost metode, često oštriji pikovi i bolja rezolucija usled unapređene hemije površine i veličine čestica stacionarnih faza ($< 2 \mu\text{m}$). Krenulo se od pretpostavke da bi nova UPLC metoda značajno smanjila vreme izvođenja analize, a da se pri tome ne izgube hromatografske performanse izvorne metode (broj teoretskih platoa da ostane isti ili veći u odnosu na izvornu metodu) s obzirom na povećanu potrebu za ultra brzim metodama sa dobrom efikasnošću i rezolucijom gde se razdvajanje postiže za samo nekoliko minuta ili čak sekundi [208]. Takođe, radne grupe za hromatografiju Evropske i Američke farmakopeje razmatraju uvođenje monografije za UPLC metodu i uslove transfera metode koji su još uvek nedovoljno istraženi [43,44]. Razvoj nove UPLC metode zahtevao je revalidaciju metode koja je izvršena u skladu sa ICH smernicama i zahtevima farmakopeja.

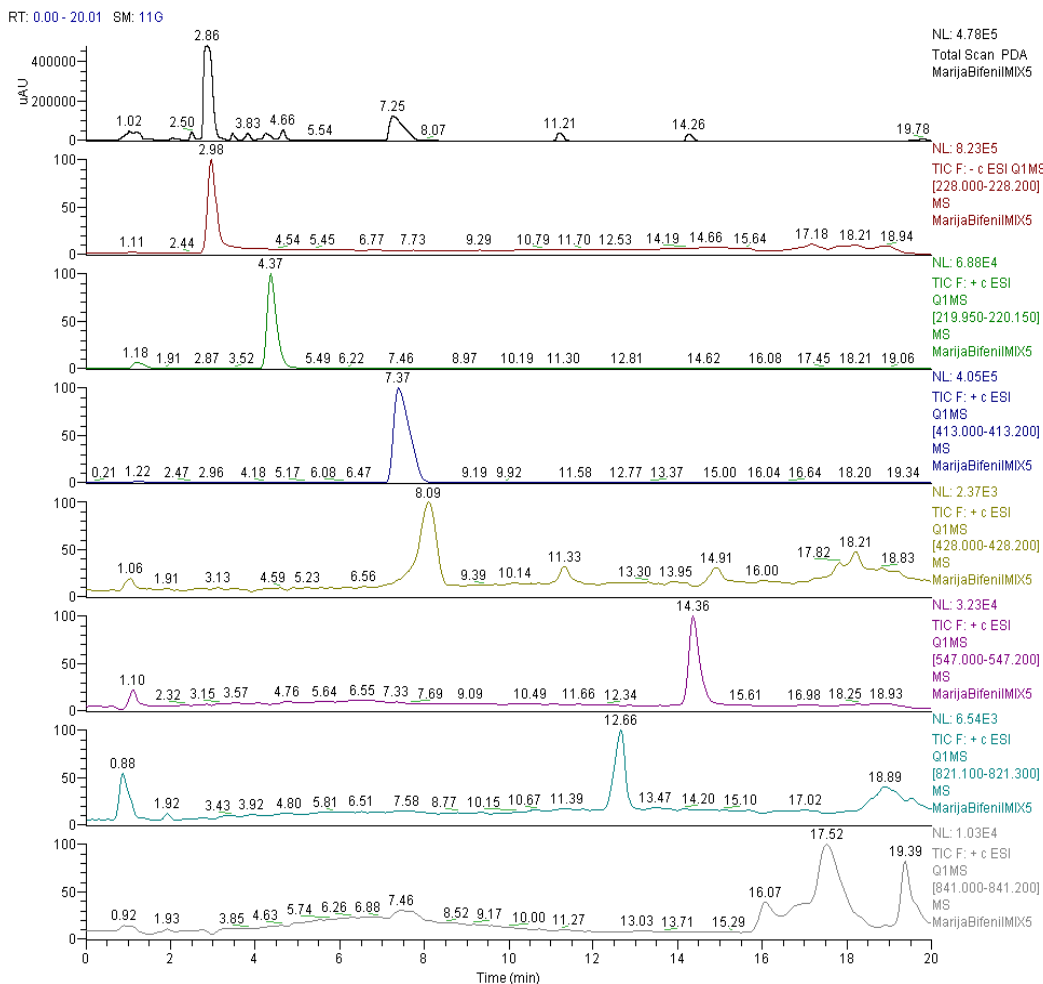
Ispitivanje hromatografskog ponašanja supstanci vršeno je kroz proces optimizacije UPLC metode upotrebom PLS metode i hromatografskih funkcija CRF i CEF kako bi se dobio optimalan odgovor sistema. Da bi se ispitale i identifikovale promenljive sa značajnim uticajem na hromatografsko ponašanje analita radi određivanja opsega u kojem će se one pratiti, izvedena su preliminarne ispitivanja.

4.5.1. Preliminarna ispitivanja

Prvo su razmatrani hromatografski uslovi validirane RP-HPLC metode (v. poglavlje 3.3.7.) koji mogu da se primene na UPLC metodu uz upotrebu PDA i masenog detektora kako bi se omogućila identifikacija svih nečistoća. Prvi eksperimenti su izvedeni pod istim uslovima u pogledu pH mobilne faze (2,5), organskog modifikatora (ACN) i na nepolarnim C18 UPLC stacionarnim fazama. Gradijent je podešen pomoću programa - „HPLC calculator“ [209] koji automatski podešava optimalne uslove za transfer metode kod gradijentnog eluiranja na osnovu odgovarajućih jednačina koje uzimaju u obzir dimenzije nove stacionarne faze (dijametar, dužinu, veličinu čestica kojima je punjena stacionarna faza) [208]. Fosfatni pufer je zamenjen sa isparljivim modifikatorima koji su pogodni za rad na masenom detektoru. Prvo je korišćen 0,1% rastvor mravlje kiseline i stacionarna faza Hypersil Gold (50 x 2,1 mm, 1,9 μ m). Strukturna sličnost ziprasidona i nečistoće II je i u ovom sistemu prouzrokovala mnoge analitičke probleme. Eksperimentalnim ispitivanjima je utvrđeno da transfer metode sa HPLC na UPLC stacionarnu fazu nije dao optimalno razdvajanje i oblik pikova pri automatski podešenim uslovima na osnovu jednačina za transfer metode. Vršeno je više modifikacija gradijenta, ali to nije dovelo do razdvajanja kritičnog para (ziprasidon i nečistoća II) kao ni nečistoća III i IV. Na istoj stacionarnoj fazi je ispitivan uticaj povećanja pH vrednosti u opsegu od 3,0 do 5,0 što nije doprinelo razdvajanju i došlo je do cepanja pikova. Dobijeni rezultati su ukazali da je potrebno promeniti stacionarnu fazu.

Hromatografsko ponašanje je dalje ispitivano na stacionarnim fazama punjenim sa bazno deaktiviranim sferičnim česticama, a različitim u pogledu veličine čestica i hemije RP stacionarne faze: Pinnacle[®] DB C18 (50 x 2,1 mm, 1,9 μ m), Acquity UPLC BEH (50 x 2,1 mm, 1,7 μ m), Acquity UPLC BEH Phenyl (50 x 2,1 mm, 1,7 μ m). Svaka od stacionarnih faza ima različitu hidrofobnost, silanolnu aktivnost, hidrolitičku stabilnost i hemijske interakcije sa analitom [210]. Performanse stacionarnih faza su poredene pod istim hromatografskim uslovima. Veća brzina razdvajanja, rezolucija i osetljivost je postignuta na stacionarnim fazama sa manjim česticama (1,7 μ m). Očekivalo se da će veoma nepolarna stacionarna faza sa specifičnim C6 – fenil ligandom pokazati najveću selektivnost za ispitivana jedinjenja, pogotovu za razdvajanje kritičnog para (ziprasidon i nečistoća II). Razdvajanje je dobijeno, ali sa

velikom retencijom manje polarnih nečistoća (*nepoznata nečistoća*, V i III) tako da je vreme izvođenja analize bilo isto kao i u RP-HPLC sistemu (Slika 75.). Ubrzavanjem gradijenta došlo je do koelucije kritičnog para (ziprasidon i nečistoća II). Primenom istih uslova gradijenta dobijeno je razdvajanje na stacionarnoj fazi Acquity UPLC BEH (50x2,1 mm, 1,7 μ m) koja je odabrana za dalja ispitivanja.

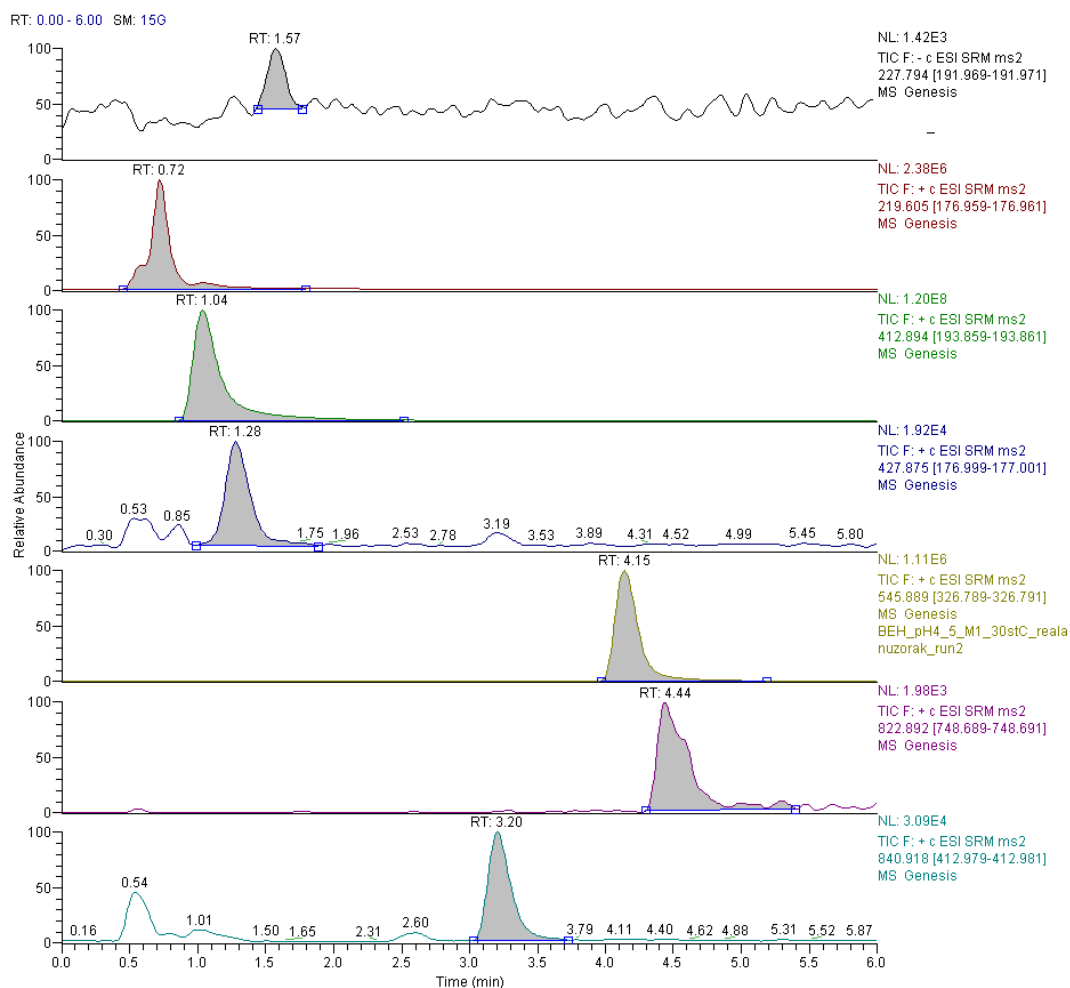


Slika 75. TIC (*Total Ion Chromatogram*) i SIM (*Selective Ion Monitoring*) hromatogrami rastvora - M_{sm} na koloni *Acquity UPLC BEH Phenyl* (50x2,1 mm, 1,7 μ m), kanali: 1(t_R -2.86min) - nečistoća IV, 2 (t_R -4.37min)-nečistoća I, 3 (t_R -7.37min)-ziprasidon, 4 (t_R -8.09min)-nečistoća II, 5 (t_R -14.36min)-nečistoća V, 6 (t_R -12.66min)-nepoznata nečistoća, 7 (t_R -17.52min)-nečistoća III

Mravlja kiselina je kao modifikator dala nezadovoljavajuću simetriju pikova i rezoluciju pa je ispitivan uticaj pufera, koji su pogodni za separaciju jedinjenja u kiselom opsegu pH vrednosti, amonijum-acetata i amonijum-formijata. Kako su preliminarna ispitivanja (v. *poglavlje 4.1.1.*) pokazala da promena pH vrednosti ima značajan uticaj na retenciju svih ispitivanih supstanci, odlučeno je da se izabere opseg u

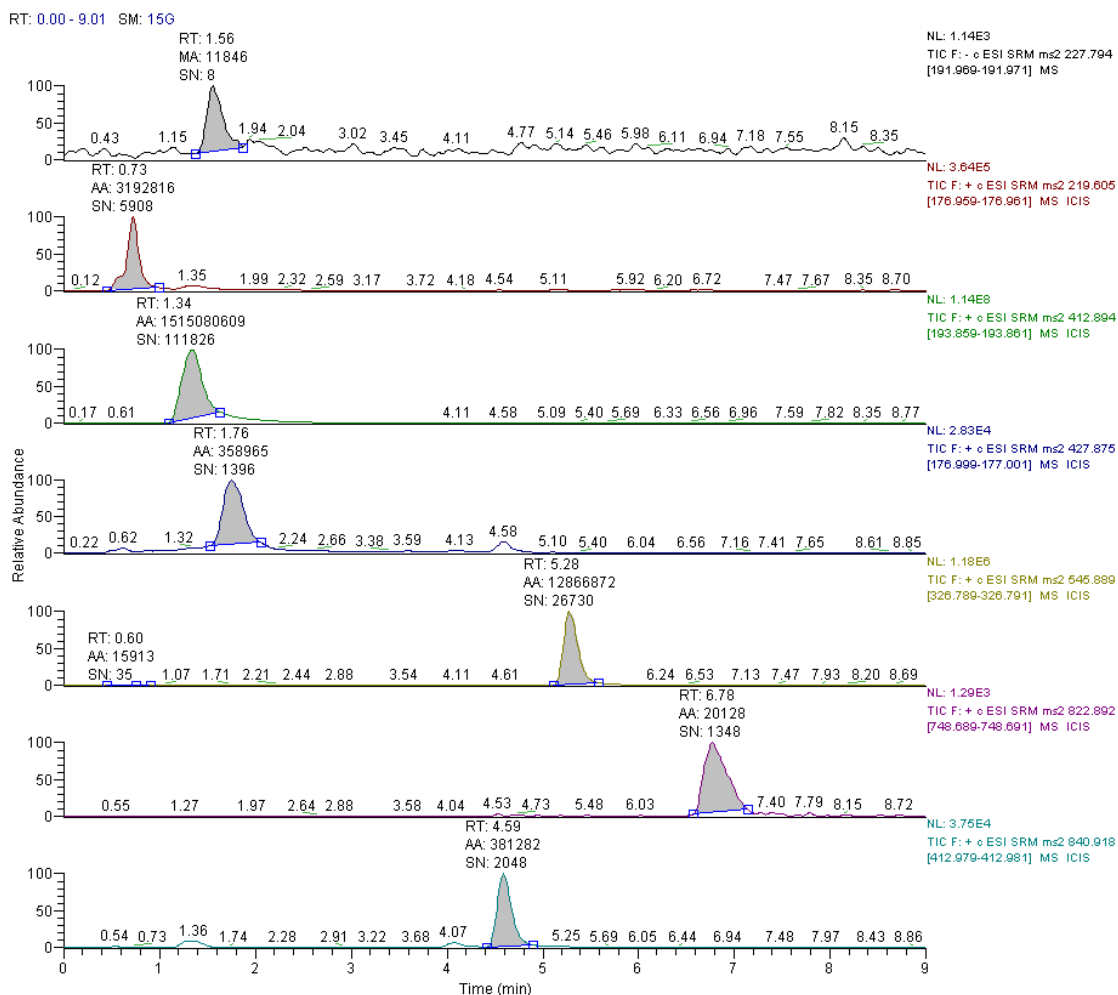
come će pH pufera biti kontrolisan u toku analize, s obzirom da se kapacitet pufera smanjuje dodatkom tj. razblažnjem sa acetonitrilom [211]. Ovaj opseg je bio od 3,0 do 5,0 što je približno kod oba pufera: pK_a pufera ± 1 [212,213]. Pri istim uslovima modifikator amonijum-formijat je pokazao bolji uticaj na simetriju pikova i rezoluciju, tako da je on odabran za dalja ispitivanja.

Uticaj promene pH vrednosti na hromatografsko ponašanje ispitivanih supstanci je sličan kao u HPLC sistemu. Pri pH vrednosti 3,5 dolazi do koelucije dva para pikova: nečistoća II/ziprasidon i nečistoća III/IV. Pri pH 4,5 dolazi do zamene u redosledu eluiranja, povećava se retencija nečistoće II u odnosu na ziprasidon, i nečistoće III u odnosu na nečistoću IV. Smanjena je rezolucija između nečistoće V i *nepoznate nečistoće* (Slika 76.).



Slika 76. SRM hromatogram rastvora- M_{sm} , kanali:1(t_R -1.57 min) - nečistoća IV, 2 (t_R -0.72min)-nečistoća I, 3 (t_R -1.04min)-ziprasidon, 4 (t_R -1.28min)-nečistoća II, 5 (t_R -4.15min)-nečistoća V, 6 (t_R -4.44min)-nepoznata nečistoća, 7 (t_R -3.20min)-nečistoća III

Pri pH vrednosti 4,8 povećava se rezolucija ovog para, ali se preklapaju pikovi nečistoće II i IV. Kada je pH vrednost povećana na 5,0 menja se redosled eluiranja, retencija nečistoće II se povećala u odnosu na nečistoću IV i vreme izvođenja analize je duže (Slika 77.).



Slika 77. SRM hromatogram radnog rastvora standarda, kanali: **1**(t_R -1.56 min) - nečistoća IV, **2** (t_R -0.73min)-nečistoća I, **3** (t_R -1.34min)-ziprasidon, **4** (t_R -1.76min)-nečistoća II, **5** (t_R -5.28min)-nečistoća V, **6** (t_R -6.78min)-nepoznata nečistoća, **7** (t_R -4.59min)-nečistoća III

Praćen je i uticaj pH vrednosti na jonizaciju ispitivanih jedinjenja tj. na odgovor masenog detektora, s obzirom na niske koncentracije analita koje su ispitivane. Niža vrednost pH, tj. veće koncentracije mravlje kiseline u puferu dovode do supresije jona i signala. Bilo je potrebno pronaći kompromisno rešenje u smislu optimalnog razdvajanja i postizanja visoke osetljivosti i dobrog signala MS detektora. Istovremeno je praćen i

uticaj koncentracije pufera. Pri višim koncentracijama pufera javljao se slabiji signal i supresija jona, a pri nižim lošije razdvajanje. Kao optimalna koncentracija pufera odabrana je 10mM.

