

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FARMACEUTSKI FAKULTET

Ana D. Stajić

**RETENCIONO I JONIZACIONO PONAŠANJE  
ODABRANIH GLIKOPEPTIDNIH  
ANTIBIOTIKA ZA NJIHOVU ANALITIČKU I  
BIOANALITIČKU STUDIJU UHPLC-MS/MS  
METODOM SA HEMOMETRIJSKIM  
PRISTUPOM**

doktorska disertacija

Beograd, 2023

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF PHARMACY

Ana D. Stajić

**RETENTION AND IONIZATION BEHAVIOR OF SELECTED  
GLYCOPEPTIDE ANTIBIOTICS FOR THEIR ANALYTICAL  
AND BIOANALYTICAL STUDY USING AN UHPLC-MS/MS  
METHOD WITH A CHEMOMETRICAL APPROACH**

Doctoral Dissertation

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FARMACEUTSKI FAKULTET

**Mentor**

---

Dr sc. Mira Zečević, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

**Članovi komisije**

---

Dr sc. Anđelija Malenović, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

Dr sc. Biljana Otašević, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

Dr sc. Ana Protić, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

Dr sc. med. Dejan Pilčević, docent  
Klinika za nefrologiju, Vojnomedicinska akademija u Beogradu,  
Univerzitet odbrane u Beogradu – Medicinski fakultet

Datum odbrane Beograd,

## **Rezime**

Vankomicin i teikoplanin pripadaju grupi glikopeptidnih antibiotika koji se danas široko primenjuju u terapiji teških infekcija izazvanih multirezistentnim gram-pozitivnim bakterijama.

Teikoplanin predstavlja smešu šest komponenata i to: teikoplanin A3-1, teikoplanin A2-1, teikoplanin A2-2, teikoplanin A2-3, teikoplanin A2-4 i teikoplanin A2-5

Cilj ove doktorske disertacije jeste sveobuhvatna studija retencionog i jonizacionog ponašanja vankomicina i svih šest oblika teikoplanina u sistemu UPLC sa tandemskom masenom spektrometrijom kako bi proces njihove analitike i bioanalitike bio unapređen.

Prvi deo istraživanja podrazumevao je opisivanje retencionog ponašanja pomenutih antibiotika u UPLC sistemu i jonizacionog ponašanja u masenom spektrometru. Zatim je postavljena UPLC-MS/MS metoda u skladu sa AQbD konceptom, a u cilju praćenja šest oblika teikoplanina (teikoplanin A3-1, teikoplanin A2-1, teikoplanin A2-2, teikoplanin A2-3, teikoplanin A2-4 i teikoplanin A2-5), njegove farmakopejske nečistoće, kao i vankomicina u odgovarajućim farmaceutskim oblicima. Data metoda primenjena je u analizi odgovarajućih farmaceutskih oblika, kao i za sistematičnu procenu i praćenje stabilnosti teikoplanina i vankomicina.

Drugi deo doktorske disertacije posvećen je postavljanju nove UHPLC-MS/MS metode za analizu vankomicina i šest oblika teikoplanina u uzorcima humane plazme. AQbD koncept je implementiran kroz nekoliko tačno definisanih faza, u okviru kojih je, u cilju preciznog odabira hromatografskog optimuma, primenjen hemometrijski pristup.

Implementacija AQbD pristupa omogućila je razvoj brze metode željenih karakteristika i kvaliteta čime je analitika pomenutih antibiotika znatno pouzdanija i preciznija, a istovremeno znanje iz oblasti masene spektrometrije dosta unapređeno.

**Ključne reči:** teikoplanin, vankomicin, hemometrija, masena spektrometrija, AQbD, razvoj metode, priprema uzorka

**Naučna oblast:** Analitika lekova

**Uža naučna oblast:** Analitika lekova

## **Abstract**

Vancomycin and teicoplanin belong to the glycopeptide antibiotics group that are widely used today in the treatment of severe infections caused by multiresistant gram-positive bacteria.

Teicoplanin is a mixture of six components: teicoplanin A3-1, teicoplanin A2-1, teicoplanin A2-2, teicoplanin A2-3, teicoplanin A2-4 and teicoplanin A2-5

The goal of this doctoral dissertation is a comprehensive study of the retention and ionization behavior of vancomycin and all six forms of teicoplanin in the UHPLC system with tandem mass spectrometry with the aim to improve the process of their analysis and bioanalysis.

The first part of the research involved describing the retention behavior of the mentioned antibiotics in the UHPLC system and the ionization behavior in the mass spectrometer. After that UHPLC-MS/MS method was set up in accordance with the AQbD concept, and in order to monitor six forms of teicoplanin (teicoplanin A3-1, teicoplanin A2-1, teicoplanin A2-2, teicoplanin A2-3, teicoplanin A2-4 and teicoplanin A2- 5), its pharmacopoeial impurity, as well as vancomycin in appropriate pharmaceutical forms. The given method was applied in the analysis of appropriate pharmaceutical forms, as well as for the systematic assessment and stability monitoring of teicoplanin and vancomycin.

The second part of the doctoral dissertation is dedicated to setting up a new UHPLC-MS/MS method for the analysis of vancomycin and six forms of teicoplanin in human plasma samples. The AQbD concept was implemented through several precisely defined phases, within which, in order to precisely select the chromatographic optimum, a chemometric approach was applied.

The implementation of the AQbD approach enabled the development of a fast method of the desired characteristics and quality, which makes the analysis of the mentioned antibiotics significantly reliable and precise, and at the same time the knowledge in the field of mass spectrometry has been greatly improved.

**Key words:** teicoplanin, vancomycin, chemometrics, mass spectrometry, AQbD, method development, sample preparation

**Scientific field:** Drug Analysis

**Scientific subfield:** Drug Analysis

## Sadržaj:

1. UVOD .....	1
1.1. Metode jonizacije i LC/MS prelazi ( <i>interface</i> ) .....	6
1.1.1 Metode jonizacije .....	7
1.1.2 Pregled prelaza ( <i>interface</i> ) .....	9
1.2. Maseni analizator.....	12
1.2.1 Kvadrupolni maseni analizator.....	12
1.2.2 Tandem masena spektrometrija.....	13
1.3. Uticaj parametara masenog spektrometra na efikasnost jonizacije u LC/MS sistemima.....	15
1.3.1. Optimizacija MS parametara.....	15
1.4. Hromatografski uslovi .....	18
1.4.1. Uticaj sastava mobilne faze na efikasnost jonizacije u LC/MS sistemu .....	18
1.5. Priprema uzorka.....	21
1.6. Pregled literature.....	23
1.7. <i>Analytical Quality by Design</i> pristup u razvoju leka i analitičkih metoda za kontrolu kavaliteta lekova.....	27
1.7.1. Definisanje željenih osobina hromatografske metode i definisanje kritičnih atributa kvaliteta.....	28
1.7.2. Definisanje kritičnih parametara hromatografskog procesa i procena rizika kvaliteta.....	28
1.7.3. Definisanje prostora znanja i primena eksperimentalnog dizajna.....	29
1.7.4. Definisanje prostora dizajna.....	29
1.7.5. Definisanje radnih uslova i procena robusnosti metode.....	30
2. CILJ RADA.....	31
3. EKSPERIMENTALNI DEO .....	32
3.1. Aparati, laboratorijski pribor, reagensi i matematičko-softverski sistemi.....	32
3.2. Optimizacija hromatografskog razdvajanja izomera teikoplanina, njegove nečistoće A i vankomicina u UHPLC-MS/MS sistemu – farmaceutski oblik.....	35
3.2.1 Optimizacija uslova tandem masenog spektrometra.....	35
3.2.2. Optimizacija hromatografskih uslova .....	38
3.3 Validacija UHPLC-MS/MS metode.....	40

3.4. Ispitivanje stabilnosti vankomicina i teikoplanina u uslovima forsirane degradacije...	42
3.4.1 Studije forsirane degradacije .....	42
3.5. Optimizacija hromatografskog razdvajanja izomera teikoplanina i vankomicina u UPLC-MS/MS sistemu – u uzorcima humane plazme .....	42
3.5.1 Optimizacija uslova tandem masenog spektrometra .....	42
3.5.2 Optimizacija hromatografskih uslova .....	44
3.5.3 Optimizacija metode pripreme uzorka .....	45
3.2.4. Validacija UHPLC-MS/MS metode .....	47
3.2.5. Primena UHPLC-MS/MS metode za određivanje koncentracije vankomicina i teikolanina u uzorcima humane plazme .....	49
4. REZULTATI I DISKUSIJA .....	50
4.1. Optimizacija hromatografskog razdvajanja izomera teikoplanina, njegove nečistoće A i vankomicina u UHPLC-MS/MS sistemu – farmaceutski oblik.....	50
4.1.1 Optimizacija parametara masenog spektrometra .....	51
4.1.2. Optimizacija hromatografskih uslova .....	57
4.1.3 Validacija UHPLC-MS/MS metode.....	63
4.1.4. Studije forsirane degradacije .....	65
4.2. Optimizacija hromatografskog razdvajanje izomera teikoplanina i vankomicina u UHPLC-MS/MS sistemu – u uzorcima humane plazme .....	66
4.2.1. Optimizacija parametara masenog spektrometra .....	66
4.2.2. Optimizacija hromatografskih uslova .....	67
4.3. Razvoj metode pripreme uzoraka plazme .....	72
4.4. Validacija UHPLC-MS/MS metode.....	76
4.5. Primena validirane UHPLC-MS/MS metode na uzorcima humane plazme.....	81
5. ZAKLJUČAK .....	84
6. LITERATURA.....	87
7. PRILOZI.....	92

## 1. UVOD

Vankomicin i teikoplanin pripadaju grupi glikopeptidnih antibiotika koji pokazuju baktericidnu aktivnost prema gram-pozitivnim multirezistentnim aerobnim i anaerobnim bakterijama. Svoje farmakološko delovanje ostvaruju nekovalentnim vezivanjem za prekursor sinteze ćelijskog zida čime inhibiraju sintezu peptidoglikana što dalje uslovljava nestabilnost i liziranje bakterijske ćelije. Danas se široko primenjuju u terapiji teških infekcija izazvanih multirezistentnim gram-pozitivnim bakterijama. Ozbiljni neželjeni efekti koji se javljaju u toku primene ovih antibiotika su ototoksičnost i nefrotoksičnost [1-3].

### *Teikoplanin*

Teikoplanin predstavlja smešu šest komponenata i to: teikoplanin A3-1, teikoplanin A2-1, teikoplanin A2-2, teikoplanin A2-3, teikoplanin A2-4 i teikoplanin A2-5. Sve komponente teikoplanina su glikopeptidni analozi sa istim glikopeptidnim jezgrom koje čine linearni heptapeptidni aglikon,  $\alpha$ -D-manozni šećer i acetil- $\beta$ -D-glukozamin. Komponenta A3-1 po svojoj strukturi predstavlja zapravo samo gore navedeno glikopeptidno jezgro, dok ostalih pet komponenata dodatno sadrži N-acil- $\beta$ -D glukozamin, a razlikuju se po dužini acil-alifatičnog lanca. Ako uporedimo komponente teikoplanina, može se primetiti da se razlikuju po prirodi alkilnog lanca, a samim tim i po polarnosti. Komponenta A3-1 predstavlja najpolarniju komponentu dok kod preostalih pet komponenata polarnost opada polazeći od komponente A2-1 do komponente A2-5 koja je najlipofilnija. Teikoplanin A2-2/A2-3 i teikoplanin A2-4/A2-5 predstavljaju izomerne parove [3-4].

### *Vankomicin*

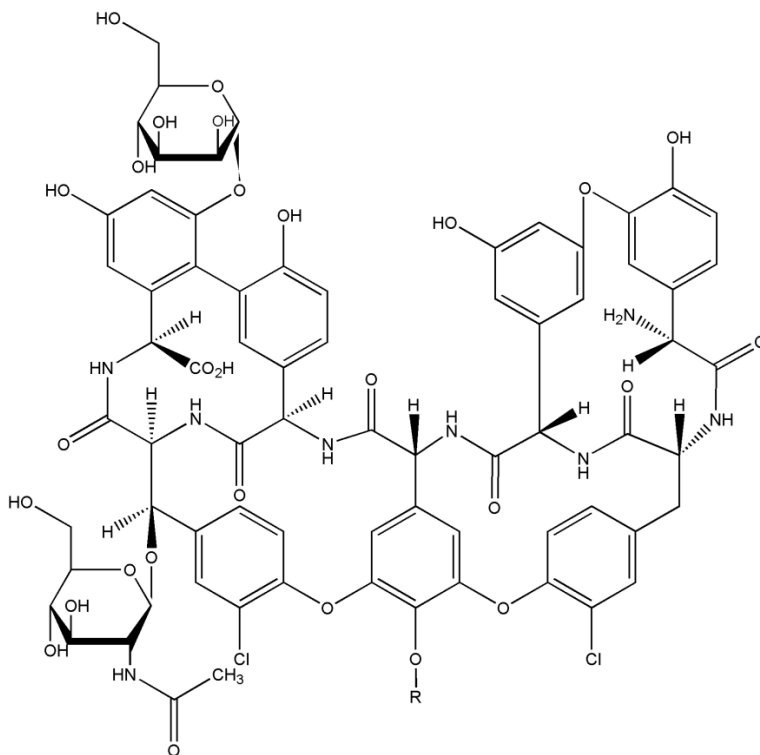
Vankomicin je takođe složene polipeptidne strukture i predstavlja lanac od sedam peptida koji formiraju triciklični sistem za koji je vezan disahird. Disaharid čine glukoza i vankozamin. U svojoj strukturi sadrži proteinogene (Tyr, Leu, Asn, Ala, and Glu) i neproteinogene ostatke aminokiselina (4-hidroksifenilglicin, 3,5-dihidroksifenilglicin i  $\beta$ -hidroksitirozin). Pet aminokiselina je aromatične strukture dok su dve aminokiseline alifatične strukture. Za antimikrobnu aktivnost vankomicina veliku ulogu ima N-terminalna aminokiseline leucin [3-4].