Preliminarna ispitivanja su pokazala da promena pH vrednosti ima značajan uticaj na retenciju svih ispitivanih supstanci i kod UPLC sistema. Ovo je bilo očekivano, s obzirom da su sva ispitivana jedinjenja osim nečistoće IV jonizovana u kiselom opsegu pH. Rezultati preliminarnih ispitivanja ukazivali su na to da je sistem jako osetljiv na promene pH vrednosti u opsegu od 4,5 do 5,0 i da je radi pronalaženja optimalnih uslova potrebno ispitati uticaj promene pH u više tačaka koje se razlikuju za male inkremente pH jedinica.

Kao organski rastvarač prvo je korišćen metanol, ali bile su potrebne velike koncentracije metanola za eluiranje manje polarnih jedinjenja sa stacionarne faze, što nije bilo ekonomično. Sa acetonitrilom su dobijena znatno kraća retencionna vremena i bolji oblik pikova i razdvajanje, pa je acetonitril odabran kao organski modifikator.

Sledeći faktor koji je razmatran je bila temperatura stacionarne faze. Ispitivanja su pokazala da smanjenjem temperature stacionarne faze ispod 20 °C dolazi do porasta pritiska u sistemu. Variranje temperature stacionarne faze od 25-35 °C različito je uticalo na retenciono ponašanje ispitivanih jedinjenja. Na retenciono ponašanje nečistoća veće polarnosti (I i II) i ziprasidona nije imalo uticaja, dok je značajno uticalo na manje polarne nečistoće. Naime, njihova retencija se povećavala sa povećanjem temperature stacionarne faze, a retencija nečistoće IV se smanjivala. Bilo je neophodno detaljno ispitati ovako kompleksan uticaj promene temperature u pomenutom opsegu.

Tokom svih preliminarnih ispitivanja volumen injektovanja (10 µL) je održavan na konstantnoj vrednosti. U početku protok je bio 0,2 mL min⁻¹. S obzirom da promena protoka značajno utiče na retenciono ponašanje, ispitivano je povećanje protoka u cilju smanjenja retencije i vremena izvođenja analize. Protok je povećavan za po jednu jedinicu do 0,6 mL min⁻¹ kada je primećen veliki pritisak u sistemu. Pri protoku od 0,4 - 0,6 mL min⁻¹ zapaženo je lošije razdvajanje. Odlučeno je da se uticaj protoka na retenciju i razdvajanje ispitivanih jedinjenja detaljno ispita u opsegu od 0,25 – 0,35 mL min⁻¹ tokom razvoja i optimizacije metode primenom eksperimentalnog dizajna.

4.5.2. Optimizacija hromatografskih uslova

Preliminarnim eksperimentalnim ispitivanjima izdvojili su se faktori koji će se koristiti za modelovanje hromatografskog ponašanja ziprasidona i njegovih nečistoća u RP-UPLC sistemu primenom eksperimentalnog dizajna. Takođe, odabran je i opseg u kome je potrebno ispitati njihov uticaj. Ovaj sistem se pokazao kao veoma osetljiv na male promene pH vrednosti, temperature i protoka pa su: pH vrednost amonijum-formijat pufera (4,5; 4,6; 4,7; 4,8 i 4,9), temperatura stacionarne faze (25; 27,5; 30; 32,5 i 35°C) i protok (0,250; 0,275; 0,300; 0,325 i 0,350 mL min⁻¹) odabrani za optimizaciju hromatografskih uslova.

Optimizacija hromatografskih uslova i ispitivanje retencionog ponašanja vršeno je primenom – metode parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS), hromatografske funkcije odgovora - CRF [128] i eksponencijalne hromatografske funkcije CEF [127].

4.5.2.1. Metoda parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS) u modelovanju RP-

UPLC sistema za ispitivanje zipasidona i njegovih nečistoća

Određivanje optimalnih hromatografskih uslova vršeno je pomoću metode parcijalnih najmanjih kvadrata – PLS [93] korišćenjem matematičkog programa Soft Independent Modeling of Class Analogy SIMCA P+ 12.0 [166] i metodom površine odgovora [171]. S obzirom da je bilo potrebno ispitati tri faktora na pet nivoa izabran je zvezdasti eksperimentalni dizajn. Ispitivani faktori i njihovi nivoi, tj. opsezi u kojima su ispitivani navedeni su u Tabeli 19.

Tabela 19. Ispitivani faktori i njihovi nivoi analizirani u zvezdastom faktorskom dizajnu

Faktori	Ispitivani nivoi				
	-2(=-α)	-1	0	1	2(=+α)
Kodirane vrednosti					
pH vrednost mobilne faze	4,5	4,6	4,7	4,8	4,9
Temperatura stacionarne faze (°C)	25	27,5	30	32,5	35
Protok mobilne faze (mL min ⁻¹)	0,250	0,275	0,300	0,325	0,350

Pošto je vršena optimizacija tri faktora, lokalizacija $\pm\alpha$ nivoa je izračunata preko jednačine $\alpha = 2^{N/4}$, gde je N broj promenljivih ($N=3$) [91]. Vrednost α za tri promenljive trebalo je da bude 1,68, što bi bila mala promena s obzirom da je optimizacija vršena u uskim opsezima odabranih faktora. Stoga je odlučeno da nivoi ispitivanja $\pm\alpha$ budu lokalizovani na prvi ceo broj $\pm(2)$ (Tabela 19.)

Svi eksperimenti su izvođeni nasumično, odnosno randomizirano i bez ponavljanja da bi se smanjio efekat nekontrolisanih promenljivih koji može da poveća eksperimentalnu grešku određivanja [214]. Ponavljanja su vršena isključivo u centralnoj tački i to 3 puta, tako da je ukupan broj izvedenih eksperimenata bio 15. Broj i plan eksperimenata su navedeni u Tabeli 20.

Tabela 20. Odgovori hromatografskog sistema dobijeni u optimizaciji RP-UPLC metode za određivanje ziprasidona i njegovih nečistoća

Exp.No.	T (°C)	pH	Protok ($\mu\text{L min}^{-1}$)	Rs1	Rs/ Zipr- Imp _{II}	Rs/Imp _{II} - Imp _{IV}	Rs4	Rs5	Rs/Imp _{Unknown} - Imp _V
1	30	4,5	300	1,144	0,726	0,978	5,495	3,03	0,796
2	30	4,6	300	1,485	0,869	0,696	6,273	2,933	1,844
3	30	4,7	300	1,354	0,855	0,621	6,315	2,95	1,345
4	30	4,8	300	1,595	0,91	0,027	8,451	2,562	2,964
5	30	4,9	300	1,8	0,463	0,541	6,957	2,088	3
6	25	4,7	300	1,212	0,787	0,554	4,214	2,922	0,854
7	27,5	4,7	300	1,211	0,851	0,531	6,155	2,874	1,13
8	30	4,7	300	1,18	0,831	0,443	6,195	2,529	1,381
9	32,5	4,7	300	1,691	1,016	0,223	7,539	2,731	1,8
10	35	4,7	300	1,435	0,871	0,091	7,515	2,299	1,939
11	30	4,7	250	1,435	0,892	0,322	6,52	2,95	1,298
12	30	4,7	275	1,357	0,912	0,393	6,237	2,585	1,249
13	30	4,7	300	1,349	0,914	0,492	7,08	2,795	1,475
14	30	4,7	325	1,401	0,847	0,415	6,945	2,819	1,525
15	30	4,7	350	1,18	0,748	0,404	6,179	2,511	1,448

Rezolucije (Rs) između: nečistoće I i ziprasidona (Rs1), ziprasidona i nečistoće II (Rs/ Zipr-Imp_{II}), nečistoća II i IV (Rs/Imp_{II}-Imp_{IV}), nečistoća IV i III (Rs4), nečistoća III i V (Rs5) i nepoznate nečistoće i nečistoće V (Rs/Imp_{Unknown}-Imp_V)

PLS analiza je uspostavila korelaciju između ispitivanih eksperimentalnih uslova i vrednosti R_s pri svakom od njih. Eksperimentalni uslovi su predstavljali X-varijable, tj. faktore, a kao odgovor, tj. Y-varijable odabrane su R_s kritičnih parova. Rezolucije između parova pikova (R_s) računane su na osnovu jednačine iz Evropske farmakopeje:

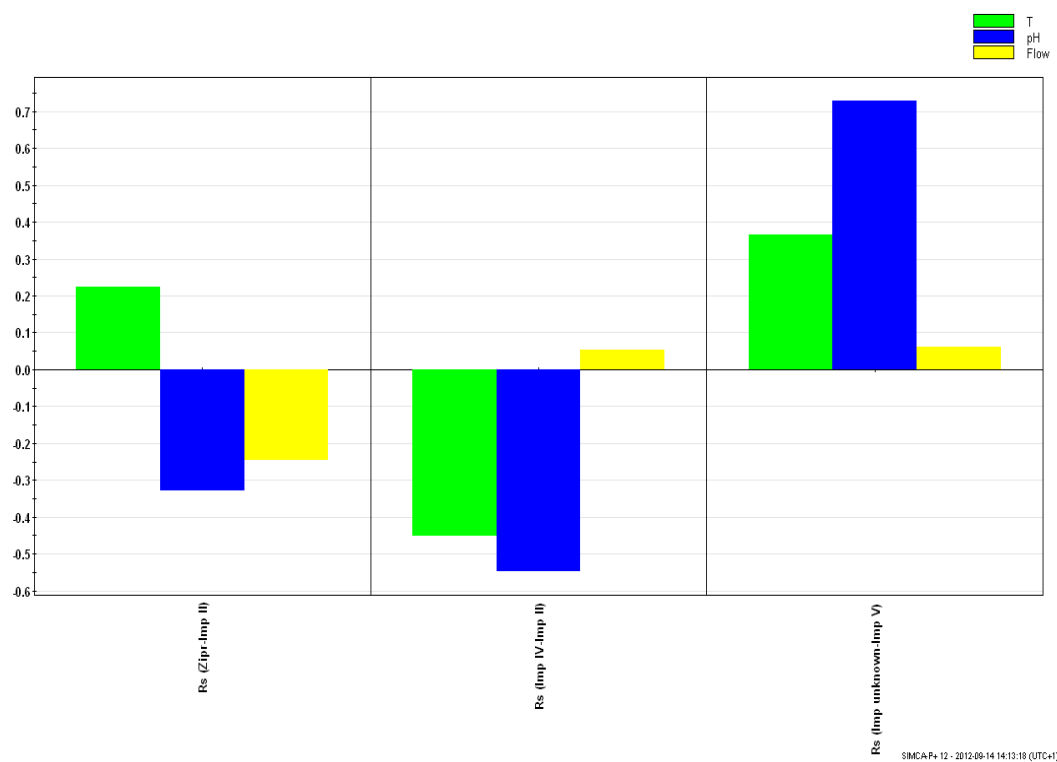
$$R_s = \frac{1.18(t_{R1} - t_{R2})}{w_{h1} + w_{h2}} \quad (22)$$

gde su t_{R1} , t_{R2} retencionna vremena susednih parova pikova, w_{h1} , w_{h2} - širine pikova na polovini visine [43].

Prilikom modelovanja uzeta je u obzir i interakcija uticaja dva faktora na odgovor sistema: T×pH, T×protok, pH×protok. Takođe, ispitivana je i kvadratna zavisnost između uslova i rezolucije, pa su kao X-varijable za modelovanje, pored navedenih, uzete u obzir i T×T, pH×pH, protok × protok. Pošto se opsezi ispitivanih faktora razlikuju nekoliko puta, podaci su skalirani [98].

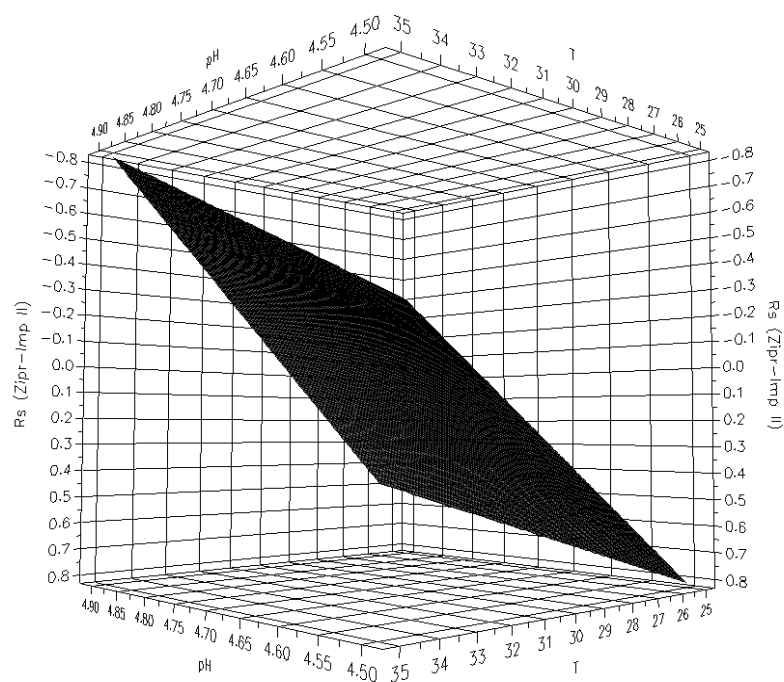
Pikovi sa dobijenom prosečnom R_s manjom od 1 su odabrani kao kritični parovi, tako da su tokom modelovanja praćena tri odgovora sistema, „Rs/Zipr-Imp II“, „Rs/Imp II-Imp IV“ i „Rs/Imp Unknown-Imp V“ i za svaki odgovor je stvoren poseban model. To su rezolucije između pikova ziprasidona i nečistoće II, nečistoće II i IV i nepoznate nečistoće i nečistoće V. Eksperimentalno dobijene vrednosti svih R_s prikazane su u Tabeli 20. Eksperimentalni dizajn je stvaran tako da se nađu maksimalni odgovori sistema tj. R_s između kritičnih parova.

Na osnovu PLS modela pomoću programa SIMCA-P+ izračunati su regresioni koeficijenti za svaku Y-promenljivu (Slika 78.). U modelu „Rs Zipr-Imp II“ temperatura stacionarne faze je u pozitivnoj korelaciji, dok su pH pufera i protok mobilne faze u negativnoj korelaciji sa R_s para. Kod modela „Rs/Imp II-Imp IV“ povećanje vrednosti temperature i pH dovodi do smanjenja, a povećanje protoka do povećanja R_s . U modelu „Rs/Imp Unknown-Imp V“ sva tri faktora imaju pozitivan uticaj na rezoluciju ispitivanog para.

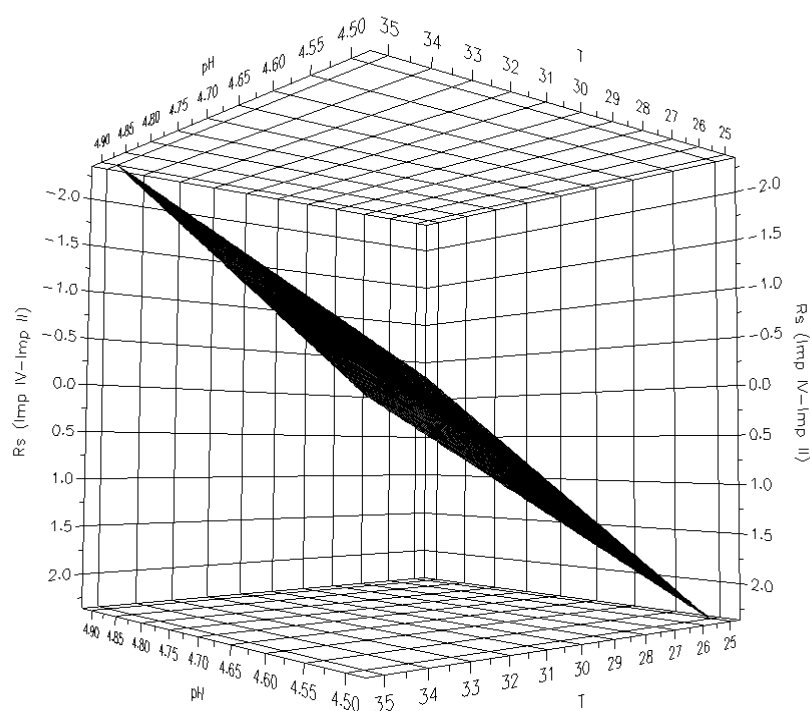


Slika 78. Dijagrami izračunatih vrednosti koeficijenata matematičkih modela: „Rs/Zipr-Imp II“, „Rs/Imp II-Imp IV“ i „Rs/Imp Unknown-Imp V“

Radi bolje vizuelizacije optimalnih vrednosti ispitivanih uslova za odgovore sistema, zavisnost između dva najznačajnija faktora (pH pufera i temperatura stacionarne faze) i odabranog odgovora (Rs) je prikazana u vidu odgovarajućih 3D-grafika, odnosno površina odgovora (Slika 79-81.).

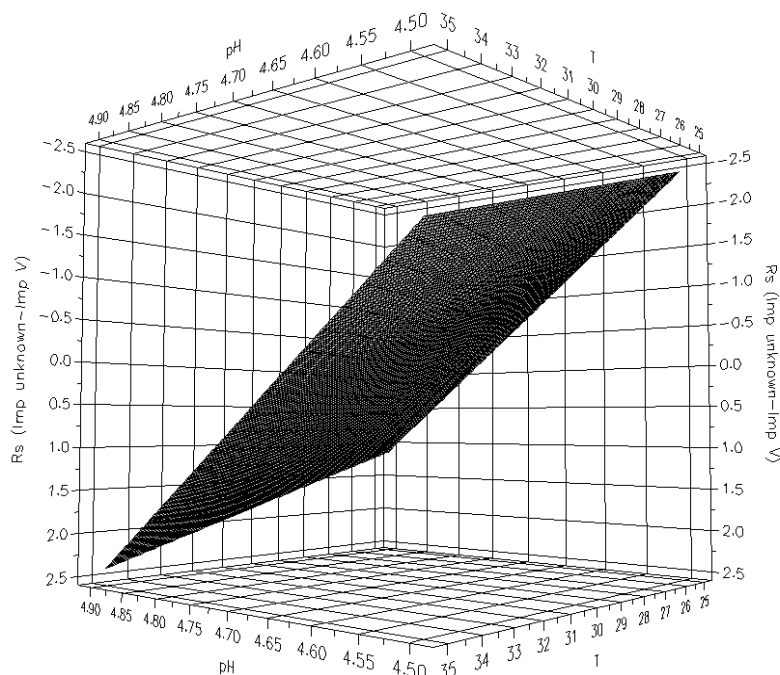


SIMCA-P+ 12 - 2013-07-10 13:40:21 (UTC+1)

Slika 79. 3-D grafik: $f(Rs/Zipr-Imp II) = f(T, pH)$ 

SIMCA-P+ 12 - 2013-07-10 13:41:37 (UTC+1)

Slika 80. 3-D grafik: $f(Rs/Imp IV-Imp II) = f(T, pH)$



SIMCA-P+ 12 - 2013-07-10 13:38:35 (UTC+1)

Slika 81. 3-D grafik: $f(Rs/Imp\ Unknown-Imp\ II) = f(T, pH)$

Na osnovu analize PLS rezultata i 3-D grafika površina odgovora kojima je ispitivano retenciono ponašanje ziprasidona i njegovih nečistoća u UPLC sistemu pokazano je da:

- Povećanje temperature dovodi do povećanja vrednosti rezolucije između ziprasidona i nečistoće II i između *nepoznate nečistoće* i nečistoće V, dok smanjuje rezoluciju između nečistoće IV i II;
- Povećanje pH pufera dovodi do povećanja rezolucije između *nepoznate nečistoće* i nečistoće V, i do smanjenja rezolucije preostala dva kritična para, ziprasidona i nečistoće II i nečistoće IV i II.

Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da temperatura stacionarne faze i pH amonijum-formijatnog pufera moraju biti pažljivo odabrani i kontrolisani. Dobijeni 3-D grafici potvrđuju rezultate dobijene PLS analizom i daju mogućnost vizuelne procene retencionog ponašanja supstanci. Takođe, 3-D grafici su pokazali da je optimalna pH vrednost za sva tri odgovora sistema, tj. za sve tri rezolucije 4,7, a temperatura stacionarne faze 30 °C.

4.5.2.2. Hromatografska funkcija odgovora - CRF i eksponencijalna hromatografska funkcija -CEF u modelovanju RP-UPLC sistema za ispitivanje zipasidona i njegovih nečistoća

Hromatografske funkcije su tako dizajnirane da daju jednostavan odgovor tj. brojčanu vrednost koja reflektuje kvalitet hromatograma i često se koriste prilikom optimizacije zajedno sa metodama regresije [127]. Hromatografske funkcije CRF i CEF su odabrane za optimizaciju hromatografskih UPLC uslova. Glavni cilj je bio ispitati da li su hromatografske funkcije - CRF i CEF pogodne za ispitivanje uticaja tri eksperimentalna faktora na kvalitet UPLC razdvajanja ovako složene smeše jedinjenja. Rezolucija parova pikova, ukupno vreme izvođenja analize i ujednačenost razdvajanja pikova su bili kriterijumi za određivanje kvaliteta UPLC hromatograma prilikom određivanja optimalnih UPLC uslova. Tako su obe funkcije imale dva konkurentna cilja: da maksimalno povećaju rezoluciju i da što više smanje vreme izvođenja analize. Stoga je bilo bitno pažljivo odabrati optimalne vrednosti koeficijenata-težina (engl. *weighting factors*) za ova dva parametra u CRF i CEF funkcijama.

Hromatografska funkcija odgovora - CRF je dizajnirana tako da je najbolja vrednost za optimizaciju u stvari maksimalna, a za eksponencijalnu hromatografsku funkciju – CEF, minimalna vrednost. Na osnovu jednačine (4) za CRF (poglavlje 1.2.5.) može se zaključiti da sabiranje svih vrednosti rezolucija $\sum R_i$ doprinosi da manji uticaj na CRF vrednost imaju R_s nerazdvojenih ili slabo razdvojenih pikova u poređenju sa parovima pikova koji imaju visoke vrednosti R_s . Međutim, CRF vrednost je važan parametar u optimizaciji metode ako je funkcija fokusirana na nerazdvojene tj. parove pikova sa najnižim vrednostima R_s [132] pa su za sve hromatografske uslove izračunate vrednosti CRF-tot gde su uzete u obzir R_s svih parova pikova i CRF-3 vrednost koja se odnosila na sumu R_s tri kritična para (Tabela 21.).

Tabela 21. Parametri korišćeni za izračunavanje hromatografskih funkcija CRF/CEF (CRF-tot/CEF-tot za sve parove pikova, CRF-3/CEF-3 za tri kritična para (Rs/ Zipr-Imp II, Rs/Imp II-Imp-IV, i Rs/Imp Unknown-Imp V)) i optimizaciju UPLC eksperimentalnih uslova

Eksp. No.	ΣRs -all	ΣRs -critical	T_L	T_1	CRF-tot	CRF-3	t_f	CEF-tot	CEF-3
1	12,169	2,5	4,44	0,72	47,429	37,76	4,44	9,849	6,394
2	14,099	3,409	5,01	0,72	49,929	39,239	5,01	9,824	6,503
3	13,439	2,821	5,02	0,72	49,279	38,661	5,02	10,501	6,988
4	16,51	3,901	6,05	0,73	51,535	38,926	6,05	28,102	25,784
5	14,848	4,004	6,78	0,73	49,143	38,299	6,78	39,451	34,652
6	10,542	2,194	4,75	0,73	46,107	37,759	4,75	10,685	7,031
7	12,752	2,511	4,94	0,73	48,507	38,266	4,94	10,903	7,06
8	12,558	2,655	5,13	0,72	48,508	38,605	5,13	12,075	7,197
9	15,000	3,039	5,25	0,72	50,83	38,869	5,25	9,922	6,705
10	14,15	2,9	5,36	0,7	49,88	38,63	5,36	11,641	6,859
11	13,416	2,511	5,52	0,85	48,911	38,006	5,52	10,999	7,458
12	12,733	2,555	5,4	0,78	48,383	38,205	5,4	11,988	7,327
13	14,104	2,881	5,13	0,72	50,054	38,831	5,13	10,919	6,999
14	13,952	2,787	4,91	0,67	49,707	38,542	4,91	10,669	6,963
15	12,471	2,6	4,75	0,62	48,091	38,22	4,75	11,751	7,019

ΣRs -all suma rezolucija svih parova pikova, ΣRs -critical suma rezolucija kritičnih parova pikova

CRF: L – broj parova pikova (6), T_A –specificirano maksimalno prihvatljivo vreme analize (5,13 min), T_L – retenciono vreme poslednjeg pika, T_1 – retenciono vreme prvog pika, T_0 – specificirano minimalno retenciono vreme prvog pika (0,62 min), w_1 : 2, w_2 : 1, w_3 : 0,5.

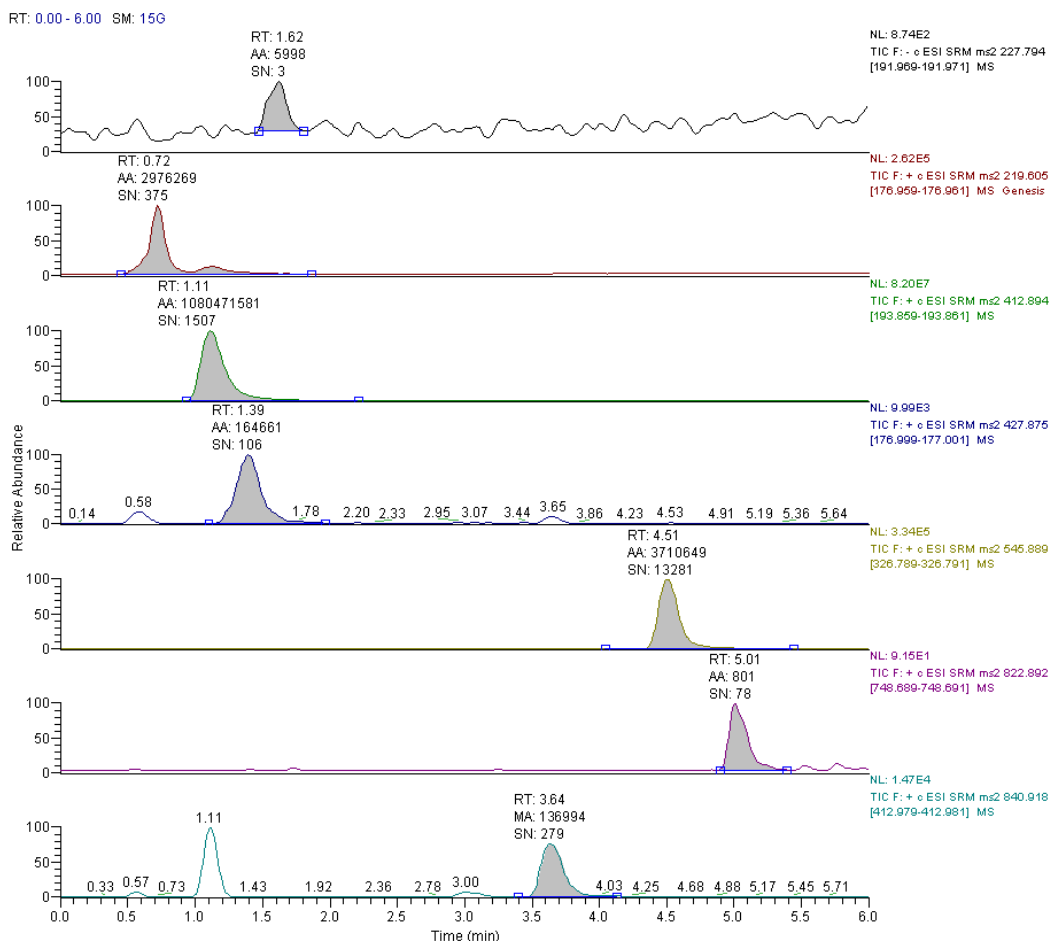
CEF: t_{max} – specificirano maksimalno prihvatljivo vreme analize (5,13 min), t_f – retenciono vreme poslednjeg pika, a :3, R_{opt} – optimalna vrednost rezolucije

CEF je novija funkcija u odnosu na CRF i daje mogućnost isticanja važnosti rezolucije u odnosu na vreme izvođenja analize ili obrnuto, uvođenjem odgovarajućeg podesivog parametra. Na osnovu jednačine (5) (*poglavlje 1.2.5.*) izračunate su takođe po dve vrednosti za svaki uslov iz zvezdastog dizajna, CEF-tot i CEF-3 (Tabela 21.). Na osnovu prosečnih vrednosti eksperimentalno dobijenih R_s između svakog para, specificirane su tri optimalne vrednosti rezolucije (R_{opt}). Odabir samo jedne vrednosti R_{opt} u ovako složenoj smeši jedinjenja nije bio adekvatan jer bi sve vrednosti rezolucije veće od R_{opt} doprinosile povećanju vrednosti funkcije što bi imalo negativan uticaj na ukupnu procenu kvaliteta hromatograma. Kod parova, gde je prosečna vrednost rezolucije bila manja od 1,5, kao optimalna odabrana je vrednost 1,5. Za umereno niske prosečne vrednosti R_s koje su se kretale od 1,5 do 3,0 kao optimalna je odabrana vrednost približna maksimalnoj vrednosti R_s (malo viša ili niža vrednost), dok je za najveće prosečne vrednosti R_s odgovarajućeg para ($R_s > 3,0$) maksimalna vrednost R_s odabrana kao optimalna ($R_{opt} = R_{max}$). Vrednosti a koja predstavlja nagib faktora rezolucije je dodeljena vrednost 3, čime je porastao značaj R_s u odnosu na vreme izvođenja analize [127] (Tabela 21.).

Izračunate su prosečne vrednosti za centralne tačke dizajna CRF-tot (49,281), CRF-3 (38,699), CEF-tot (11,165), CEF-3 (7,062) (Eksp. 3, Eksp. 8, Eksp. 13, Tabela 21.) i poređene sa odgovarajućim vrednostima ostalih eksperimenata. Pregledom svih eksperimentalnih rezultata uočeno je da je CRF-3 vrednost najmanje hromatograma okarakterisala boljim u odnosu na centralne tačke dizajna, što je pokazalo da je odabir kritičnih rezolucija u dizajniranju funkcije CRF-3 bio ključan za optimalan izbor metoda. Hromatogrami sa maksimalnim CRF i minimalnim CEF vrednostima (Eksp. 2, Eksp. 9, Eksp. 14) i centralnih tački (Eksp. 3, Eksp. 8, Eksp. 13) su detaljnije analizirani i vršeno je njihovo poređenje.

Vrednosti CEF-tot/CEF-3 i CRF-tot/CRF-3 (osim CRF-3 kod Eksp 14) su odabrale eksperimentalne uslove broj 2, 9 i 14 kao optimalnije u odnosu na centralne tačke. Dakle, obe funkcije su slično rangirale hromatograme. Analizom kvaliteta hromatograma i dobijenih rezultata utvrđeno je da vrednosti funkcija mogu pogrešno da ocene kvalitet hromatograma s obzirom da ni jedan parametar funkcije ne uzima u obzir izgled hromatograma, tj. simetriju pikova, *tejl링*, oblik pika tj. hromatografske parametre koji veoma utiču na integraljenje pikova tj. na preciznost i tačnost metode.

Primer je eksperiment broj 2 koji po funkcijama CRF i CEF predstavlja bolje uslove za razdvajanje u odnosu na centralne. Ove funkcije daju pogrešnu procenu kvaliteta hromatograma s obzirom da uzimaju u obzir rezoluciju, ali ne i oblik pika. Naime, na hromatogramu eksperimenta 2 može se uočiti značajan *tejl*ing pika *nepoznate nečistoće* kao i nezadovoljavajući oblik pika nečistoće IV (Slika 82.).



Slika 82. SRM hromatogram rastvora standarda- M_{sm} , kanali: **1** (t_R -1.56 min) - nečistoća IV, **2** (t_R -0.73min) - nečistoća I, **3** (t_R -1.34min)-ziprasidon , **4** (t_R -1.76min) - nečistoća II, **5** (t_R -5.28min)-nečistoća V, **6** (t_R -6.78min)-nepoznata nečistoća, **7** (t_R -4,59min) - nečistoća III

Takođe, eksperimentalni uslovi pod brojem 9 i 14 nisu optimalni, s obzirom na niže vrednosti Rs kritičnih parova nečistoća II i IV u oba eksperimenta, i ziprasidona i nečistoće II kod Eksp.14 u odnosu na prosečne vrednosti Rs centralnih tačaka dizajna (Tabela 20.).

Na kraju, analizom svih rezultata nastalih primenom eksperimentalnog dizajna odnosno PLS modela, metode površine odgovora i hromatografskih funkcija kojima je

ispitivano retenciono ponašanje ziprasidona i njegovih nečistoća u UPLC sistemu, a posebno kritičnih parova, pokazano je sledeće:

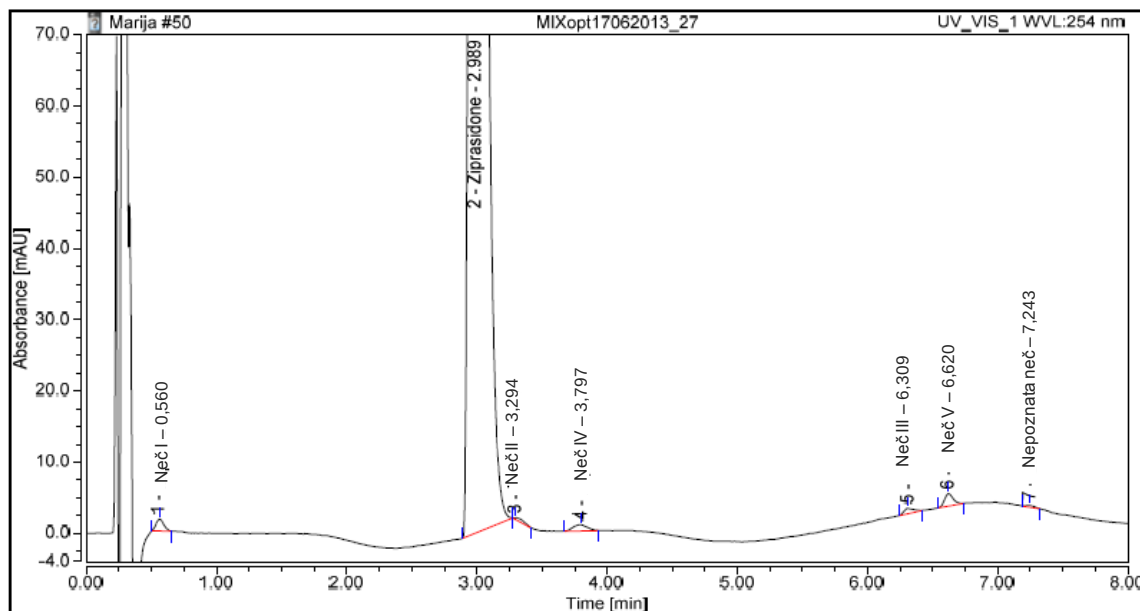
- temperatura stacionarne faze i pH amonijačno-formijatnog pufera su se u linearnom (PLS) modelovanju i metodi površina odgovora izdvojile kao promenljive sa najvećim uticajem na rezoluciju kritičnih parova
- fino podešavanje vrednosti protoka u uskom opsegu u PLS modelu nije pokazalo značajan uticaj na retenciju i razdvajanje kritičnih parova;
- uporedna analiza hromatografskih funkcija, koje su se odnosile na sve nečistoće CRF-tot/CEF – tot i na tri kritična para CRF-3/CEF-3, i hromatograma pokazala je da su optimalni uslovi za razdvajanje ispitivanih jedinjenja u stvari centralne tačke dizajna.

Na osnovu svega navedenog utvrđeno je da su optimalni hromatografski uslovi na Acquity UPLC BEH (50 x 2,1 mm, 1,7 μ m) stacionarnoj fazi: mobilna faza - pufer (rastvor 10 mM amonijum-formijata, pH=4,7 podešen mravljom kiselinom) i acetonitril (gradijentno eluiranje, 0 min/40%, 1 min /40%, 4 min /60%, 5,6 min /60%, 5,8 min /40%, 7 min /40%), temperatura stacionarne faze 30 °C, protok od 0,3 mL min⁻¹. Izbor navedene optimalne vrednosti koncentracije pufera (10mM) je izvršen na osnovu već izvedenih eksperimenata, s obzirom na dobro razdvajanje i dobar signal masenog detektora.

Dakle, dobra efikasnost i oblik pika su dobijeni za sedam minuta analize. Pod navedenim optimalnim uslovima RP-UPLC metode značajno je skraćeno vreme izvođenja analize (faktor skraćenja više od 4) u odnosu na prethodnu RP-HPLC metodu (30 minuta, poglavlje 3.3.7.) uz prihvatljiv gubitak na rezoluciji, s obzirom da je dužina stacionarne faze redukovana pet puta (sa 250 mm (RP-HPLC stacionarna faza) na 50mm (RP-UPLC stacionarna faza)) i da postoji mogućnost kvantifikacije ispitivanih jedinjenja uz pomoć masenog detektora. PDA detektor na ovom uređaju korišćen je samo u ispitivanju specifičnosti metode za praćenje čistoće pikova zbog male brzine detektovanja (20Hz).

Uz male modifikacije gradijentnog eluiranja (v. poglavlje 3.5.7.) izvršen je transfer metode na novi UPLC-DAD sistem sa znatno bržim DAD detektorom (100 Hz) (poglavlje 3.1.1. *Oprema*). Pod istim hromatografskim uslovima injiciran je *rastvor smeše za optimizaciju* - M_{sm} . Dobijeno je razdvajanje ispitivanih jedinjenja na novom UPLC-DAD sistemu (Slika 83.) uz dobre hromatografske performanse, sa vrednostima

rezolucije većim od 1,5, i kratko vreme izvođenja analize (Tabela 22.). Pokazano je da pod optimalnim hromatografskim uslovima postoji mogućnost praćenja hromatografskog ponašanja i određivanja sadržaja ispitivanih jedinjenja i na UPLC-DAD sistemu.