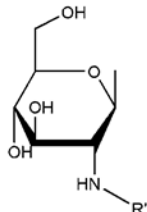
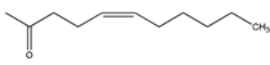
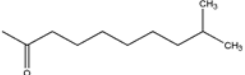
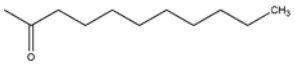
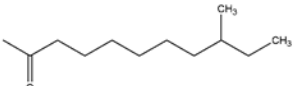
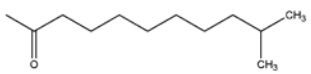
Navedena jedinjenja nastaju fermentacijom odgovarajućih bakterijskih sojeva. Uzimajući u obzir da su proizvodi fermentacije, mala promena fermentacionih uslova može dovesti do odstupanja u njihovom ukupnom sadržaju ili sadržaju nekih od komponenata teikoplanina. Svaka mala promena u sadržaju dovodi do promene u njihovoj kinetici i sledstveno do promene u terapijskoj efikasnosti.



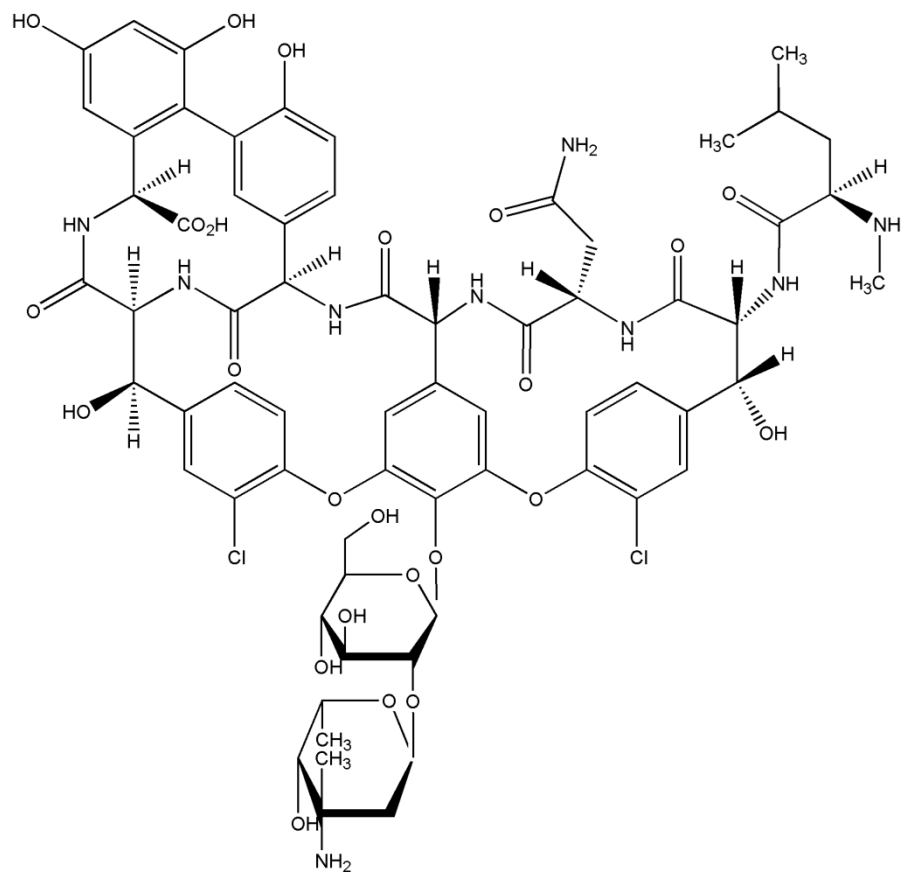
Zbog složene polipeptidne strukture, od velikog je značaja ispitivanje njihovog jonizacionog i retencionog ponašanja u UHPLC-MS/MS (*eng. Ultra High Pressure Liquid Chromatography – Mass Spectrometry/Mass Spectrometry*) sistemu.

U nastavku su date strukturne formule svih šest oblika teikoplanina (slika 1) i vankomicina (slika 2).



Teicoplanin	R	R'
A 2-1		
A 2-2		
A 2-3		
A 2-4		
A 2-5		
A 3-1	H	

**Slika 1.** Strukturna formula teikoplanina



**Slika 2.** Strukturna formula vankomicina

## Masena spektrometrija

Počeci razvoja masene spektrometrije (eng. *Mass Spectrometry, MS*) vezuju se za kraj 19. veka, kada je nemački naučnik *W. Wien* (dobitnik Nobelove nagrade 1911. godine) pokazao da pod dejstvom magnetnog polja dolazi do savijanja snopa naelektrisanih čestica. Značajnu ulogu u razvoju masene spektrometrije imaju i istraživači *Thomson, Aston* i *Dempster* koju su konstruisali prve instrumente i svojim eksperimentima ukazali na široke mogućnosti primene ove metode. „Siguran sam da postoje brojni problemi u hemiji koji bi mogli biti rešeni mnogo jednostavnije primenom ove metode u odnosu na postojeće metode. Metoda je iznenađujuće osetljiva – mnogo više nego što to zahtevaju spektralne analize. Zahteva zanemarljivo malu količinu uzorka koji ne treba da bude specijalno prečišćen.....“, napisao je *Thomson* 1903. godine u jednom od svojih prvih radova o električnom pražnjenju u izolovanim cevima. Na mogućnost korišćenja masene spektrometrije u hemijskoj analizi ukazali su *Hoover* i *Washburn* 1940. godine, koji su utvrdili da se u masenim spektrima prostih organskih jedinjenja uočavaju suštinske razlike koje mogu biti korišćene za analizu višekomponentnih smeša [5].