Slika 83. Hromatogram rastvora standarda- M_{sm} (UPLC-DAD)

Tabela 22. Hromatografski parametri za RP-UPLC analizu jedinjenja ziprasidona

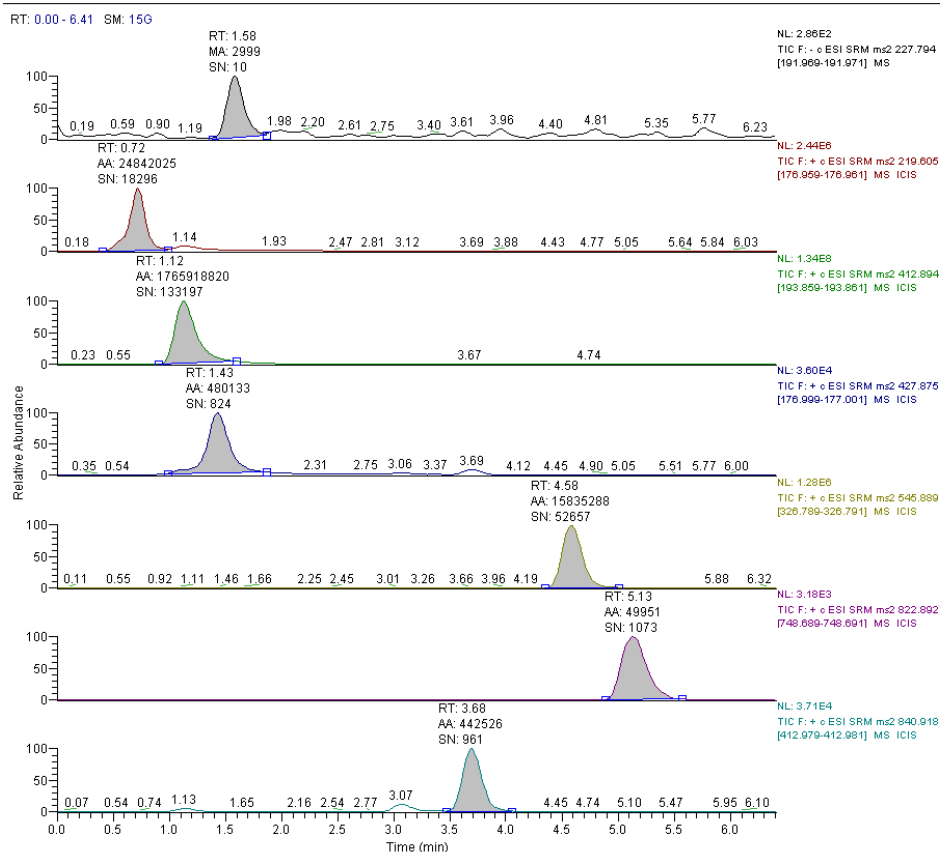
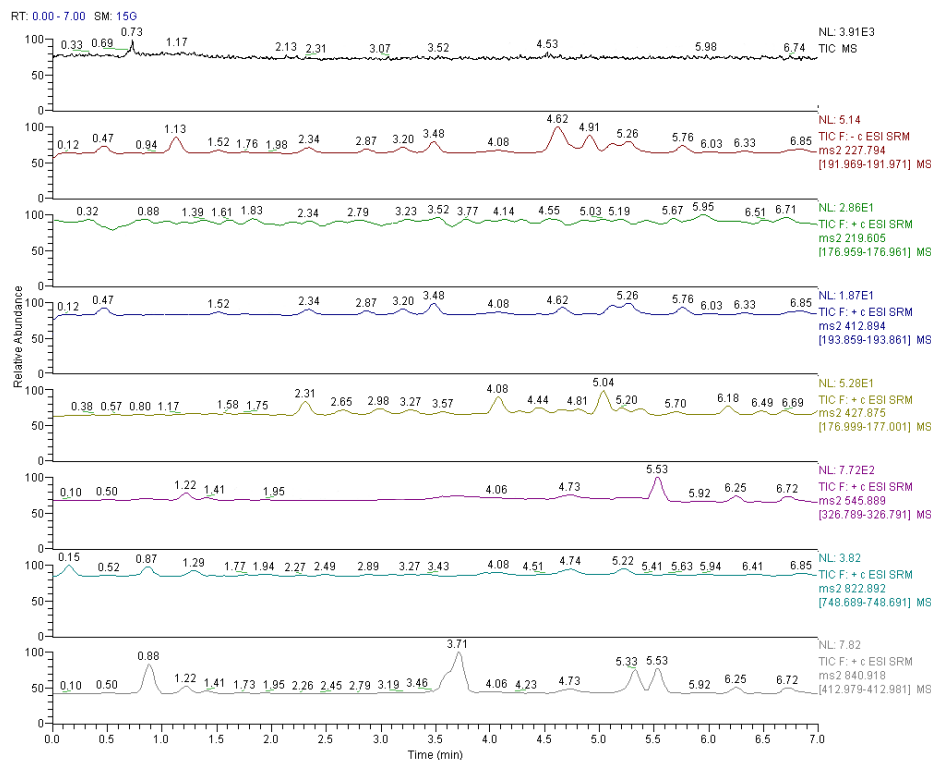
Ispitivana supstanca	t_R , min	Faktor retencije (k)	Simetrija pika (As)	Faktor selektivnosti (α)	Rezolucija (Rs)
Nečistoća I	0,560	1,4	1,21	/	/
Ziprasidon	2,989	7,0	/	5,13	17,30
Nečistoća II	3,294	7,8	1,45	1,12	1,77
Nečistoća IV	3,797	9,1	1,07	1,17	2,60
Nečistoća III	6,309	15,8	1,46	1,73	14,79
Nečistoća V	6,620	16,7	1,27	1,05	2,50
Nepoznata nečistoća	7,243	18,3	1,20	1,10	5,30

t_R – retenciono vreme

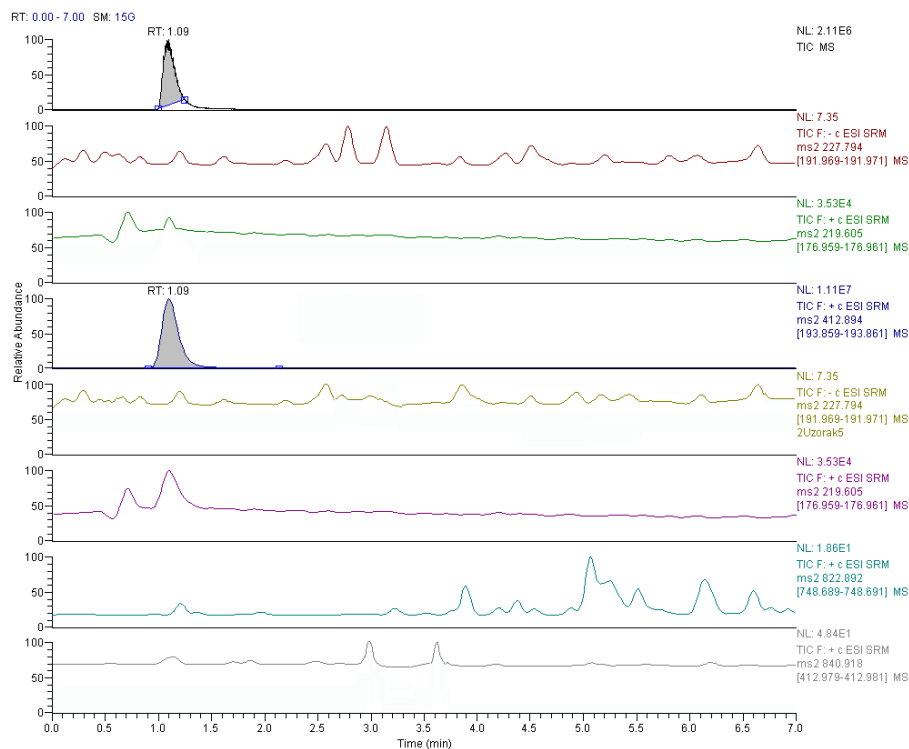
4.6. VALIDACIJA RP-UPLC METODE ZA ODREĐIVANJE ZIPRASIDONA I NJEGOVIH NEČISTOĆA

Nakon što su određeni optimalni hromatografski uslovi, RP-UPLC metoda za određivanje ziprasidona i njegovih nečistoća je validirana u skladu sa zahtevima ICH regulative [196] koji se mogu primeniti na UPLC-MS sistem. Validacija je izvedena pod hromatografskim uslovima prikazanim u poglavlju 3.5.7.

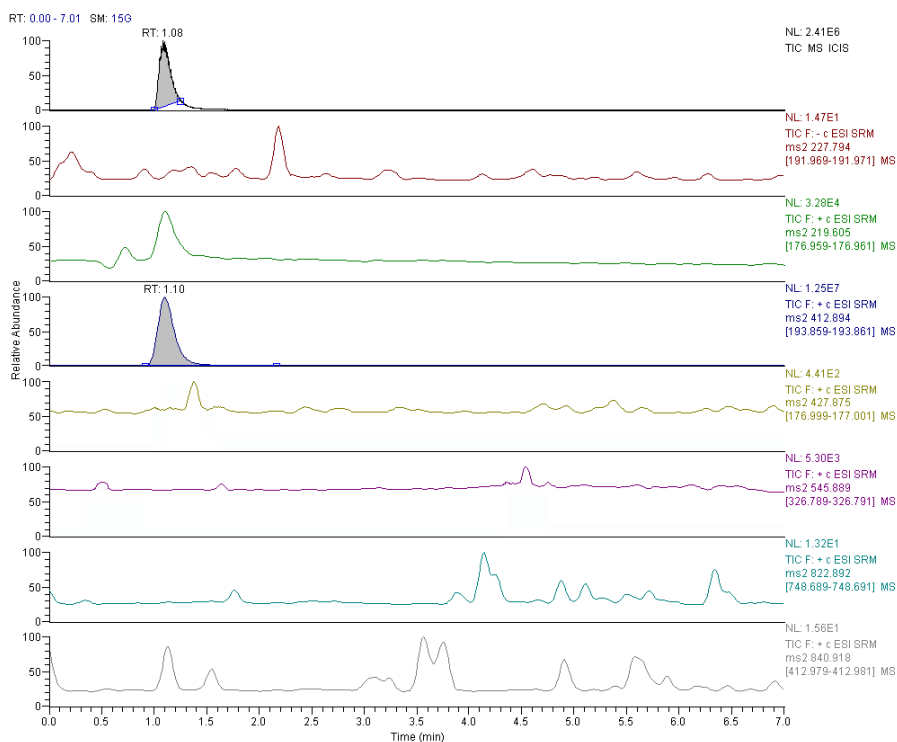
Za procenu *selektivnosti* UPLC-MS metode upoređeni su hromatogrami TIC (*engl. Typical Ion Chromatogram*) i SRM (*engl. Selected Reaction Monitoring*) rastvora *placeba*, *rastvora uzoraka kapsula i praška za rastvor za injekcije* i *rastvora smeše za optimizaciju* - M_{sm} . Rastvor M_{sm} sadrži ziprasidon u količini od 100% i njegove nečistoće u količini od 0,2% tj. 0,3% (nečistoća II) u odnosu na radnu koncentraciju ziprasidona u rastvoru uzorka. Hromatogrami su prikazani na Slici 84.

a) TIC i SRM hromatogram rastvora M_{sm} 

b) TIC i SRM hromatogram rastvora placeba



a) TIC i SRM hromatogram rastvora uzorka kapsula



b) TIC i SRM hromatogram rastvora uzorka praška za rastvor za inj.

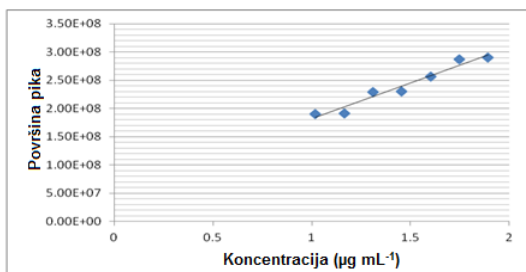
Slika 84. Kanali:1 (t_R -1.58 min) - nečistoća IV, 2 (t_R -0.72min)-nečistoća I, 3 (t_R -1.12min)-ziprasidon, 4 (t_R -1.43min)-nečistoća II, 5 (t_R -4.58min)-nečistoća V, 6 (t_R -5,13min)-nepoznata nečistoća, 7 (t_R -3.68min)-nečistoća III

Upoređivana su retenciona vremena hromatografskih pikova sa hromatograma *rastvora placebo* sa retencionim vremenima pikova sa hromatograma rastvora M_{sm} i *rastvora uzoraka*. Selektivnost je potvrđena pošto nije bilo interferencija od strane komponenata placebo, tj. nema pikova čija retenciona vremena i molekulske mase odgovaraju retencionim vremenima i molekulskim masama ispitivanih jedinjenja.

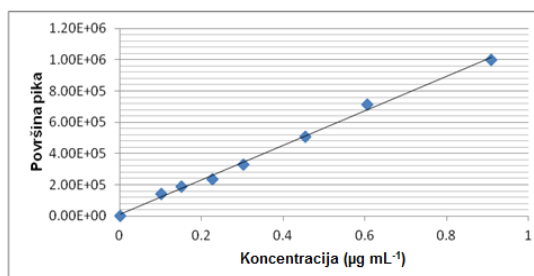
Čistoća svih eluiranih pikova je praćena i upotrebom PDA i masenog detektora. Maseni detektor je takođe pokazao odličnu čistoću mase svakog pika čime je nedvosmisleno dokazana specifičnost metode.

Za ispitivanje *linearnosti* pripremljeno je sedam standardnih rastvora, različitih koncentracija za ziprasidon i osam za njegove nečistoće I-V i rastvori su injicirani u hromatografski sistem po tri puta. Koncentracije rastvora su obuhvatale opseg od 1,05–1,95 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za ziprasidon i od LOQ-0,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za nečistoće.

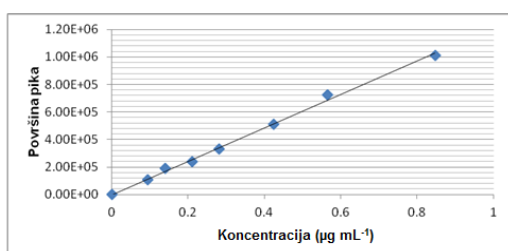
Analizirana je zavisnost površine pikova ispitivanih supstanci u funkciji koncentracije. Kalibracione krive su konstruisane metodom najmanjih kvadrata, a svaka tačka dobijena je kao srednja vrednost tri injektovanja odgovarajućih rastvora. Kalibracione krive ispitivanih jedinjenja prikazane su na Slikama od 85. do 90., a dobijeni rezultati sumirani u Tabeli 23.



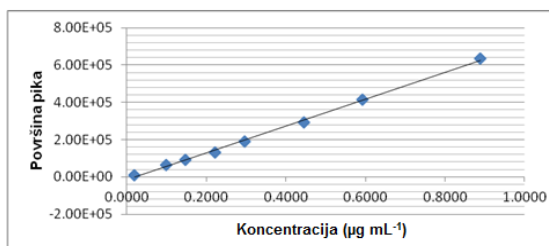
Slika 85. Kalibraciona kriva ziprasidona



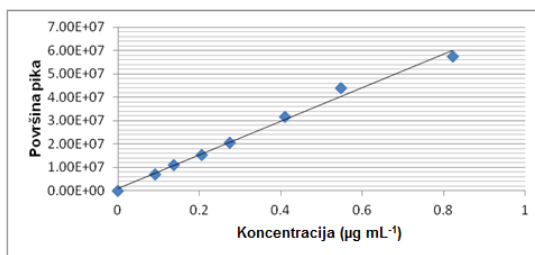
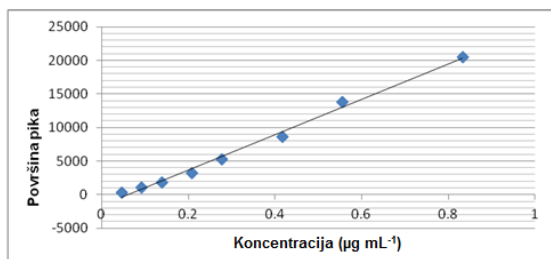
Slika 86. Kalibraciona kriva nečistoće I



Slika 87. Kalibraciona kriva nečistoće II



Slika 88. Kalibraciona kriva nečistoće III



Slika 89. Kalibraciona kriva nečistoće IV **Slika 90.** Kalibraciona kriva nečistoće V

Linearna zavisnost između površine pika i koncentracije je dokazana za sve ispitivane supstance u izabranom opsegu, jer je koeficijent korelacije za sve nečistoće bio veći od 0,995, a za ziprasidon od 0,991. Uz pomoć Studentovog t -testa je pokazano da odsečak na y osi nije statistički značajno veći od nule, jer su izračunate t -vrednosti za sve kalibracione krive (t_a) bile manje od tabelarne t -vrednosti ($t_{tab}=3,71$, $p=0,01$, $\varphi=6$ odnosno za ziprasidon $t_{tab}=4,032$, $p=0,01$, $\varphi=5$).

Tabela 23. Rezultati ispitivanja linearnosti metode

Ispitivana supstanca	Opseg koncentracija ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Kalibraciona kriva				
		$y=a+bx$	r	S_a	S_b	t_a
Ziprasidon	1,05-1,95	$y = 5,51E+07 + 1,27E+08x$	0,9911	1,84E+07	1,24E+07	2,99
Nečistoća I	LOQ-0,9	$y = 2,32E+04 + 1,24E+06x$	0,9983	1,67E+04	4,21E+04	1,39
Nečistoća II	LOQ-0,9	$y = 1,18E+04 + 1,37E+06x$	0,9986	1,50E+04	4,04E+04	0,79
Nečistoća III	LOQ-0,9	$y = -1,23E+04 + 7,17E+05x$	0,9987	5,60E+03	1,37E+04	2,19
Nečistoća IV	LOQ-0,9	$y = -1,13E+03 + 2,54E+04x$	0,9945	3,92E+02	1,02E+03	2,89
Nečistoća V	LOQ-0,9	$y = 9,06E+05 + 7,20E+07x$	0,9959	1,07E+06	2,67E+06	0,85

a odsečak, b nagib kalibracione krive, r - koeficijent korelacije; S_a - standardna devijacija odsečka, S_b - standardna devijacija nagiba, t_a izračunata t -vrednost za odsečak, t_{tab} tabelarna t -vrednost ($t_{tab}=3,71$, $p=0,01$, $\varphi=6$ odnosno $t_{tab}=4,032$, $p=0,01$, $\varphi=5$)

Eksperimentalno su određeni LOQ i LOD ispitivanih nečistoća (Tabela 24.) injektovanjem serije razblaženja rastvora niskih koncentracija i ispitivanjem njihovog odgovora tj. najmanje koncentracije koja može da se kvantifikuje odnosno detektuje. LOQ vrednost za nečistoće I-V je definisana primenom EURACHEM metoda [215] kada je LOQ ona vrednost za koju je RSD minimum tri određivanja manja ili jednaka 10%. LOD vrednosti su izračunate na osnovu jednačine $LOD = (3/10) \times LOQ$ i potvrđene su eksperimentalno. Dobijeni rezultati za LOQ i LOD za nečistoće pokazuju da je metoda dovoljno osetljiva i da se može koristiti za praćenje njihovih koncentracija u aktivnoj supstanci i farmaceutskim oblicima (kapsule i prašak za rastvor za injekcije).

Tabela 24. LOD i LOQ vrednosti za ispitivane supstance

Ispitivana supstanca	LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Nečistoća I	0,002	0,0007
Nečistoća II	0,002	0,0007
Nečistoća III	0,02	0,007
Nečistoća IV	0,05	0,014
Nečistoća V	0,00007	0,00003

LOD - limit detekcije, LOQ - limit kvantifikacije

Nakon procene linearnosti metode, ispitana je *preciznost* metode. Kao zahtev je postavljeno da *RSD* vrednost za ponovljenja određivanja ziprasidona bude manja od 2%, a za nečistoće manja od 5%. Preciznost metode je ispitivana analizom rastvora M_{sm} koji sadrže radne koncentracije $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$, odnosno $0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ (nečistoća III) za nečistoće i $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ za ziprasidon, kao i komponente placeba u odnosu koji odgovara sastavu pomoćnih supstanci u uzorku (kapsule). Pravljen je po šest rastvora iste koncentracije i svaki je injiciran po tri puta. Obradom podataka izračunati su statistički parametri *SD* i *RSD* i prikazani su u Tabeli 25. *SD* i *RSD* vrednosti za sve ispitivane

supstance su u okviru dozvoljenih granica, čime je potvrđena preciznost predložene UPLC-MS-MS metode.

Tabela 25. Rezultati ispitivanja preciznosti metode

Ispitivana supstanca	Injektovano ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Nađeno ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	RSD (%)
Ziprasidon	1,455	1,479 $\pm$ 0,015*	0,997
Nečistoća I	0,303	0,282 $\pm$ 0,008*	2,841
Nečistoća II	0,424	0,419 $\pm$ 0,011*	2,558
Nečistoća III	0,296	0,296 $\pm$ 0,008*	2,732
Nečistoća IV	0,278	0,279 $\pm$ 0,007*	2,509
Nečistoća V	0,274	0,277 $\pm$ 0,007*	2,365

*standardna devijacija, SD (n=6)

RSD –relativna standardna devijacija

Tačnost je ispitivana analizom rastvora standarda u tri različite koncentracije (50%, 100% i 200% u odnosu na radnu koncentraciju) za svaku nečistoću i za ziprasidon (80%, 100% i 120% u odnosu na radnu koncentraciju). Svaki rastvor je sadržao i komponente placeba u odnosu koji odgovara sastavu pomoćnih supstanci u uzorku (kapsule). Pravljeni su po tri rastvora za svaku koncentraciju i svaki je injiciran po tri puta. Statističkom analizom izračunati su parametri koji ukazuju na tačnost metode i prikazani su u Tabeli 26. Procenat prinosa (*Recovery* vrednost) je računata na osnovu dobijene kalibracione krive za svaku supstancu.

Tabela 26. Rezultati ispitivanja tačnosti metode

Ispitivana supstanca	Injektovano ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Nađeno ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recovery (%)	RSD (%)
Ziprasidon	1,164	1,173 $\pm$ 0,02*	100,78	1,705
	1,455	1,476 $\pm$ 0,019*	101,41	1,298
	1,746	1,756 $\pm$ 0,065*	100,56	3,794
Nečistoća I	0,152	0,156 $\pm$ 0,007*	102,68	4,544
	0,303	0,295 $\pm$ 0,012*	97,32	4,072
	0,606	0,657 $\pm$ 0,008*	108,34	1,291
Nečistoća II	0,212	0,203 $\pm$ 0,003*	95,57	1,597
	0,424	0,422 $\pm$ 0,009*	99,46	2,110
	0,848	0,779 $\pm$ 0,028*	91,86	3,590
Nečistoća III	0,148	0,143 $\pm$ 0,005*	96,57	3,767
	0,296	0,604 $\pm$ 0,021*	101,97	3,526
	0,593	0,293 $\pm$ 0,013*	98,78	4,361
Nečistoća IV	0,139	0,141 $\pm$ 0,002*	101,62	1,494
	0,278	0,271 $\pm$ 0,009*	97,49	3,324
	0,555	0,544 $\pm$ 0,019*	97,94	3,424
Nečistoća V	0,137	0,140 $\pm$ 0,001*	102,14	0,715
	0,274	0,297 $\pm$ 0,011*	108,45	3,703
	0,548	0,601 $\pm$ 0,016*	109,71	2,628

*standardna devijacija, SD (n=6),

RSD –relativna standardna devijacija

Izračunavanjem *Recovery* vrednosti koja se za sve ispitivane supstance i koncentracije kretala u dozvoljenim granicama (od 91,86 do 109,71%) kao i *RSD* vrednosti (od 0,72 do 4,5%), potvrđena je dobra tačnost metode u ispitivanom opsegu.

Vrednosti validacionih parametara ukazale su da validirana UPLC-MS-MS metoda odgovara njenoj planiranoj nameni za određivanje ziprasidona i njegovih nečistoća aktivnoj supstanci i u doziranim oblicima.

Kvalitativna i kvantitativna analiza kapsula i praška za rastvor za injekcije

Za određivanje sadržaja ziprasidona i njegovih nečistoća I-V predloženom RP-UPLC metodom u kapsulama i prašku za rastvor za injekcije, u hromatografski sistem su injektovani *rastvor smeše za optimizaciju metode* - M_{sm} (priprema v. poglavlje 3.4.1.) *rastvori za ispitivanje linearnosti* (poglavlje 3.5.2.) i *rastvori uzoraka* (poglavlje 3.4.1.).

Određivanje sadržaja ispitivanih supstanci rađeno je metodom kalibracione krive, preko površine pikova. Identifikacija ispitivanih supstanci je izvršena na osnovu retencionih vremena, MS-spektra i UV-spektra snimljenog na PDA detektoru. Rezultati kvantitativne analize su predstavljeni u Tabeli 27., a hromatogrami rastvora uzoraka na Slici 84.

Tabela 27. Rezultati određivanja sadržaja ziprasidona i njegovih nečistoća u farmaceutskim doziranim oblicima

		Nečistoće (%), $\pm$ RSD ^b				
Uzorak	Sadržaj ziprasidona	I	II	III	IV	V
	(%), $\pm$ RSD ^a					
Zeldox kapsule	98,21 $\pm$ 1,05	ND	ND	0,009 $\pm$ 3,75	ND	ND
Zeldox, prašak za rastvor za injekcije	100,87 $\pm$ 1,2	ND	ND	ND	ND	ND

^aU odnosu na deklarisanu sadržaj

^bU odnosu na sadržaj ziprasidona

ND – nije detektovana (ispod LOD)

Upoređivanjem dobijenih vrednosti za sadržaj ispitivanih supstanci sa specifikacijskim zahtevima proizvođača, ustanovljeno je da ispitivani dozirani oblici zadovoljavaju definisane zahteve iz specifikacije u roku upotrebe proizvoda. Takođe, u uzorcima nije detektovana nova identifikovana, niti druga nepoznata nečistoća, kao ni potencijalna genotoksična nečistoća (IV).

5. ZAKLJUČAK

1. Razvijena je i optimizovana nova RP-HPLC metoda sa UV detekcijom za ispitivanje kompleksne smeše jedinjenja različite polarnosti- ziprasidona i nečistoća I-V, u jednom sistemu primenom više metoda eksperimentalnog dizajna.

- Primenom linearne (PLS) i nelinearne (ANN-MLP) metode odabrani su optimalni hromatografski uslovi. Temperatura stacionarne faze i koncentracija trietanolamina su se u oba modela izdvojile kao promenljive sa najvećim uticajem na rezolucije dva kritična para (nečistoća II/ziprasidon i ziprasidon/nečistoća III), a kod ANN modela koncentracija KH_2PO_4 pokazuje najjači uticaj na faktore selektivnosti. Na osnovu 3D-grafikona površine odgovora odabran je optimalan sastav mobilne faze i temperatura stacionarne faze. U toku optimizacije RP-HPLC metode detektovana je i razdvojena *nepoznata nečistoća*.
- Visoke vrednosti statističkih parametara dobijenih unutrašnjom ukrštenom validacijom (R^2 , Q^2 , r^2), ukazuju da oba modela dizajna adekvatno opisuju proces razdvajanja dva kritična para u hromatografskom sistemu u definisanom opsegu ispitivanih uslova i da je ukrštena validacija bitan verifikacioni korak u ANN i PLS modelovanju.
- Primenom PCA i AHC metoda ispitana je selektivnost 20 stacionarnih faza za efikasno razdvajanje ziprasidona i nečistoća (I-V) i *nepoznate nečistoće*. Na osnovu 2D-grafikona (PC1/PC2) PCA analize uočene su glavne razlike između ispitivanih RP-stacionarnih faza i definisani hromatografski parametri koji najviše utiču na PCA model. Rezultati AHC analize su u saglasnosti sa rezultatima PCA studije. Definisane su tri stacionarne faze (grupa 1 PCA ili grupa C AHC) optimalne za razdvajanje svih ispitivanih jedinjenja.
- Optimizovana RP-HPLC metoda je validirana i parametri validacije su u skladu sa regulatornim zahtevima. Dobijena je veća osetljivost u odnosu na prethodno publikovane metode, posebno za potencijalno genotoksičnu nečistoću IV čiji TTC limit može biti detektovan ovom metodom. Metoda je primenjena za

određivanje ziprasidona i njegovih nečistoća u sirovini i u farmaceutskim doziranim oblicima.

2. Formirani su QSRR modeli, koji dovode u korelaciju hemijsku strukturu i osobine ziprasidona i nečistoća I-V sa retencionim parametrima dobijenim validiranom RP-HPLC metodom, primenom linearnih (PLS) i nelinearnih (ANN) statističkih metoda.

- VIP metodom su identifikovani molekularni deskriptori koji najviše utiču na retenciono ponašanje (t_R): MS; SAS; LogP; LogD_{pH 1.5}; LogD_{pH 2.5}; LogD_{pH 4.0} čime je pokazano da se važne informacije o retencionom mehanizmu u optimalnim QSRR modelima mogu dobiti na osnovu 2D i 3D deskriptora, koji nose informaciju o sternim i molekulskim osobinama (lipofilnost) molekule. Dobijena korelacija ima fizičko-hemijski smisao tj. značenje primenjenih deskriptora se može jasno interpretirati u funkciji retencije uz istovremenu dobru moć predviđanja QSRR modela čime je obostrano potvrđen kvalitet regresione jednačine.
- Na osnovu validacionih parametara (RMSEP, r) regresioni PLS-QSRR model se pokazao kao pouzdaniji od ANN-QSRR modela. Formirana PLS regresiona funkcija, između odabranih molekulskih deskriptora i retencije (t_R) ispitivanih jedinjenja, je korišćena za dalja ispitivanja.
- PLS-QSRR modelom je predviđeno razdvajanje još deset (TS1-TS10) derivata ziprasidona (pratećih organskih nečistoća, metabolita i potencijalnih degradacionih proizvoda) u RP-HPLC sistemu. Na osnovu dobijenih rezultata predložene su dve potencijalne strukture za *nepoznatu nečistoću* od kojih je TS1 potvrđena karakterizacijom tripl kvadrupolskim masenim analizatorom čime je tačnost predviđanja PLS-QSRR modela eksperimentalno potvrđena.

3. Razvijena je i optimizovana nova brza i osetljiva UPLC-MS/MS metoda za analizu ziprasidona i nečistoća I-V uz istovremenu mogućnost karakterizacije nepoznatih nečistoća, primenom PLS metode i hromatografskih funkcija (CRF i CEF).

- Temperatura stacionarne faze i pH vodene faze su se u PLS modelu izdvojile kao faktori sa najvećim uticajem na rezoluciju kritičnih parova (ziprasidon/nečistoća II, nečistoća II/IV i *nepoznata nečistoća*/nečistoća V) i pomoću 3-D grafikona površine odgovora odabrane su njihove optimalne vrednosti.
- Uporednom analizom vrednosti hromatografskih funkcija (CRF-tot/CEF-tot), izračunatih na osnovu rezolucija svih parova pikova, rezolucija tri kritična para (CRF-3/CEF-3) i hromatograma, pokazano je da su optimalni uslovi za razdvajanje ispitivanih jedinjenja centralne tačke dizajna.
- Pod sličnim hromatografskim uslovima sa malim modifikacijama gradijenta dobijeno je razdvajanje ispitivanih jedinjenja uz dobre hromatografske performanse i kratko vreme analize na UPLC-DAD sistemu čime je pokazano da je moguć transfer metode na UPLC sisteme sa UV detekcijom.
- UPLC-MS-MS metoda je validirana i potvrđena je njena primena za određivanje ziprasidona i njegovih nečistoća u aktivnoj supstanci i doziranim oblicima uz značajno skraćanje vremena izvođenja hromatografske analize i mogućnost karakterizacije nepoznatih degradacionih proizvoda što je prednost ove metode u odnosu na prethodno razvijenu.

4. Karakterizacija hemijske strukture *nepoznate nečistoće* vršena je primenom UPLC-MS/MS metode.

- Ispitan je i predložen mehanizam fragmentacije za svaki analit određivanjem masa molekulskih jona i fragmenata.
- Predložen je fragmentacioni put *nepoznate nečistoće* na osnovu dobijenog signala u pozitivnom HESI modu za molekulski jon (na m/z 823) i glavnih fragmenata (na m/z 729, 413, 411, 196, 194) i predstavljena je najverovatnija struktura *nepoznate nečistoće*. MS-MS studijom je i eksperimentalno potvrđena struktura ove nečistoće (TS1) koja je pretpostavljena QSRR studijom.

6. LITERATURA

- [1] Beale J.M., Block J.H. *Wilson and Gisvold's Textbook of ORGANIC MEDICINAL AND PHARMACEUTICAL CHEMISTRY*, 12th Ed., **2011**, 457-469.
- [2] Rosa, A. R., Franco C., Torrent C., Comes M., Cruz N., Horga G., Benabarre A., Vieta E. Ziprasidone in the Treatment of Affective Disorders: A Review. *CNS Neuroscience & Therapeutics* **2008**, 14, 278–286.
- [3] American Psychiatric Association, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders of the American Psychiatric Association*, 4th Ed., Revised text, Washington, DC: APA Press, **2000**.
- [4] Owen M.J., Craddock N., O'Donovan M.C. Suggestion of roles for both common and rare risk variants in genome-wide studies of schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* **2010**, 67 (7), 667-673.
- [5] Park S.W., Lee C.H., Lee J.G., Kim L.W., Shin B.S., Lee B.J. et al. Protective effects of atypical antipsychotic drugs against MPP(+)-induced oxidative stress in PC12 cells. *Neurosci. Res.* **2011**, 69, 283–290.
- [6] Lemke T.L., Williams D.A., Roche V.F., Zito S.W. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*, 7th Ed., Lippincot Williams & Wilkins, Baltimore **2012**, 449-484.
- [7] Booth R.G., Baldessarini R.J. Adenosine A₂ stimulation of tyrosine hydroxylase in rat striatal minces is reversed by dopamine D₂ autoreceptor activation. *Eur. J. Pharmacol.* **1990**, 185 (2-3), 217-221.
- [8] Choksi N.Y., Nix W. B., Wyrick S.D, Booth R.G. A novel phenylaminotetralin (PAT) recognizes histamine H₁ receptors and stimulates dopamine synthesis in vivo in rat brain. *Brain Res.* **2000**, 852(1), 151-160.
- [9] Johnson E.A., Tsai C.E., Shahan Y.H. i Azzaro A.J. Serotonin 5-HT_{1A} receptors mediate inhibition of tyrosine hydroxylation in rat striatum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1993**, 266 (1), 133-141.
- [10] Booth R.G., Fang L., Huang Y., Wilczynski A., Sivendran S. (1R, 3S)-(-)-trans-PAT: a novel full-efficacy serotonin 5-HT_{2C} receptor agonist with 5-HT_{2A} i 5-HT_{2B} receptor inverse agonist/antagonist activity. *Eur. J. Pharmacol.* **2009**, 615, 1-9.

- [11] Miller R. Mechanisms of Action of Antipsychotic Drugs of Different Classes, Refractoriness to Therapeutic Effects of Classical Neuroleptics, and Individual Variation in Sensitivity to their Actions: PART I. *Curr. Neuropharmacol.* **2009**, 7(4), 302–314.
- [12] Wong E.H., Tarazi F.I., Shahid M. The effectiveness of multi-target agents in schizophrenia and mood disorders: Relevance of receptor signature to clinical action. *Pharmacology & Therapeutics* **2010**, 126 (2), 173-185.
- [13] Kirk S.L., Glazebrook J., Grayson B., Neill J.C., Reynolds G.P. Olanzapine-induced weight gain in the rat: role of 5-HT_{2C} and histamine H₁ receptors. *Psychopharmacology* **2009**, 207(1), 119-125.
- [14] Roli N.E., Crump E.M., Nguyen N., Robertson K., Sun Z., Booth R.G. Effect of (–)-*trans*-PAT, a novel 5-HT_{2C} receptor agonist, on intake of palatable food in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2008**, 91(1), 176–180.
- [15] Reynolds G.P, Kirk S.L. Metabolic side effects of antipsychotic drug treatment-pharmacological mechanisms. *Pharmacol. Ther.* **2010**, 125(1), 169-79.
- [16] Stip E., Zhornitsky S., Motesafi H., Létourneau G., Stikarovska I., Potvin S., Tourjman V. Ziprasidone for Psychotic Disorders: A Meta-Analysis and Systematic Review of the Relationship Between Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Clinical Profile. *Clinical Therapeutics* **2011**, 33 (12), 1853-1867.
- [17] Harrison, T.S., Scott, L.J., Ziprasidone: a review of its use in schizophrenia and schizoaffective disorder. *CNS Drugs* **2006**, 20(12), 1027–1052.
- [18] Schmidt A.W., Lebel L.A., Howard Jr., H.R., Zorn S.H. Ziprasidone: a novel antipsychotic agent with a unique human receptor binding profile. *Eur. J. Pharmacol.* **2001**, 425, 197–201.
- [19] Rummel-Kluge C., Komossa K., Schwarz S, et al. Head-to-head comparisons of metabolic side effects of second generation antipsychotics in the treatment of schizophrenia: a systematic review and meta-analysis. *Schizophr. Res.* **2010**, 123, 225–233.
- [20] Stahl S.M, Shayegan D. The psychopharmacology of ziprasidone: Receptor-binding properties and real-world psychiatric practice. *J. Clin. Psychiatry* **2003**, 64 (19), 6–12.