Masena spektrometrija je fizičko-hemijska metoda koja se zasniva na prevođenju ispitivanog uzorka u jonski snop i razdvajanju tog snopa na sastavne komponente na osnovu njihovog odnosa mase i naelektrisanja ( $m/z$ ). Grafik zavisnosti količine jona od  $m/z$  vrednosti naziva se maseni spektar i predstavlja karakteristiku analiziranog uzorka [5].

Ova metoda, kao što je već navedeno, razdvaja smešu jona na osnovu njihovog  $m/z$  odnosa, obezbeđujući podatke o molekulskoj masi jedinjenja. Brzim razvojem MS poslednjih decenija znatno je proširena njena uloga u strukturnoj karakterizaciji malih molekula u procesu razvoja novih lekova [5].

U kombinaciji sa hromatografskim tehnikama, posebno sa tečnom hromatografijom visokih performansi (eng. *High Performance Liquid Chromatography, HPLC*), masena spektrometrija je postala glavna metoda za analizu smeša u farmaceutskim istraživanjima i razvoju [6].

Početak istraživanja često uključuje analizu velikog broja jedinjenja iz biblioteke jedinjenja korišćenjem LC/MS (eng. *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*) metode.

Identifikacija i kvantifikacija aktivnih farmaceutskih supstanci i njihovih metabolita je esencijalan korak za određivanje metabolizma i kinetike lekova. Strukturna karakterizacija nečistoća i degradacionih proizvoda lekova je sastavni deo razvoja farmaceutskih proizvoda.

LC/MS kombinuje mogućnost separacije HPLC metode sa mogućnostima detekcije i karakterizacije MS metode, imajući na taj način veoma bitnu ulogu u svim aspektima procesa razvoja leka [6].

## 1.1. Metode jonizacije i LC/MS prelazi (*interface*)

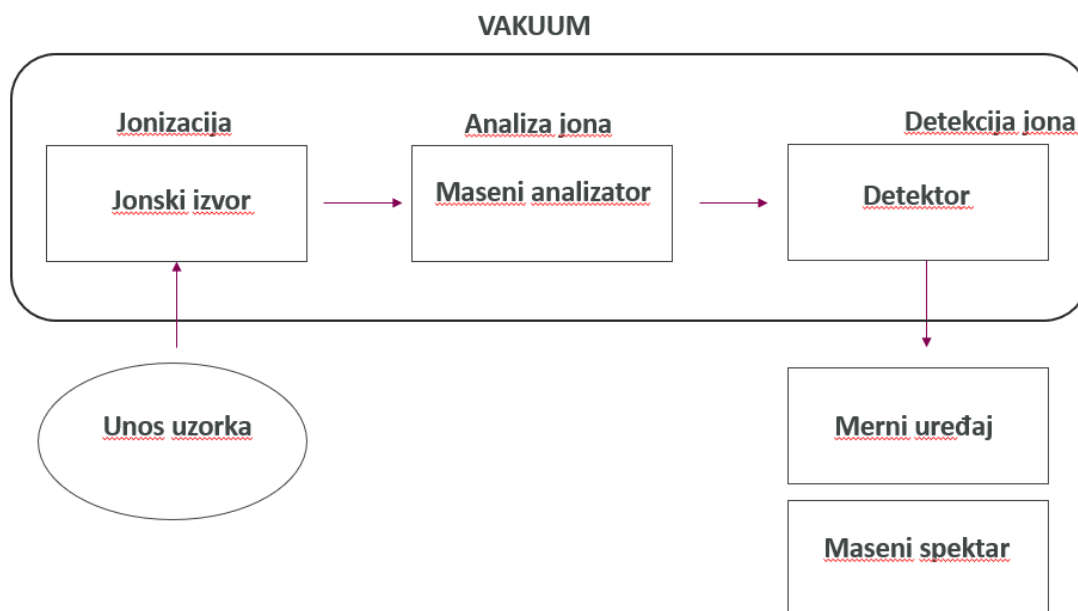
Primena različitih fizičkih principa za razdvajanje i određivanje jona različitih  $m/z$  vrednosti u uslovima visokog vakuuma uslovala je nastanak brojnih masenih spektrometara [7].

Generalno, svi maseni spektrometri u procesu generisanja masenog spektra uključuju četiri koraka:

1. Unošenje uzorka
2. Jonizacija molekula uzorka tj. prevođenje neutralnih molekula u jone u gasovitom stanju
3. Razdvajanja jona u gasovitom stanju na osnovu njihovih  $m/z$  vrednosti
4. Detekcija razdvojenih jona

Ključni delovi masenog spektrometra su jonski izvor i maseni analizator (slika 3). Pored ovih elemenata, treba uzeti u obzir i uređaje za dobijanje vakuuma kojim se obezbeđuju pogodni uslovi za nesmetano funkcionisanje svih komponenata.

U zavisnosti od tipa uzorka i željene primene mogu se koristiti različiti maseni spektrometri za izvođenje analiza. Kada je reč o tipu uzorka, uzorak može biti različitog agregatnog stanja (čvrsto, tečno ili gasovito), različite pH vrednosti (kiselina/baza) kao i različit biološki materijal (plazma, serum, urin...).



**Slika 3.** Šematski prikaz masenog spektrometra

### 1.1.1 Metode jonizacije

Idealna metoda jonizacije treba da obezbedi visoku efikasnost procesa jonizacije i visoku stabilnost jona za sledstvenu analizu u masenom analizatoru.

Razvijene su brojne metode jonizacije, i to: elektronska jonizacija (*eng. Electron Ionization, EI*), hemijska jonizacija (*Chemical Ionization, CI*), desorpciona jonizacija (*Desorption Ionization, DI*), matriksom potpomognuta laserska desorpcija/jonizacija (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI*), desorpciona elektrosprej jonizacija (*Desorption Electrospray Ionization, DESI*), elektrospej jonizacija (*Electrospray Ionization, ESI*) i hemijska jonizacija pod atmosferskim pritiskom (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI*).

U tabeli 1 prikazane su osnovne karakteristike nekih od metoda jonizacije. Za LC/MS metodu od posebnog značaja su elektrospej jonizacija i hemijska jonizacija pod atmosferskim pritiskom.