- [21] Gautam D., Ruiz de Azua I., Li J.H., et al. Beneficial metabolic effects caused by persistent activation of beta-cell M₃ muscarinic acetylcholine receptors in transgenic mice. *Endocrinology* **2010**, 151, 5185–5194.
- [22] Ichikawa O., Okazaki K., Nakahira H., Maruyama M., Nagata R., Tokuda K., Horisawa T., Yamazaki K. Structural insight into receptor-selectivity for lurasidone. *Neurochemistry International* **2012**, 61, 1133–1143.
- [23] Greenberg W.M., Citrome L. Ziprasidone for schizophrenia and bipolar disorder: a review of the clinical trials. *CNS Drug Rev.* **2007**, 13, 137–177.
- [24] Nivoli A.M.A., Murru A., Goikolea J.M., Crespo J.M., Montes J.M., González-Pinto A., García-Portilla P., Bobes J., Sáiz-Ruiz J., Vieta E. New treatment guidelines for acute bipolar mania: A critical review. *Journal of Affective Disorders* **2012**, 140, 125–141.
- [25] Sallee F.R., Miceli J.J., Tensfeldt T., et al. Single-dose pharmacokinetics and safety of ziprasidone in children and adolescents. *J. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* **2006**, 45, 720–728.
- [26] John M., Eisenberg Center for Clinical Decisions and Communications Science, Off-label use of atypical antipsychotics: an update, in: Comparative Effectiveness Review Summary Guides for Clinicians [Internet], Agency for Healthcare Research and Quality (US), Rockville, MD, 2012.
- [27] Schwartz T.L., Stahl S.M. Treatment Strategies for Dosing the Second Generation Antipsychotics. *CNS Neuroscience & Therapeutics* **2011**, 17, 110–117.
- [28] Citrome L., Jaffe A, Levine J. The ups and downs of dosing second generation antipsychotics. *Psychiatr. Serv.* **2007**, 58, 11.
- [29] Yuksela A., Erdura B., Kortunayb S., Erginc A. Assessment of propofol, midazolam and ziprasidone, or the combinations for the prevention of acute cocaine toxicity in a mouse model. *Environmental toxicology and pharmacology* **2013**, 35, 61–66.
- [30] Cleveli N.R., Krier S., Heard K. Ziprasidone, diazepam, or the combination for prevention of cocaine toxicity in a mouse model. *Acad. Emerg. Med.* **2007**, 14 (6), 691–694.

- [31] Penga Z., Zhanga R., Wanga H., Chena Y., Xuea F., Wanga L., Yanga F., Chena Y., Liub L., Kuangb F., Tana Q. Ziprasidone ameliorates anxiety-like behaviors in a rat model of PTSD and up-regulates neurogenesis in the hippocampus and hippocampus-derived neural stem cells. *Behavioural Brain Research* **2013**, 244 1– 8.
- [32] Thombre A.G., Caldwell W. B., Friesen D. T., McCray S. B., Sutton S.C. Solid Nanocrystalline Dispersions of Ziprasidone with Enhanced Bioavailability in the Fasted State. *Mol. Pharmaceutics* **2012**, 9, 3526–3534.
- [33] Lincoln J., Stewart M.E., Preskorn S.H. How sequential studies inform drug development: evaluating the effect of food intake on optimal bioavailability of ziprasidone. *J. Psychiatr. Pract.* **2010**, 16, 103–114
- [34] Miceli J.J., Glue P., Alderman J., Wilner K. The effect of food on the absorption of oral ziprasidone. *Psychopharmacol. Bull.* **2007**, 40(3), 58–68.
- [35] Caley C.F., Cooper C.K. Ziprasidone: the fifth atypical antipsychotic. *Ann. Pharmacother.* **2002**, 36, 839–851.
- [36] Sweetman S.(ed), Martindale: The Complete Drug Reference 36, Pharmaceutical Press, London, **2009**.
- [37] Prakash C., Kamel A., Gummerus J., Wilner K. Metabolism and excretion of a new antipsychotic drug ziprasidone, in humans. *Drug Metab. Dispos.* **1997**, 25(7), 863-872.
- [38] Prakash C., Kamel A., Cui D., Whalen R.D., Miceli J.J., Tweedie D., Identification of the major human liver cytochrome P450 isoform(s) responsible for the formation of the primary metabolites of ziprasidone and prediction of possible drug interactions. *J. Clin. Pharmacol.* **2000**, 49 (1), 35 – 42.
- [39] Thombre A.G., Herbig S.M., Alderman J.A. Improved Ziprasidone Formulations with Enhanced Bioavailability in the Fasted State and a Reduced Food Effect. *Pharm. Res.* **2011**, 28 (12), 3159–3170.
- [40] Hong J., Shah J.C., McGonagle M.D., Effect of Cyclodextrin Derivation and Amorphous State of Complex on Accelerated Degradation of Ziprasidone. *Journal of Pharmaceutical sciences* **2011**, 100 (7), 2703-2716.

- [41] Portell A., Barbas R., Font-Bardia M., Dalmases P., Prohens R., Puigjaner C., Ziprasidone malate, a new trimorphic salt with improved aqueous solubility. *CrystEngComm*. **2009**, 11, 791–795.
- [42] Kim Y., Oksanen D.A., Massefski W., Blake J.F., Duffy E.M., Chrunk B. Inclusion Complexation of Ziprasidone Mesylate with β -Cyclodextrin Sulfobutyl Ether, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1998**, 87 (12), 1560-1567.
- [43] European Pharmacopoeia, 8th Ed., Council of Europe, Strasbourg Cedex, 2014.
- [44] The United States Pharmacopeia 35, United States Pharmacopeial Convention, Rockville, 2011.
- [45] Johnson K.C., Kim Y., Shanker R.M. Inclusion complexes of aryl-heterocyclic salts, PCT Int. Appl., **1997**, WO 1997041896.
- [46] Thombre G., Shah J.C., Sagawa K., Caldwell W.B. In vitro and in vivo characterization of amorphous, nanocrystalline, and crystalline ziprasidone formulations. *International Journal of Pharmaceutics* **2012**, 428, 8– 17.
- [47] Kaminski K., Adrjanowicz K., Wojnarowska Z., Grzybowska K., Hawelek L., Paluch M., Zakowiecki D., Mazgalski J. Molecular Dynamics of the Cryomilled Base and Hydrochloride Ziprasidones by Means of Dielectric Spectroscopy. *J. Pharm. Sci.* **2011**, 100 (7), 2642-2657.
- [48] ICH Q3B(R2), Impurities In New Drug Products, International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, **2006**.
- [49] Singh A., Rao B.M., Desphie G.R., Sangaraju S., Srinivasu M.K., Devi M.L., Satyanarayana P.V.V., Chirasekhar, K.B. A Rapid Stability-Indicating LC Method for Ziprasidone Hydrochloride. *Chromatographia* **2007**, 65, 191–196.
- [50] Dhakane V.D., Kotharkar S.A., Ubale M.B. Validated stability-indicating high-performance liquid chromatographic method for determination of ziprasidone hydrochloride in bulk drug and dosage form. *Anal. Chem.: Ind. J.* **2008**, 7(4), 245–250.
- [51] Sharp T.R., Leeman K.R., Bryant D.E., Horan G.J. On the photoisomerization of the benzisothiazole portion of ziprasidone. *Tetrahedron Letters* **2003**, 44(8), 1559-1561.

- [52] Pavlovic M., Vojvodic L.J., Mihaljica S., Nikolic K., Agbaba D., *Generic drugs – force degradation studies* (oralna prezentacija), Drugi kongres farmaceuta Bosne i Hercegovine sa međunarodnim učešćem, Banja Luka, 17 - 20.11.2011.
- [53] Muller L., Mauthe R.J., Riley C.M., Iino M.M., De Antonis D., Beels C., De George J., De Knaep A.G.M., Ellison D., Fagerli J.A., Frank R., Fritschel B., Galloway S., Harpur E., Humfrey C.D.N., Jacks A.S., Jagota N., Mackinnon J., Mohan G., Ness D.K., O'Donovan M.R., Smith M.D., Vudathala G., Yotti L. A rationale for determining, testing, and controlling specific impurities in pharmaceuticals that possess potential for genotoxicity. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2006**, 44, 198–211.
- [54] Elder D.P., Lipczynski A.M., Teasdale A. Control and analysis of alkyl and benzyl halides and other related reactive organohalides as potential genotoxic impurities in active pharmaceutical ingredients (APIs). *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, 48, 497–507.
- [55] Committee For Medicinal Products for Human Use, *Guideline on the limits of genotoxic impurities*, European Medicines Agency, London, United Kingdom, **2006**.
- [56] Mohamed I., Belal W.&F., El-Enany N., Eid M., El-Shaheny R.N. Stability-Indicating Spectrofluorimetric Method for the Assay of Ziprasidone in Capsules. *J. Fluoresc.* 2011, 21, 1659–1667.
- [57] Prasanthi N.L., Rao R.N. High performance liquid chromatographic estimation of ziprasidone in pharmaceutical dosage forms. *IJPPS* **2010**, 2(1), 120–122.
- [58] El-Sherif Z.A., El-Zeany B., El-Houssini O.M., et al. Stability indicating reversed-phase high-performance liquid chromatographic and thin layer densitometric methods for the determination of ziprasidone in bulk powder and in pharmaceutical formulations. *Biomed. Chromatogr.* **2004**, 18, 143-149.
- [59] Bansal R., Chirabose K., Moorthy N.S.H.N., Singh D.P., Singh D., Trivedi P. A new simple and rapid validated RP-HPLC method for determination of ziprasidone in ziprasidone capsules. *Journal of Saudi Chemical Society* **2012**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jscs.2012.10.005>.
- [60] Shetty S.K., Surendranath K.V., Radhakrishnanni P., Satish J., Jogul J., Tripathi U.M. LC-UV and LC-MS Study Of Stress Degradation Behavior Of Ziprasidone

- HCl and Development Of Rapid UHPLC Stability-Indicating Related Substances & Assay Method. *Anal. Chem.: Indian J.* **2010**, 9(2), 270-278.
- [61] Green K., Parish R.C. Stability of Ziprasidone Mesylate in an Extemporaneously Compounded Oral Solution. *The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics* **2010**, 15(2), 138-141
- [62] Devi S.U., Latha E.P., Guptha C.V.N.K., Ramalingam P. Development and validation of HPTLC method for estimation of ziprasidone hydrochloride in bulk and pharmaceutical dosage forms. *IJPI's Journal of Analytical Chemistry* **2011**, 1:2, 41-46.
- [63] Sharma S. et al., Simultaneous Determination and validation of Ziprasidone Hydrochloride in Dosage form by Densitometric. *Drug Invention Today* **2011**, 3(6), 102-103.
- [64] Skibinski R., Komsta L. Validation of NP-HPTLC and RP-HPTLC methods with videodensitometric detection for analysis of ziprasidone in pharmaceutical formulations. *J. Planar. Chromatogr –Mod. TLC* **2010**, 23, 23-27.
- [65] Chaudasama et al. Development and validation of three new assay methods for ziprasidone HCl monohydrate using UV-spectrophotometry. *IJPRD* **2011**, 3(3): 8, 57–63.
- [66] Kumar Y.A., Anitha M., Hemanth A., Srinivas S. Development of rapid UV spectrophotometric method for the estimation of ziprasidone hydrochloride in bulk and formulations. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* **2010**, 5, 279–283.
- [67] Sambhaji S.D., Vaishali V.P., Paresh R.M., Pramod V.K., Vikram S.G. Development and Evaluation of Ziprasidone Hydrochloride Fast Disintegrating/Dissolving Tablets using Complexation Techniques. *Indian J.Pharm. Educ. Res.* 2009, 43(3), 300-307.
- [68] Vijayalakshmi R., Satish Chira B., Sravyak K., Jahnavin N., Dhanaraju M.D. Spectrophotometric determination of ziprasidone hydrochloride in pharmaceutical formulations. *Oriental Journal of Chemistry* **2009**, 25(4), 1097-1099.
- [69] Kishorea M., Hanumantharaob Y. A Validated Spectrophotometric methods for the determination of Ziprasidone as Hydrochloride in Bulk and pharmaceutical

- formulations. *International Journal of Chemical and Analytical Science* **2010**, 1(7), 151-153.
- [70] Srinubabu G., Rani B.S., Seshagiri Rao J.V.L.N. Spectrophotometric determination of Ziprasidone in pharmaceutical formulations. *E-Journal of Chemistry* **2006**, 3, 9–12.
- [71] Annapurna V., Jyothi G., Sailaja B.B.V. Spectrophotometric Determination of Ziprasidone Hydrochloride Using N-Bromosuccinimide and Metol, *Asian Journal of Chemistry* **2009**, 21(8), 5901-5907.
- [72] Farina C., Kremser L., Raggi M.A., Kenndler E. Determination of Ziprasidone in pharmaceutical formulations by capillary zone electrophoresis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, 46, 471–476.
- [73] Kul D., Gumustas M., Uslu B., Ozkan S.A. Electroanalytical characteristics of antipsychotic drug ziprasidone and its determination in pharmaceuticals and serum samples on solid electrodes. *Talanta* **2010**, 82, 286–295.
- [74] García M.S., Ortuño J.A., Cuartero M., Abuherba M.S. Use of a New Ziprasidone-Selective Electrode in Mixed Solvents and Its Application in the Analysis of Pharmaceuticals and Biological Fluids. *Sensors* **2011**, 11, 8813-8825.
- [75] Mercolinia L., Protti M., Fulgenzi G., Mirioli R., Ghedinia N., Conca A., Raggi M.A. A fast and feasible microextraction by packed sorbent (MEPS) procedure for HPLC analysis of the atypical antipsychotic ziprasidone in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2014**, 88, 467–471.
- [76] Janiszewski J.S., Fouda H.G., Cole R.O. Development and validation of a high-sensitivity assay for an antipsychotic agent, CP-88,059, with solid-phase extraction and narrow-bore high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* **1995**, 668, 133-139.
- [77] Aravagiri M., Marder S.R., Pollock B. Determination of ziprasidone in human plasma by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry and its application to plasma level determination in schizophrenia patients. *Journal of Chromatography B* **2007**, 847, 237–244.
- [78] Al-Dirbashi O.Y., Aboul-Enein H.Y., Al-Odaib A., Jacob M., Rashed M.S. Rapid liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for

- quantification of ziprasidone in human plasma. *Biomed. Chromatogr.* **2006**, 20, 365–368.
- [79] Janiszewski J., Schneider R.P., Hoffmaster K., Swyden M., Wells D., Fouda H., Automated Sample Preparation Using Membrane Microtiter Extraction for Bioanalytical Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1997**, 11, 1033–1037.
- [80] Zhang G., Terry A.V., Bartlett M.G. Determination of the lipophilic antipsychotic drug ziprasidone in rat plasma and brain tissue using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.* **2008**, 22, 770–778.
- [81] Suckowa R.F., Fein M., Correll C.U., Cooper T.B. Determination of plasma ziprasidone using liquid chromatography with fluorescence detection, *Journal of Chromatography B* **2004**, 799, 201–208.
- [82] Hasselstrøm J., Quantification of antidepressants and antipsychotics in human serum by precipitation and ultra high pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B* **2011**, 879 (1), 123–128.
- [83] Kirchherr H., Kuhn-Velten W.N. Quantitative determination of forty-eight antidepressants and antipsychotics in human serum by HPLC tandem mass spectrometry: A multi-level, single-sample approach. *Journal of Chromatography B* **2006**, 843, 100–113.
- [84] Vecchionea G., Casettad B., Chiapparinoa A., Bertolinob A., Tomaiuoloa M., Cappuccia F., Gattac R., Margaglione M., Grionea E. A reliable and rapid tool for plasma quantification of 18 psychotropic drugs by ESI tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2012**, 67– 68, 104– 113.
- [85] Josefsson M., Kronstri R., Iersson J., Roman M. Evaluation of electrospray ionisation liquid chromatography–tandem mass spectrometry for rational determination of a number of neuroleptics and their major metabolites in human body fluids and tissues. *Journal of Chromatography B* **2003**, 789(1), 151–167.
- [86] Zhang G., Terry A.V., Bartlett M.G. Simultaneous determination of five antipsychotic drugs in rat plasma by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B* **2007**, 856, 20–28.

- [87] Zhang G., Terry A.V., Bartlett M.G. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of olanzapine, risperidone, 9-hydroxyrisperidone, clozapine, haloperidol and ziprasidone in rat plasma. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, 21, 920–928.
- [88] Zhang G., Terry A.V., Bartlett M.G. Sensitive liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of olanzapine, risperidone, 9-hydroxyrisperidone, clozapine, haloperidol and ziprasidone in rat brain tissue. *Journal of Chromatography B* **2007**, 858, 276–281.
- [89] Sampedro M.C., Unceta N., Gomez-Caballero A., Callado L.F., Morentin B., Goicolea M.A., Meana J.J., Barrio R.J. Screening and quantification of antipsychotic drugs in human brain tissue by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Application to postmortem diagnostics of forensic interest. *Forensic Science International* **2012**, 219, 172–178.
- [90] Wold S. Chemometrics; what do we mean with it, and what do we want from it. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **1995**, 30, 109–115.
- [91] Armstrong N.A. *Pharmaceutical experimental design and interpretation*, 2nd Ed., Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA **2006**.
- [92] Mutihac L., Mutihac R. Mining in chemometrics. *Anal. Chim. Acta* **2008**, 612, 1–18.
- [93] Brereton R.G. *Chemometrics - data analysis for the laboratory and chemical plant*, John Wiley & Sons Ltd. Chichester, **2003**.
- [94] Deming S.N., Morgan S.L., *Experimental design: a chemometric approach*, 2nd Ed., Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, **1993**.
- [95] Kovačić Z. *Multivariaciona analiza*, Ekonomski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd **1994**.
- [96] Ferreira S.L.C., Bruns R.E., da Silva E.G.P., dos Santos W.N.L., Quintella C.M., David J.M., de Itrade J.B., Breitzkreitz M.C., Jardim I.C.S.F., Neto B.B. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems *J Chromatogr A* **2007**, 1158, 2–14.
- [97] Wold S., Sjöström M., Eriksson L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometr. Intell. Lab.* **2001**, 58, 109–130.

- [98] Eriksson L., Johansson E., Kettaneh-Wold N., Trygg J., Wikstrom C., Wold S.(Eds.), *Multi- and Megavariate Data Analysis. Basic Principles and Applications I*, 2nd Ed., Umetrics Academy, Umeå **2001**, pp. 39-103.
- [99] Wermuth C.G. *The Practice of Medicinal Chemistry*, 3rd Ed., Academic Press, Oxford, **2008**. google e-books.
- [100] Bodzioch K., Duri A., Kaliszan R., Baczek T., Vanden Heyden Y. Advanced QSRR modeling of peptides behavior in RPLC. *Talanta* **2010**, 81, 1711–1718.
- [101] Wold S. PLS for multivariate linear modeling., Han van de Waterbeemd (Ed.) *Chemometric methods in molecular design*, Vol 2. Wiley-VCH, **1995**, 195-218.
- [102] Mehmood T., Martens H., Sæbø S., Warringer J., Snipen L. A Partial Least Squares algorithm for parsimonious variable selection. *Algorithms for Molecular Biology* **2011**, 6, 1-12.
- [103] Agatonovic-Kustrin S., Beresford R. Basic concepts of artificial neural network (ANN) modeling and its application in pharmaceutical research. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2000**, 22, 717-727.
- [104] Basher I.A., Hajmeer M. Artificial neural networks: fundamentals, computing, design and application. *J. Microbiol. Methods* **2000**, 43, 3-31.
- [105] S. Ibrić, M. Knežević, J. Parojčić, Z. Đurić. Primena veštačkih neuronskih mreža u formulaciji farmaceutskih preparata. *Arh. farm.* **2007**, 57, 399 – 414.
- [106] Mehrotra K., Mohan K.C., Ranka S. *Elements of artificial neural networks*. Massachusetts Institute of Technology Press, Cambridge, English **1996**.
- [107] Yannis L.L. Artificial neural networks in liquid chromatography: efficient and improved quantitative structure – retention relationship models. *J. Chromatogr. A* **2000**, 904(2), 119–129.
- [108] Braspenning P.J., Thuijsman F., Weijters A.J.M.M. (Eds), *Artificial Neural Networks: An Introduction to ANN Theory and Practice*, Springer-Verlag Berlin, **1995**, pp. 2.
- [109] Massart D.L., Vieginsté B.G.M., Buydens L.M.C., De Jong, S., Lewi, P.J., Smeyers-Verbeke J. In: *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*, Elsevier, Amsterdam, **1997**, pp. 519–557.