**Tabela 1.** Sažetak nekih osnovnih karakteristika metoda jonizacije

Metoda jonizacije	Agens jonizacije	Prednosti	Ograničenja
EI	Elektroni (70 eV)	Obimna fragmentacija, reproducibilnost spektra, mogućnost pretraživanja biblioteke EI spektara velikog broja referentnih jedinjenja	Ograničena na nepolarna i isparljiva jedinjenja
CI	Joni reagentnog gasa	Najveća zastupljenost molekulskog jona, dobro kontrolisana fragmentacija.	Ograničena na nepolarna i delimično polarna jedinjenja. Ograničena fragmentacije
APCI	<i>Corona</i> pražnjenje/ joni reagentnog gasa	Operativna pri atmosferskom pritisku, jednostavan prelaz i velika zastupljenost molekulskog jona	Ograničena na nepolarna i umereno polarna jedinjenja
DI	Čestice visoke energije (atomi, joni, fotoni)	Velika zastupljenost molekulskog jona molekula velikih molekulskih masa	Otežano povezivanje sa HPLC sistemom
ESI	Električna/termalna/pneumatska energija	Operativna pri atmosferskom pritisku, jednostavan prelaz sa HPLC sistemom, višestruko naelektrisani joni za brojne biomolekule	Oskudni rezultati za nepolarne molekule, ograničena fragmentacija

EI i CI su prve razvijene metode jonizacije. Izuzetno su korisne za jonizaciju isparljivih jedinjenja. U procesu elektronske jonizacije, molekuli jonizuju usled sudara sa elektronima

visoke energije (oko 70 eV) nastali zagrevanjem katode od volframove niti, dajući visoko reproducibilni maseni spektar sa izraženom fragmentacijom molekulskog jona. Zbog viška unutrašnje energije molekulskih jona koja nastaje kao posledica sudara sa elektronima, dolazi do znatne fragmentacije molekulskog jona, pa je njegova zastupljenost u masenom spektru mala ili ga skoro i nema. Sa druge strane, CI spada u meke (eng. *soft*) metode jonizacije gde molekulski jon nastaje jonsko-molekulskim reakcijama između jona reagentnog gasa i molekula uzorka [8,9]. Najčešće korišćeni reagentni gasovi su metan, amonijak i izobutan. Izborom odgovarajućeg reagentnog gasa, moguće je kontrolisati stepen fragmentacije. U reakcijama transfera protona u CI-MS, relativni afinitet analita i reagentnog gasa prema protonu direktno određuje da li će doći do jonizacije analita. Analit sa većim afinitetom prema protonu u odnosu na reagentni gas biće jonizovan, dok u slučaju nižeg afiniteta u odnosu na reagentni gas, neće doći do jonizacije. Takođe, razlika analita i reagentnog gasa po afinitetu prema protonu dalje određuje obim fragmentacije ako do jonizacije analita dođe.

Ograničenje EI i CI metode predstavlja uslov da analizirani uzorak mora biti isparljiv, pa su praktično neprimenljive za polarna jedinjenja. Jedan od načina za prevazilaženje ovog ograničenja je primena DI metode za jonizaciju neisparljivih molekula uzorka velike molekulske mase [5].

### *1.1.2 Pregled prelaza (interface)*

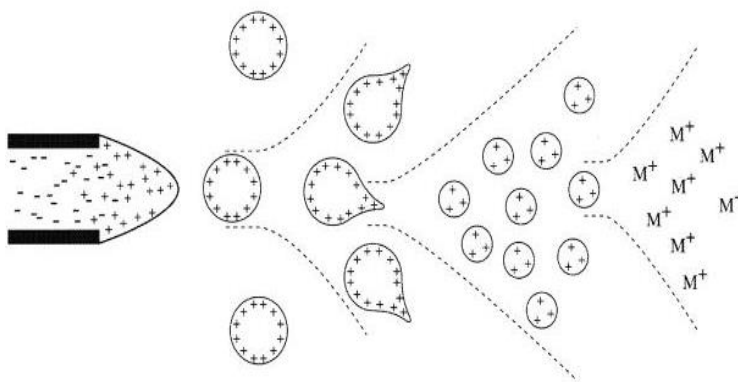
Važna komponenta LC/MS sistema je interface koji povezuje HPLC sistem sa masenim spektrometrom. Osnovni zahtevi za uspešno povezivanje jeste održavanje hromatografskih performansi (minimalno dodatno proširenje pika), visoka efikasnost transfera od LC-a do MS-a i bez ikakvih promena performansi masenog spektrometra. Istorijski posmatrano, glavni izazov za LC/MS inetrface je visok protok mobilne faze kroz HPLC sistem koji otežava održavanje visokog vakuuma koji je potreban za normalno funkcionisanje masenog spektrometra. Godinama su razvijani različiti LC/MS prelazi kako bi se ovaj problem i poteškoće koje se javljaju prevazišle [7].

#### *1.1.2.1 Elektrosprej jonizacija*

ESI se prvi put pominje u radu koji je objavljen 1917. godine i gde se opisuje način na koji primena visokog potencijala uslovljava razbijanje rastvarača na mikropaljice [9,10]. U osnovi, elektrosprej aparatura se sastoji iz sprej-igle koja je pod visokim električnim potencijalom (4-5 kV), termalne/pneumatske desolvatacione komore i vakuum interface-a



(slika 4). Proces elektrosprej jonizacije podrazumeva generisanje naelektrisanih mikrokapljica pod uticajem jakog električnog polja i sledstveno uparavanje kapljica korišćenjem sušućeg gasa ( $N_2$ ) ili povišene temperature.



**Slika 4.** Šematski prikaz ESI izvora

Prvi korak pri generisanju jona je formiranje kapljica tečnosti na vrhu igle. Zapravo pod uticajem jakog električnog polja joni iste polarnosti formiraju tzv. Tejlorovu kupu (eng. *Taylor cone*) na površini rastvora uslovljavajući emisiju naelektrisanih kapljica. Sledeći korak je uklanjanje rastvarača, što predstavlja poprilično sporan proces. Jedno od objašnjenja je posredstvom *Dole/Fenn*-ove kulonove eksplozije (eng. *Dole/Fenn's coulombic explosion*). Inicijalno formirane kapljice tečnosti usled isparavanja rastvarača postaju sve manje, pri čemu dolazi do povećanja gustine naelektrisanja na površini kapljica. Usled delovanja kulonove sile dolazi do povećanja površinskog napona što dovodi do razbijanja kapljica na još manje kapljice. Procesom daljeg uparavanja i fragmentacije nastaju joni analita.

Inicijalno formiranje kapljica što manje veličine favorizuje i olakšava proces njihove desolvatacije i jonizaciju analita. Iz tog razloga treba izbegavati mobilne faze visokog površinskog napona i visoke viskoznosti. U tom smislu, čista voda je apsolutno nepoželjna mobilna faza [10].

Takođe, primena višeg napona u elektrosprej igli uslovljava nastanak manjih kapljica, ali često može dovesti do visokonaponskog pražnjenja, pa je nastanak kapljica onemogućen. Iz tog razloga ovaj parametar treba optimizovati za svaku mobilnu fazu pre analize [10].

Koncentracija pufera ima direktan uticaj na veličinu kapljica. Njegova veća koncentracija dovodi do održavanja pH vrednosti mobilne faze čime se sprečavaju elektrohemijski procesi na vrhu elektrospej igle (koji mogu nastati usled pada pH vrednosti) a što daje manje kapljice i veću efikasnost jonizacije. Sa druge strane, visoka koncentracija pufera ( $>10^{-3}$  M) narušava linearnu zavisnost između intenziteta signala i koncentracije analita usled mogućnosti formiranja adukta analita sa puferom [10,11].

Na veličinu i distribuciju veličine kapljica (nisu sve kapljice iste veličine), pa samim tim i na njihovo naelektrisanje ima izuzetno važan uticaj brzina protoka mobilne faze i dijametar kapilare. Elektrosprej jonizacija je najefikasnija pri brzini protoka mobilne faze od 5 do 10  $\mu\text{L min}^{-1}$ , a sa smanjenjem dijametra elektrosprej igle dobijaju se manje kapljice sa uskom distribucijom njihove veličine, pa je prenos uzorka znatno efikasniji [10].

Jedna od najvažnijih karakteristika ESI metode je formiranje višestruko naelektrisanih jona peptida i proteina [9,12,13]. Maseni spektrometar meri  $m/z$  vrednost jona, pa u slučaju višestruko naelektrisanih jona, u masenom spektru se na određenoj  $m/z$  vrednosti pojavljuje frakcija molekulske mase koja zavisi od broja jonizujućih mesta. Ova karakteristika ESI omogućava detekciju i precizno određivanje velikih molekulskih masa, kao što je to slučaj sa proteinima/peptidima, korišćenjem standardnog kvadrupolnog masenog analizatora. Druga jako bitna karakteristika ESI metode je da pripada grupi tzv. mekih (eng. *soft*) metoda jonizacije. Zapravo, ESI je jedan veoma blag proces u kome uglavnom nastaje molekularni jon, sa neznatnom fragmentacijom. U slučaju malih molekula, u masenom spektru dominiraju jednostruko naelektrisani joni. Treća karakteristika ESI je jednostavnost izgleda izvora i mogućnost funkcionisanja pod atmosferskim pritiskom što omogućava povezivanje sa HPLC sistemom. Treba napomenuti da je, u cilju održavanja stabilnosti procesa raspršivanja potreban nizak protok mobilne faze (oko 200  $\mu\text{L min}^{-1}$ ). Iz tog razloga se u slučaju ESI/LC/MS koriste *splitter*-i protoka. Naravno, njihova upotreba se ne odražava na osetljivost određivanja koncentracije jer je merenje odgovor u direktnoj korelaciji sa koncentracijom analita koji je unet u izvor. Međutim, održavanjem iste koncentracione osetljivosti, osetljivost na masu može biti znatno povećana korišćenjem nižeg protoka. Ovo je uslovalo široku upotrebu nano-spreja ( $\text{nL min}^{-1}$ ) u LC/MS sistemima za analizu proteina i peptida postižući osetljivost reda veličine femtomola [10,13,14].

## 1.2. Maseni analizator

Osnovna funkcija masenog analizatora je merenje  $m/z$  vrednosti jona i razdvajanje jona na osnovu njihove  $m/z$  vrednosti. Princip funkcionisanja masenog analizatora zavisi od interakcija naelektrisanih čestica sa magnetnim ili električnim poljem. Najčešće korišćeni maseni analizatori su maseni analizator sa magnetnim sektorom, kvadrupolni maseni analizator, jon-trap maseni analizator i maseni analizator na bazi vremena preletanja (eng. *Time of Flight*, TOF). Kombinacijom različitih masenih analizatora dobijaju se još dodatne mogućnosti pri izvođenju eksperimenata u tandem masenoj spektrometriji (MS/MS) za strukturnu karakterizaciju jedinjenja [15].

### 1.2.1 Kvadrupolni maseni analizator

Kvadrupolni analizator sastoji se iz četiri paralelne elektrode (slika 5) kojima se saopštava osnovni potencijal. Osnovni potencijal jednak je zbiru jednosmernog potencijala i radiofrekventnog potencijala [16].

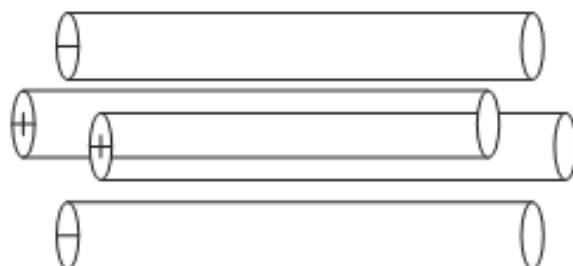
Osnovni potencijal dve susedne elektrode je istog intenziteta, a suprotnog predznaka. Prilikom prolaska kroz analizator, joni se filtriraju na osnovu  $m/z$  vrednosti tako da samo joni koji imaju stabilnu putanju bivaju propušteni, dok se ostali razelektrišu u sudaru sa elektrodama.  $m/z$  vrednost jona koji će proći kroz analizator zavisi od vrednosti osnovnog potencijala, odnosno vrednosti saopštenog jednosmernog i radiofrekventnog potencijala. Radiofrekventni potencijal odbija ili prenosi jone na osnovu njihove  $m/z$  vrednosti, fokusirajući ih naizmenično i u različitim ravnima. Istovremeno se menja i električno polje pa kao krajnji rezultat nastaje trodimenzionalni talas kretanja jona.

Odabirom odgovarajuće radiofrekvence i potencijala, analizator propušta do detektora jone veće  $m/z$  vrednosti, dok joni manje  $m/z$  vrednosti bivaju privučeni prema elektrodama.

Na kretanje jona veliki uticaj ima i jednosmerni napon. Uticaj je veći na jone veće molekulske mase jer se oni sporije refokusiraju pod dejstvom radiofrekventnog polja nego joni manje molekulske mase. Zato se lakši joni usmeravaju dalje od centra kvadrupola i pri kraju analizatora bivaju privučeni prema elektrodama. Promenom naizmeničnog i jednosmernog napona, pri čemu je njihov odnos konstantan, dolazi do preraspodele jona čime se dalje postiže snimanje spektra [16].