- [110] Vieginsten B.G.M., Massart D.L., Buydens L.M.C., De Jong, S., Lewi, P.J., Smeyers-Verbeke, J. In: *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B*, Elsevier, Amsterdam, **1998**, pp. 57-150.
- [111] Jolliffe T., *Principal Components Analysis*, Springer, New York, **1986**.
- [112] Wold S., *Principal Components Analysis, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **1987**, 2, 37-52.
- [113] Massart D.L., Kaufman L. *The interpretation of analytical data by the use of cluster analysis*, John Wiley & Sons, New York, **1983**.
- [114] Vogt W., Nagel D., Sator H. *Cluster analysis in clinical chemistry; A model*, John Wiley & Sons, New York, **1987**.
- [115] Kaufman L., Rousseeuw P.J. *Finding groups in data; An introduction to cluster analysis*, John Wiley & Sons, New York, **1990**.
- [116] Romesburg H.C. *Cluster analysis for researchers*, Lifetime Learning Publications, Belmont, California, **1984**.
- [117] Ward Jr.J.H. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association* **1963**, 58, 236-244.
- [118] Song Z., Hashi Y., Sun H., Liang Y., Lan Y., Wang H., Chen S. Simultaneous determination of 19 flavonoids in commercial trollflowers by using high-performance liquid chromatography and classification of samples by hierarchical clustering analysis, *Fitoterapia* **2013**, 91, 272–279.
- [119] Zhao Y., Li Z., Zhou X., Cai Z., Gong X., Zhou C. Quality evaluation of *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth by high performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2008**, 48(4), 1230–1236.
- [120] Đaković-Sekulić T., Smolinski A., Perišić-Janjić N., Janicka M. Chemometric characterization of (chromatographic) lipophilicity parameters of newly synthesized s-triazine derivatives. *Journal of Chemometrics* **2008**, 22 (3-4), 195–202.
- [121] Put R., Vanden Heyden Y. Review on modelling aspects in reversed-phase liquid chromatographic quantitative structure–retention relationships. *Analytica chimica acta* **2007**, 602, 164–172.

- [122] Đaković-Sekulić T., Lozanov-Crvenković Z., Perišić-Janjić N. Statistical methods in physico-chemical characterization of newly synthesized compounds. *Novi Sad J. Math.* **2008**, 38(3), 39-46.
- [123] Schuster G., Lindner W. Comparative characterization of hydrophilic interaction liquid chromatography columns by linear solvation energy relationships. *Journal of Chromatography A* **2013**, 1273, 73– 94.
- [124] Németh T., Haghedooren E., Noszál B., Hoogmartens J., Adams E. Three methods to characterize reversed phase liquid chromatographic columns applied to pharmaceutical separations. *Journal of Chemometrics* **2008**, 22 (3-4), 178-185.
- [125] Diana J., Visky D., Roets E., Hoogmartens J. Development and validation of an improved method for the analysis of vancomycin by liquid chromatography: Selectivity of reversed-phase columns towards vancomycin components. *Journal of chromatography A* **2003**, 996, 115-131.
- [126] Plenis A., Oledzka I., Baczek T. Classification of LC columns based on the QSRR method and selectivity toward moclobemide and its metabolites. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2013**, 78–79, 161–169.
- [127] Morris V.M., Hughes J.G., Marriott P.J. Examination of a new chromatographic function, based on an exponential resolution term, for use in optimization strategies: application to capillary gas chromatography separation of phenols. *J. Chromatogr. A* **1996**, 755, 235–243.
- [128] Berridge J.C. Unattended optimisation of reversed-phase high-performance liquid chromatographic separations using the modified simplex algorithm. *J. Chromatogr.* **1982**, 244(1), 1–14.
- [129] Schlabach T.D., Excoffier J.L. Multi-variate ranking function for optimizing separations. *J. Chromatogr.* **1988**, 439, 173–184.
- [130] Duarte R.M.B.O., Duarte A.C. A new chromatographic response function for use in size-exclusion chromatography optimization strategies: Application to complex organic mixtures. *J. Chromatogr. A* **2010**, 1217, 7556–7563.
- [131] Jančić-Stojanović B., Rakić T., Kostić N., Vemić A., Malenović A., Ivanović D., Medenica M. Advancement in optimization tactic achieved by newly developed

- chromatographic response function: Application to LC separation of raloxifene and its impurities. *Talanta* **2011**, 85, 1453–1460.
- [132] Siouffi A.M., Phan-Tan-Luu R. Optimization methods in chromatography and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **2000**, 892, 75–106.
- [133] Garcia-Alvarez-Coque M.C., Torres-Lapasio J.R., Baeza-Baeza J.J. Models and objective functions for the optimisation of selectivity in reversed-phase liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 579, 125-145.
- [134] Cela R., Martinez J.A., Gonzalez-Barreiro C., Lores M. Multi-objective optimisation using evolutionary algorithms: its application to HPLC separations. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2003**, 69, 137-156.
- [135] Gorynski K., Bojkoa B., Nowaczyk A., Bucinski A., Pawliszyn J., Kaliszan R. Quantitative structure–retention relationships models for prediction of high performance liquid chromatography retention time of small molecules: Endogenous metabolites and banned compounds. *Analytica Chimica Acta* **2013**, 797, 13– 19.
- [136] Ghasemi J., Saaidpour S. QSRR Prediction of the Chromatographic Retention Behavior of Painkiller Drugs. *Journal of Chromatographic Science* **2009**, 47, 156-163.
- [137] Noorizadeh H. et al. QSRR analysis of capacity factor of nanoparticle compounds. *Journal of Saudi Chemical Society* **2011**, doi:10.1016/j.jscs.2011.06.007.
- [138] Kaliszan R. QSRR: Quantitative Structure-(Chromatographic) Retention Relationships. *Chem. Rev.* **2007**, 107, 3212–3246.
- [139] Perisic-Janjic N., Kaliszan R., Wiczling P., Milosevic N., Uscumlic G., Banjac N. Reversed-phase TLC and HPLC retention data in correlation studies with *in silico* molecular descriptors and druglikeness properties of newly synthesized anticonvulsant succinimide derivatives. *Mol. Pharmaceut.* **2011**, 8, 555-563.
- [140] Wiczling P., Nasal A., Kubik Ł., Kaliszan R. A new pH/organic modifier gradient RP HPLC method for convenient determination of lipophilicity and acidity of drugs as applied to established imidazoline agents. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2012**, 47, 1–5.

- [141] Tan L.C., Carr P.W., Abraham M.H. Study of retention in reversed-phase liquid chromatography using linear solvation energy relationships I. The stationary phase. *J. Chromatogr. A* **1996**, 752, 1–18.
- [142] Espinosa S., Bosch E., Rosés M. Retention of ionizable compounds on high performance liquid Chromatography XI. Global linear solvation energy relationships for neutral and ionizable compounds. *J. Chromatogr. A* **2002**, 945, 83-96.
- [143] D'Archivio A.A., Maggi M.A, Mazzeo P., Ruggieri F. Quantitative structure–retention relationships of pesticides in reversed-phase high-performance liquid chromatography based on WHIM and GETAWAY molecular descriptors. *Anal.Chim. Acta* **2008**, 628, 162-172.
- [144] Goodarzi M., Jensen R., Vanden Heyden Y. QSRR modeling for diverse drugs using different feature selection methods coupled with linear and nonlinear regressions. *J. Chromatogr. B* **2012**, 910, 84-94.
- [145] Kaliszan R. Quantitative structure - retention relationships. *Anal. Chem.* **1992**, 64, 619-631.
- [146] Kaliszan R. Recent advances in quantitative structure-retention relationships. *Handbook of Analytical Separations*, Vol. 1. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, **2000**, pp. 503–534.
- [147] Young R.J. Physical Properties in Drug Design. *Topics in Medicinal Chemistry* **2014**, DOI 10.1007/7355_2013_35.
- [148] Stepensky D. Prediction of Drug Disposition on the Basis of its Chemical Structure. *Clin. Pharmacokinet.* **2013**, 52, 415–431.
- [149] Xu C., Barchet T.M., Mager D.E. Quantitative structure–property relationships of camptothecins in humans. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **2010**, 65(2), 325-333.
- [150] Walker J.R., Brown K., Rohatagi S., Bathala M.S., Xu C., Wickremasingha P.K., Salazar D.E., Mager D.E. Quantitative Structure-Property Relationships Modeling to Predict In Vitro and In Vivo Binding of Drugs to the Bile Sequestrant, Colesevelam (Welchol). *The Journal of Clinical Pharmacology* **2009**, 49(10), 1185–1195.
- [151] www.molecularDescriptors.eu

- [152] Todeschini R., Consonni V. *Handbook of Molecular Descriptors*, Wiley-VCH, Weinheim, **2009**.
- [153] Heberger K. Quantitative structure–(chromatographic) retention relationships. *Journal of Chromatography A* **2007**, 1158, 273–305.
- [154] Kunal Roy K., Roy P.P. Comparative chemometric modeling of cytochrome 3A4 inhibitory activity of structurally diverse compounds using stepwise MLR, FAML, PLS, GFA, G/PLS and ANN techniques. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, 44, 2913–2922.
- [155] Put R., Daszykowski M., Baczek T., Vanden Heyden Y. Retention prediction of peptides based on uninformative variable elimination by partial least squares. *J. Proteome Res.* **2006**, 5, 1618–1625.
- [156] Hancock T., Put R., Coomans D., Vanden Heyden Y., Everingham Y. A Performance Comparison of Modern Statistical Techniques for Molecular Descriptor Selection and Retention Prediction in Chromatographic QSRR Studies. *Chem. Intel. Lab. Sys.* **2005**, 76, 185–196.
- [157] Put R., Perrin C., Questier F., Coomans D., Massart D.L., Vanden Heyden Y. Classification and regression tree analysis for molecular descriptor selection and retention prediction in chromatographic quantitative structure–retention relationship studies. *J. Chromatogr. A* **2003**, 988, 261–276.
- [158] Ruggier F., D’Archivio A.A., Carlucci G., Mazzeo P. Application of artificial neural networks for prediction of retention factors of triazine herbicides in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2005**, 1076, 163–169.
- [159] Kaliszan R., Baczek T., Bucinski A., Buszewski B., Sztupecka M. Prediction of gradient retention from the linear solvent strength (LSS) model, quantitative structure-retention relationships (QSRR), and artificial neural networks (ANN). *J. Sep. Sci.* **2003**, 26, 271–282.
- [160] Tham S.Y., Agatonovic-Kustrin S. Application of the artificial neural network in quantitative structure-gradient elution retention relationship of phenylthiocarbamyl amino acids derivatives. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, 581–590.
- [161] Wang Y., Zhang X., Yao X., Gao Y., Liu M., Hu Z., Fan B. Prediction of $\log k_w$ of disubstituted benzene derivatives in reversed-phase high-performance

- liquid chromatography using multiple linear regression and radial basis function neural network. *Anal. Chim. Acta* **2002**, 463, 89–97.
- [162] Miller A.J. *Subset Selection in Regression*. London: Chapman and Hall, **1990**.
- [163] Draper N.R, Smith H. *Applied Regression Analysis*. New York: John Wiley & Sons Inc., **1981**.
- [164] Leach A.R., Gillet V.J., *An Introduction to Chemoinformatics*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, **2003**, p. 83.
- [165] Wold S., Ruhe A., Wold H., Dunn W.J. The Collinearity Problem in Linear Regression. The Partial Least Squares (PLS) Approach to Generalized Inverses. *Siam J. Sci. Stat. Comput.* **1984**, 5, 735–743.
- [166] SIMCA P+ program, Version 12.0, Umetrics AB, Umea, Švedska 2008.
www.umetrics.com
- [167] Peltarion Synapse 1.3.5. program, Peltarion HB, Stockholm, Švedska,
www.peltarion.com.
- [168] MATLAB ver 6.5 program, MathWorks, MA 01760-2098 USA, July **2002**.
- [169] Nowak M., Seubert A. Application of experimental design for the characterisation of a novel elution system for high-capacity anion chromatography with suppressed conductivity detection. *J. Chromatogr. A* **1999**, 855, 91–109.
- [170] Bezerra M.A., Santelli R.E., Oliveira E.P., Villar L.S., Escalera L.A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* **2008**, 76, 965–977.
- [171] Eriksson L., Johansson E., Kettaneh-Wold N., Trygg J., Wikstrom C., Wold S. (Eds.), *Design of Experiments, Principles and Applications*, 3rd ed., Umetrics Academy, Umea, Sweden **2008**.
- [172] CS Chem3D Ultra 7.0 (Property Picker ActiveX Control), Cambridge Soft Corporation, 100 Cambridge Park Dr. Cambridge, MA 02140-2317 U.S.A., **2001**. <http://www.cambridgesoft.com/>.
- [173] MarvinSketch 5.5.1.0 program, ChemAxon, Budimpešta, Mađarska, July **2011**,
www.chemaxon.com/products.html.
- [174] Stewart J.J.P. Optimization of parameters for semiempirical methods I. Method. *J. Comput. Chem.* **1989**, 10, 209-220.

- [175] Stewart J.J.P. Optimization of parameters for semiempirical methods II. Applications. *J. Comput. Chem.* **1989**, 10, 221-264..
- [176] Gaussian 98 (Revision A.7), M. J. Frisch et al., Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, **1998**.
- [177] Becke A.D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, 5648-5652.
- [178] Lee C. Yang W., Parr R.G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B.* **1988**, 37, 785-789.
- [179] Roothaan C.C.J. New Developments in Molecular Orbital Theory. *Rev. Mod. Phys.* **1951**, 23, 69-89.
- [180] Geerlings P., Proft F.D., Langenaeker W. Conceptual Density Functional Theory. *Chem. Rev.* **2003**, 103, 1793-1873.
- [181] Parr R.G., Pearson R.G. Absolute hardness: Companion parameter to absolute electronegativity. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105(26), 7512-7516.
- [182] Ponti A. DFT-based regioselectivity criteria for cycloaddition reactions. *J. Phys. Chem. A* **2000**, 104(39), 8843-8846.
- [183] Molteni G., Ponti A. Arylazide cycloaddition to methyl propiolate: DFT-based quantitative prediction of regioselectivity. *Chem. A.-Eur. J.* **2003**, 9(12), 2770-2774.
- [184] Parr R.G., Szentpaly L.V., Liu S.J. Electrophilicity index. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 1922-1924.
- [185] Petruczynik A., Waksmundzka-Hajnos M., Hajnos M.L. The Effect of Chromatographic Conditions on the Separation of Selected Alkaloids in RP-HPTLC. *Journal of Chromatographic Science* **2005**, 43, 183-194.
- [186] Snyder L.R., Dolan J.W., Carr P.W. The hydrophobic-subtraction model of reversed-phase column selectivity. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1060, 77-116.
- [187] Snyder L.R., Dolan J.W., Carr P.W. A New Look at the Selectivity of RPC Columns. *Anal. Chem.* **2007**, 79, 3254-3262.
- [188] Snyder L.R., Kirkli J.J., Glajch J.L. *Practical HPLC Method Development*, Wiley, New York, NY, **1997**.

- [189] Pavlovic M., Malesevic M., Nikolic K., Agbaba D. Development and validation of an HPLC method for determination of ziprasidone and its impurities in pharmaceutical dosage forms. *J. AOAC Int.* **2011**, 94(3), 713-722.
- [190] Lundstedt T., Seifert E., Abramo L., Thelin B., Nyström A., Pettersen J., Bergman R. Experimental design and optimization. *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* **1998**, 42, 3–40.
- [191] Allen D.M. The Relationship Between Variable Selection and Data Augmentation and a Method for Prediction. *Technometrics* **1974**, 16, 125–127.
- [192] Rosenblatt F. *Principles of Neurodynamics: Perceptrons and the Theory of Brain Mechanisms*. Spartan Books, Washington DC, **1961**.
- [193] Haykin S. *Neural Networks: A Comprehensive Foundation*. (2 ed.). Prentice Hall, **1998**.
- [194] Nikolic K., Pavlovic M., Smoliński A., Agbaba D. The Chemometric Study and Quantitative Structure Retention Relationship modeling of Liquid Chromatography separation of Ziprasidone components. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **2012**, 15, 730-744.
- [195] González-Arjona D., López-Pérez G., Gustavo González A. Non-linear QSAR modeling by using multilayer perceptron feedforward neural networks trained by back-propagation. *Talanta* **2002**, 56(1), 79-90.
- [196] ICH Q2 (R1), *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use*, **2005**.
- [197] Connolly M.L. The molecular surface package. *J. Mol. Graphics* **1993**, 11, 139-141.
- [198] Lee B., Richards F.M. The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility. *J. Mol. Biol.* **1971**, 55, 379-400.
- [199] Richards F.M., Areas, volumes, packing and protein structure, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **1977**, 6, 151-176.
- [200] Nasal A., Siluk D., Kaliszan R. Chromatographic retention parameters in medicinal chemistry and molecular pharmacology. *Cur. Med. Chem.* **2003**, 10, 381–426.

- [201] Bhal S.K., Kassam K., Peirson I.G., Pearl G.M. The Rule of Five Revisited: Applying LogD in Place of LogP in Drug-Likeness Filters. *Mol. Pharmaceut.* **2007**, 4, 556-560.
- [202] Thomasa S., Joshi S.C., Vir D., Agarwal A., Desai Rao R., Sridhar I., Xavier C.M., Mathelad C.S. Identification, characterization and quantification of a new impurity in deferasirox active pharmaceutical ingredient by LC–ESI–QT/MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2012**, 63, 112–119.
- [203] Ardrey B. *Liquid chromatography-Mass spectrometry: an introduction*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England **2003**.
- [204] Li B., Van Schepdael A., Hoogmartens J., Adams E. Characterization of impurities in tobramycin by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2009**, 1216, 3941–3945.
- [205] Hoffmann E., Stroobi V. *Mass spectrometry, Principles and applications*, 2nd Ed., John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England **2002**.
- [206] Gross J.H. *Mass spectrometry, A textbook*, 2nd Ed., Springer Science, Heidelberg, **2004**.
- [207] Hoffman E. Tandem Mass Spectrometry: A Primer. *J. Mass Spectrometry* **1996**, 31, 129-137.
- [208] Guillarme D., Nguyen D.T.T., Rudaz S., Veuthey J.L. Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis: Application to short columns packer with small particle. Part II: Gradient experiments. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2008**, 68, 430-440.
- [209] HPLC calculator download, in: ThermoScientific website [online]: <http://www.hplctransfer.com/GradientMethod.aspx>
- [210] Swartz M.E. UPLCTM: An Introduction and Review. *J. Liq.Chrom. and Related Tech.* **2005**, 28(7/8), 1253-1263.
- [211] Espinosa S., Bosch E., Roses M. Retention of Ionizable Compounds on HPLC. 12. The Properties of Liquid Chromatography Buffers in Acetonitrile–Water Mobile Phases That Influence HPLC Retention. *Anal. Chem.* **2002**, 74(15), 3809–3818.