Kvadrupolni maseni analizator spada u analizatore niske rezolucije, odnosno analizatore niske moći razdvajanja, pa se ne mogu koristiti za razdvajanje jona približnih masa. U odnosu na magnetne analizatore, pored niže rezolucije, imaju i uži opseg masa molekula koje mogu da

analiziraju. Međutim, pogodni su za primenu zbog njihove niske cene, brzog snimanja spektra i zbog primene niskog potencijala. Njihova najčešća primena je kao koliziorna ćelija za kolizionu aktivaciju jona i jonsko-molekulske reakcije. Takođe, mogu biti povezani sa drugim masenim analizatorima. Jedna od popularnih konfiguracija je trostruki kvadrupol koji se široko primenjuje u LC/MS i LC/MS/MS sistemima [16,17].



**Slika 5.** Šematski prikaz kvadrupolnog masenog analizatora

### 1.2.2 Tandem masena spektrometrija

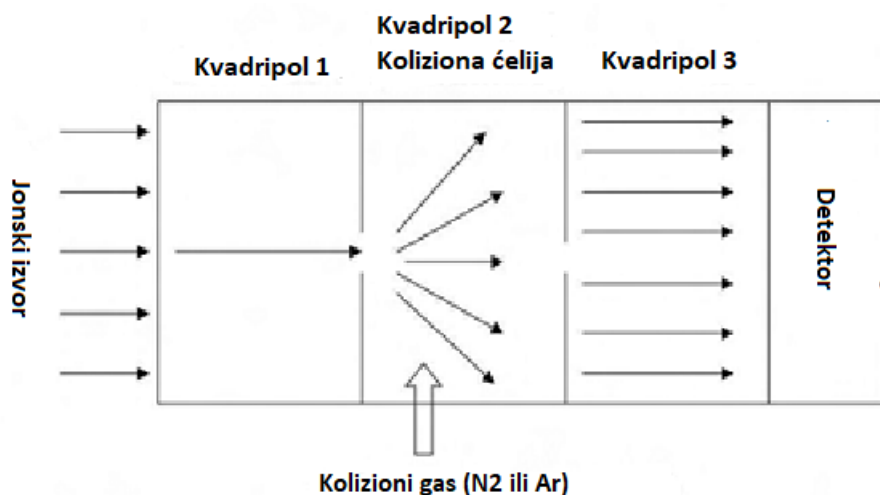
Maseno masena spektrometrija (eng. *Mass Spectrometry/Mass Spektrometry*, MS/MS) ili tandem masena spektrometrija predstavlja kombinaciju tri masena analizatora u okviru istog masenog spektrometra i omogućava ispitivanje individualnih jona iz smeše jona [18]. Ispitivani joni (određene  $m/z$  vrednosti) čija selekcija se vrši prolaskom kroz prvi maseni analizator i njihovom kolizijom u toku boravka u drugom masenom analizatoru koji ima ulogu kolizione ćelije, nastaju fragmentni joni koji se razdvajaju prolaskom kroz treći maseni analizator. Fragmentni joni daju informacije o strukturi molekula i imaju ulogu u strukturnoj karakterizaciji kompleksnih molekula.

U tipičnim MS/MS eksperimentima, dva masena analizatora se koriste u cilju određivanja *parent* i *product* jona. Uloga prvog masenog analizatora je da iz smeše jona izdvoji ispitivani jon (*parent ion* – molekulski jon). Izdvojeni jon podleže fragmentaciji u kolizionoj ćeliji koja može biti uslovljena uvođenjem kolizionog gasa u maseni spektrometar (eng. *Collision-Induced-Dissociation*, CID), usled kolizije sa određenom površinom (eng. *Surface-Induced-Dissociation*, SID) ili fotodisocijacijom. Najčešće korišćena metoda disocijacije je CID, zbog jednostavnosti primene. Relativno veliki prostor za procese efikasne ekscitacije/disocijacije u

CID znatno doprinosi širokoj upotrebi CID-a u MS/MS eksperimentima. Najčešće korišćeni kolizioni gasovi su argon i azot [17].

MS/MS eksperimenti mogu biti izvedeni korišćenjem različitih instrumenata kod kojih se gore opisani procesi dešavaju u istom prostoru, ali su vremenski razdvojeni (eng. *tandem-in-space*) ili se dešavaju istovremeno (eng. *tandem-in-time*). Instrumenti *tandem-in-space* su trostruki kvadrupol (QQQ) i kvadrupol-TOF.

U slučaju trostrukog kvadrupola, tri skenirajuća *mode*-a mogu biti izvedena [16,17,19]. Na slici 6 dat je šematski prikaz trostrukog kvadrupola u *product ion scan mode*-u. Prvi kvadrupol (Q1) je postavljen da propušta jon određene *m/z* vrednosti (*parent* jon). Drugi kvadrupol ima ulogu koliziona ćelije gde dolazi do kolizije propuštenih jona sa kolizionim gasom (azot ili argon). U trećem kvadrupolu razvrstavaju se *product* joni nastali u kolizionoj ćeliji. Trostruki kvadrupol se uobičajno koristi i za kvalitativna i za kvantitativna ispitivanja [17,19].



**Slika 6.** Šematski prikaz funkcionisanja trostrukog kvadrupola

Prednost MS/MS tehnike ogleda se u znatnom poboljšanju specifičnosti i signal/šum odnosa. Posebno je korisna u diferencijaciji izomera, određivanju sekvence proteina i analizi kompleksnih smeša. MS/MS se najčešće primenjuje u kombinaciji sa HPLC metodom.

### 1.3. Uticaj parametara masenog spektrometra na efikasnost jonizacije u LC/MS sistemima

Jonizacija jedinjenja podrazumeva prevođenje neutralnog molekula datog jedinjenja u naelektrisanu česticu, odnosno jon. Jonizacija direktno utiče na osetljivost masenog spektrometra u LC/MS sistemu. Nekoliko parametara instrumenta ima izuzetno važnu ulogu pri jonizaciji jedinjenja, i oni su (kao i njihovi nazivi) specifični za proizvođača instrumenta [15,16].

#### 1.3.1. Optimizacija MS parametara

Tečni uzorak uvodi se u HPLC sistem preko *auto-sampler*-a. Nakon razdvajanja na koloni, uzorak se prenosi do UV detektora i masenog spektrometra. Na intenzitet jonskog signala utiču brojni faktori.