- [212] Niessen W. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, 3rd Ed., Taylor and Francis Group, LLC, Boca Raton, USA **2006**.
- [213] Apffel A., Fisher S., Goldberg G., Goodley P.C., Kuhlman F.E. Enhanced sensitivity for peptide mapping with electrospray liquid chromatography-mass spectrometry in the presence of signal suppression due to trifluoroacetic acid-containing mobile phases. *J. Chromatogr. A* **1995**, 712, 177-190.
- [214] Ciioti L.V., Olivieri A.C., Goicoechea H.C. Simultaneous multiresponse optimization applied to epinastine determination in human serum by using capillary electrophoresis. *Anal Chim Acta* **2007**, 595, 310–318.
- [215] Ferrarini A., Huidobroa A.L., Pellati F., Barbas C. Development and validation of a HPLC method for the determination of sertraline and three non-chiral related impurities. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2010**, 53, 122–129.

7. PRILOZI

Prilog A: Tabele (1A.-4A.) sa eksperimentalno dobijenim vrednostima hromatografskih parametara koji su korišćeni u PCA i AHC analizama

SF – faktor simetrije pika

N - broj teoretskih platoa

α – faktor selektivnosti

Rs – rezolucija

T – tejling faktor

k' – faktor retencije

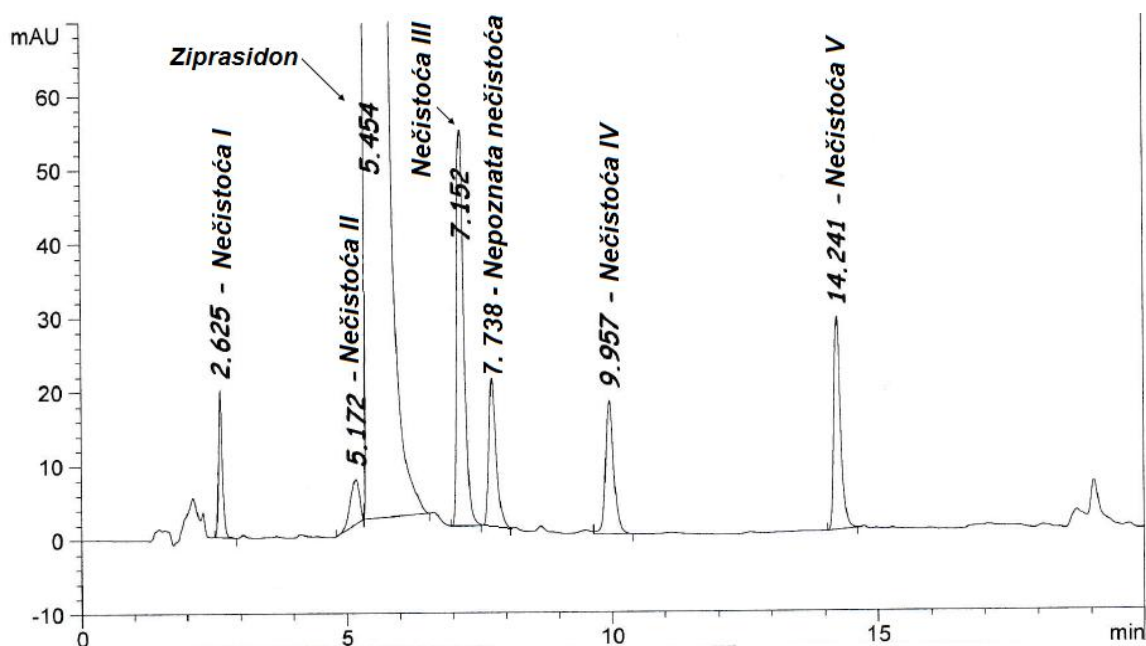
Tabela 1A N°	Naziv kolone	SF Neč II	SF Zip	SF Neč III	SF Nepoznate neč	SF Neč IV	SF Neč V	T zip USP	k' Neč V
1	Zorbax SBC8	1,09	0,643	0,995	1,339	1,234	1,009	1,207	7,617
2	Discovery HSC18	1,839	1,128	1,045	1,153	1,298	1,178	0,877	9,649
3	Zorbax XDBC18	2,515	0,734	0,811	1,11	1,016	0,847	1,069	8,509
4	Zorbax SBC18	1,675	0,684	0,766	0,934	0,866	0,739	1,19	9,518
5	Zorbax ExtendC18	1,836	0,994	0,986	1,102	1,485	1,082	0,87	8,574
6	Xterra RPC18	1,788	1,282	1,487	1,687	2,344	1,594	0,751	7,349
7	Chromolith RP-18e 100-4,6	2,558	0,765	1,399	1,757	1,035	1,324	1,031	7,7362
8	PurospherStar RP18	1,283	0,663	0,568	0,753	0,807	0,688	1,328	9,053
9	Spherisorb ODS1	1,27	0,5	0,8	0,8	1,074	0,82	1,858	7,995
10	BDS Hypersil	2,521	0,398	1,37	1,969	1,18	1,236	1,687	17,3791
11	Supelcosil LC-8DB	0,768	0,384	0,936	1,328	0,789	0,949	2,204	6,2780
12	Zorbax Eclipse XDBC8	1,252	0,367	0,893	1,061	0,7	0,821	2,111	8,7820
13	Spherisorb ODS 2	1,603	0,348	0,733	0,688	0,819	0,728	2,283	8,7076
14	Zorbax SB Phenyl	1,808	0,34	0,936	1,028	1,071	0,928	2,069	8,3446
15	Luna C18 (2)	1,246	0,375	0,96	1,142	1,108	0,969	1,899	7,2058
16	Bonus -RP Zorbax	1,829	0,747	1,072	1,478	0,991	1,184	1,006	13,5814
17	Zorbax SB CN	1,374	0,413	1,035	1,129	1,214	1,002	1,771	8,2367
18	Nucleosil100-5 C18	2,864	0,9665	1,018	0,89	0,938	0,783	1,026	8,3388
19	ODS Hypersil	1,318	0,465	0,878	0,872	0,912	0,895	1,783	10,8985
20	Symmetry Shield RP18	2,469	1,033	1,324	1,403	1,444	1,352	0,744	12,7473

Tabela 2A N°	Naziv kolone	Rs II/ZIP	Rs ZIP/III	Rs III/nepozn neč	Rs nepoznata neč/IV	Rs IV/V
1	Zorbax SBC8	0	7,664	2,26	25,356	0,802
2	Discovery HSC18	0	7,175	1,934	25,297	0
3	Zorbax XDBC18	0	7,859	2,365	24,352	1,437
4	Zorbax SBC18	0	7,292	2,836	18,685	5,277
5	Zorbax ExtendC18	0	7,955	1,845	16,866	0,713
6	Xterra RPC18	0	8,252	2,167	9,858	9,641
7	Chromolith RP-18e 100-4,6	0	8,374	2,742	7,311	2,886
8	PurospherStar RP18	0	7,28	1,923	26,933	0,561
9	Spherisorb ODS1	1,55	8,009	3,277	3,307	11,751
10	BDS Hypersil	0	11,02	2,77	4,088	2,292
11	Supelcosil LC-8DB	0	8,038	1,821	1,109	9,282
12	Zorbax Eclipse XDBC8	0	6,711	1,974	4,146	0
13	Spherisorb ODS 2	0,86	6,053	2,579	8,78	17,255
14	Zorbax SB Phenyl	0	4,775	3,148	10,502	10,758
15	Luna C18 (2)	0	6,407	2,718	30,612	1,343
16	Bonus -RP Zorbax	0	8,673	2,736	21,878	3,848
17	Zorbax SB CN	0	4,345	2,238	3,028	2,796
18	Nucleosil100-5 C18	1,64	5,554	2,038	6,609	6,791
19	ODS Hypersil	0	8,358	2,395	0	12,345
20	Symmetry Shield RP18	0	7,555	2,299	16,249	9,616

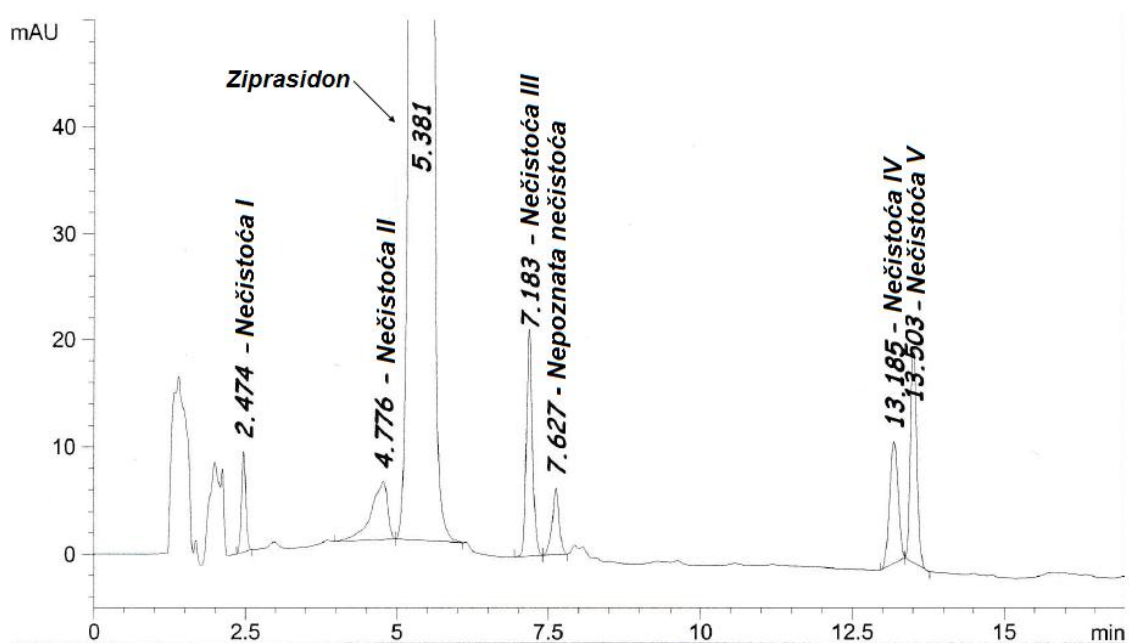
Tabela 3A N°	Naziv kolone	α II/zip	α zip/III	α III/nepoznata neč	α nepoznata neč/IV	α IV/V
1	Zorbax SBC8	1	1,387	1,073	1,873	1,014
2	Discovery HSC18	1	1,37	1,059	1,698	1
3	Zorbax XDBC18	1	1,455	1,077	1,895	1,027
4	Zorbax SBC18	1	1,37	1,09	1,562	1,08
5	Zorbax ExtendC18	1	1,508	1,074	1,856	1,02
6	Xterra RPC18	1	1,402	1,084	1,459	1,223
7	Chromolith RP-18e 100-4,6	1	2,22011	1,128694	1,34255	1,256242
8	PurospherStar RP18	1	1,34	1,065	1,676	1,007
9	Spherisorb ODS1	1,10	1,385	1,129	1,136	1,323
10	BDS Hypersil	1	1,779804	1,071724	1,118008	1,486152
11	Supelcosil LC-8DB	1	1,88974	1,084481	1,04689	1,478765
12	Zorbax Eclipse XDBC8	1	1,739852	1,100351	1,707934	1
13	Spherisorb ODS 2	1,076	1,425884	1,103078	1,353851	1,504594
14	Zorbax SB Phenyl	1	1,504263	1,151034	1,491384	1,422912
15	Luna C18 (2)	1	1,414025	1,081928	2,07114	1,025761
16	Bonus -RP Zorbax	1	1,479663	1,085484	1,771464	1,069038
17	Zorbax SB CN	1	1,5365	1,151318	1,200678	1,745056
18	Nucleosil100-5 C18	1,18	1,44493	1,082966	1,356117	1,249953
19	ODS Hypersil	1	1,687238	1,095684	1	1,720123
20	Symmetry Shield RP18	1	1,537	1,097	1,779687	1,266252

Tabela 4A N°	Naziv kolone	N Neč II	N Zip	N Neč III	N nepoznate neč	N Neč IV	N Neč V
1	Zorbax SBC8	1757	8413	29316	23659	54734	99809
2	Discovery HSC18	4829	6055	28643	23444	68592	159518
3	Zorbax XDBC18	1711	6068	25069	24775	40557	88609
4	Zorbax SBC18	3846	6515	28470	21623	61790	150488
5	Zorbax ExtendC18	4202	5501	18947	13924	29191	56638
6	Xterra RPC18	3245	9507	29593	12571	19641	188799
7	Chromolith RP-18e 100-4,6	1775	2952,5	24797,5	39430	32520	48440
8	PurospherStar RP18	5920	9966	22908	19669	97825	137551
9	Spherisorb ODS1	4132	12569	18191	15822	14295	140817
10	BDS Hypersil	2525	5970	77742,5	77502,5	55025	175670
11	Supelcosil LC-8DB	2155	3436,667	19571,67	23360	24848,33	20031,67
12	Zorbax Eclipse XDBC8	2003,333	2771,667	16198,33	16848,33	17963,33	24266,67
13	Spherisorb ODS 2	4255	4067	17213	17260	21922	63191
14	Zorbax SB Phenyl	3101,667	2796,667	20398,33	23078,33	31533,33	34230
15	Luna C18 (2)	3372	4358	32821	32496	52936	64230
16	Bonus -RP Zorbax	4045	9170	39073,33	39151,67	58840	213111,7
17	Zorbax SB CN	2070	2686,667	10123,33	11838,33	10631,67	32558,33
18	Nucleosil100-5 C18	2536	2627	15270	15633	8150	61613
19	ODS Hypersil	3855	4780	22800	20971,67	14211,67	71343,33
20	Symmetry Shield RP18	1763,333	7461,667	21626,67	24935	31061,67	93308,33

Prilog B: Hromatogrami rastvora standarda (ziprasidona i nečistoća I-V) posle 24h čuvanja na sobnoj temperaturi



Slika 1B. Hromatogram na koloni Waters Spherisorb[®] ODS 2 (4.6 × 250 mm, 5.0 μm)



Slika 2B. Hromatogram na koloni Nucleosil[®] 100-5 C18 (4.6 × 250 mm, 5.0 μm)

Prilog C: Spisak publikovanih radova i saopštenja

Radovi publikovani u međunarodnim časopisima

1. **Pavlovic M.**, Malesevic M., Nikolic K., Agbaba D. Development and Validation of an HPLC Method for Determination of Ziprasidone and Its Impurities in Pharmaceutical Dosage Forms. *Journal of AOAC International* **2011**, 94(3), 713-722. **M22**
2. Nikolic K., **Pavlovic M.**, Smoliński A., Agbaba D. The Chemometric Study and Quantitative Structure Retention Relationship modeling of Liquid Chromatography separation of Ziprasidone components. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **2012**, 15, 730-744. **M22**

Usmeno saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (M32)

1. **Pavlovic M.**, Vojvodić LJ., Mihaljica S., Nikolić K., Agbaba D., "Generic drugs – force degradation studies", Drugi Kongres farmaceuta Bosne i Hercegovine s međunarodnim učešćem, Banja Luka, BiH, Novembar 2011.

Saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima štampana u izvodu (M34)

1. **Pavlovic M.**, Malesevic M., Nikolic K., Agbaba D., "Development of the method for determination of ziprasidone and its impurities", The XXXIII Symposium - *Chromatographic methods of investigating organic compounds*, Katowice-Szczyrk (Poland), Maj 2010. p2
2. **Pavlovic M.**, Nikolic K., Smolinski A., Agbaba D., "Chemometric models for efficient predictions of chromatographic behavior of ziprasidone and its impurities", The XXXIV Symposium - *Chromatographic methods of investigating organic compounds*, Katowice-Szczyrk (Poland), Juni 2011. p2

3. Čarapić M., Nikolić K., Marković B., Pavlović M., Agbaba D. „Primena multivarijantne metode parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS) u modelovanju RP-UPLC-MS/MS sistema za ispitivanje ziprasidona i njegovih nečistoća", *VI Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem*, Beograd, Srbija, 15-19.10. 2014. (III nagrada za poster u sesiji Savremeni pristupi u dizajniranju i razvoju lekova+ Novi izazovi u analitici lekova).

8. Biografija

Marija Čarapić je rođena 05.06.1980. godine u Kragujevcu. Osnovnu školu i Drugu kragujevačku gimnaziju završila je u Kragujevcu kao nosilac Vukove diplome, a Farmaceutski fakultet u Beogradu upisala je školske 1999/2000. godine i diplomirala 2005. godine sa prosečnom ocenom 9,00 odbranivši diplomski rad pod nazivom „RP-TLC retencioni parametri u QSAR analizi agonista/antagonista alfa adrenergičkih i imidazolinskih receptora“ na Institutu Farmaceutске hemije sa ocenom 10. U toku studija bila je stipendista Republičke fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka. Od strane Univerziteta u Beogradu 2006. godine dobila je nagradu za najbolji stručni i naučno istraživački rad iz grupacije medicinskih fakulteta pod nazivom “QSPR/QSAR studies of some derivatives of imidazolines and amidines as drugs used in the treatment of cardiovascular disorders”. Po završetku fakulteta, obavila je pripravnički staž i položila stručni ispit za farmaceute.

Od februara 2006. godine zaposlena je kao stručni saradnik u Agenciji za lekove i medicinska sredstva Srbije. Doktorske studije, modul Farmaceutska hemija, upisala je školske 2006/2007. godine na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. U periodu 2006-2010. bila je zaposlena kao stručni saradnik u Hemijskoj laboratoriji Nacionalne kontrolne laboratorije gde je učestvovala i u laboratorijskim aktivnostima vezanim za članstvo u OMCL mreži i u razvoju monografija Evropske farmakopeje. Od marta 2010. je na poslovima procene dokumentacije o kvalitetu leka u Farmaceutskom sektoru u okviru Centra za humane lekove. Doktorsku disertaciju pod nazivom „**Razvoj hromatografskih metoda za određivanje sadržaja, stepena čistoće i retencionh karakteristika ziprasidona primenom eksperimentalnog dizajna**“ uradila je pod mentorstvom prof. dr Danice Agbabe i docent dr Katarine Nikolić. Autor je i koautor 3 rada štampanih u časopisima od međunarodnog značaja od kojih 2 rada čine deo doktorske teze, 3 saopštenja sa naučnih skupova sa rezultatima iz doktorske disertacije i 4 usmena saopštenja od kojih je 1 sa rezultatima iz disertacije.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Марија Чарапић

број индекса 59/06

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Развој хроматографских метода за одређивање садржаја, степена чистоће и

ретенционих карактеристика зипрасидона применом експерименталног дизајна“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 10.06.2015.

Марија Чарапић

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Марија Чарапић

Број индекса 59/06

Студијски програм фармацеутска хемија

Наслов рада „Развој хроматографских метода за одређивање садржаја, степена
чистоће и ретенционих карактеристика зипрасидона применом експерименталног
дизајна“

Ментор др сц. Даница Агбаба, редовни професор и др сц. Катарина Николић
доцент

Потписани/а Марија Чарапић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 10.06.2015.

Марија Чарапић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Развој хроматографских метода за одређивање садржаја, степена чистоће и ретенционих карактеристика зипрасидона применом експерименталног дизајна“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
- ☒ 3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 10.06.2015.

Марија Чаршић