#### *Mode jonizacije*

Pri podešavanju parametara u cilju postizanja što efikasnije jonizacije potrebno je najpre odabrati *mode* jonizacije; pozitivan ili negativan. Izbor *mode*-a jonizacije zavisi od strukture ispitivanog jedinjenja. Za bazna jedinjenja (npr. amini), za dobijanje protonovanih ili katjonskih oblika molekula koristi se pozitivan *mode* jonizacije. Izborom negativnog *mode*-a jonizacije za kisela jedinjenja dobijaju se njihovi deprotonovani oblici. Za jedinjenja kao što su npr. kvaternarne amonijum soli, potrebno je izvesti eksperimente u jednom i drugom *mode*-u kako bi se dobile što preciznije informacije o strukturi analita. Uobičajno je da se naizmenično izvode eksperimenti u pozitivnom i negativnom *mode*-u za inicijalno određivanje nepoznatih jedinjenja. Savremeni instrumenti pružaju mogućnost veoma brzog prelaska sa jednog na drugi *mode*. Jedino ograničenje ovog postupka jeste smanjenje vremena analize u *mode*-u specifičnom za jedinjenje koje možda jonizuje samo u tom *mode*-u.

Optimalan sastav mobilne faze za jedan i drugi *mode* se razlikuju (kasnije će biti objašnjen uticaj sastava mobilne faze na efikasnost jonizacije) [20].

Nakon izvršenog izbora *mode*-a jonizacije, potrebno je odabrati odgovarajuću metodu jonizacije; i to ESI ili APCI. Izbor metode jonizacije takođe zavisi od strukture ispitivanog jedinjenja. ESI predstavlja metodu izbora za polarna jedinjenja, dok je APCI pogodnija sa slabo i umereno polarne molekule. Za detekciju nepoznatih jedinjenja preporučuje se naizmenično izvođenje ESI i APCI, pa najpogodniju metodu treba odabrati na osnovu intenziteta signala. Na performanse ESI i APCI metode veliki uticaj, takođe, imaju hromatografski uslovi [20].

### *Napon jonizacije*

Veoma bitan MS parametar je napon kapilare (eng. *capillary voltage*). U LC/ESI-MS sistemima, primenom napona kapilare od 4-5 kV nastaje jako električno polje. Primena višeg napona u elektrosprej kapilari uslovljava nastanak manjih kapljica, ali često može dovesti do visokonaponskog pražnjenja, pa je nastanak kapljica onemogućen. Iz tog razloga ovaj parametar treba optimizovati za svaku mobilnu fazu [21,22].

### *Napon konusa*

Napon konusa (eng. *cone voltage*) je treći parametar koji može biti korišćen za postizanje fragmentacije u izvoru i samim tim u strukturnoj determinaciji molekula. Primenjuje se u konusu (eng. *cone sampling*) čime se postiže izvlačenje jona iz dela jonskog izvora koji je pod atmosferskim pritiskom i njihovo usmeravanje u deo masenog spektrometra koji je pod vakuumom. Sa povećanjem napona konusa, povećava se brzina kretanja jona kroz ovaj region, podležući koliziji u kontaktu sa parama rastvarača i desolvacionim gasom koji uslovljava njihovu fragmentaciju. Iako fragmentacija jona uslovljena promenom napona konusa nije selektivna (nije izabran *parent* jon određene mase), može biti efikasna za generisanje nekih fragmentnih jona koji iako mogu usloviti kompleksniji maseni spektar, mogu dati i veoma korisne informacije o strukturi analiziranog jedinjenja. Njegova vrednost može biti prilagođena za detekciju molekulskog jona jedinjenja (niske vrednosti napona) ili za dobijanje fragmentnih jona (više vrednosti napona) [21,22].

### *Protok desolvacionog gasa i temperatura*

Protok desolvacionog gasa (eng. *desolvation gas flow*) i temperatura spadaju u ključne parametre koji utiču na efikasnost jonizacije jedinjenja.

U LC/ESI-MS sistemu raspršujući gas (eng. *nebulizing gas*, N<sub>2</sub>) prolazi kroz ESI probu protokom od 70 do 90 L hr<sup>-1</sup> omogućavajući formiranje aerosola iz rastvora uzorka. Temperatura izvora je, u zavisnosti od protoka i sastava mobilne faze, obično postavljena između 100°C i 150°C. Zagrejani desolvacioni gas (N<sub>2</sub>) uvodi se kroz jonski izvor i pomaže u isparavanju i uklanjanju rastvarača. Veći protok desolvacionog gasa je često potreban kada je protok mobilne faze veći. Na primer, pri protoku mobilne faze od 50 µL min<sup>-1</sup>, odgovarajući protok desolvacionog gasa je 400 L hr<sup>-1</sup>. Temperatura desolvacije varira od 100 °C za protoke mobilne faze manje od 10 µL min<sup>-1</sup> do 400 °C za protoke veće od 50 µL min<sup>-1</sup> [21-23].

### *Uticaj brzine protoka mobilne faze*

Brzina protoka mobilne faze u LC/MS sistemu ima veliki uticaj na separaciju, kao i na efikasnost jonizacije u masenom spektrometru. U zavisnosti od izbora kolone mogu biti primenjene različite vrednosti protoka.

U LC/ESI-MS sistemu, ESI-MS je kompatibilan sa LC kapilarnim kolonama i konvencionalnim analitičkim kolonama. ESI metoda, kao što je već napomenuto, može da zahteva smanjenje protoka ( $0,5 - 1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ) korišćenjem odgovarajućih *splitter-a*. Jedna od jedinstvenih karakteristika ESI je koncentraciona zavisnost, odnosno dobijeni odgovor (intenzitet signala) je u direktnoj korelaciji sa molarnom koncentracijom analita u uzorku, a ne sa ukupnom količinom analita koja je uneta u izvor. U tom smislu, smanjenje protoka ne utiče na intenzitet dobijenog odgovora. Naprotiv, primenom optimalnog protoka u ESI izvor moguće je povećati osetljivost masenog spektrometra. Optimalan protok za postizanje stabilnog raspršivanja u ESI izvoru je  $200 \mu\text{L min}^{-1}$ .

Takođe, smanjenjem protoka povećava se period između čišćenja jonskog izvora jer u jonski izvor dolazi manja količina tečnosti. Uobičajan pristup je *post-column* razdvajanje postavljanjem *splitter-a*.

Kao što je već napomenuto, temperatura i protok gasova u jonskom izvoru moraju biti optimizovani prema brzini protoka mobilne faze u cilju postizanja što efikasnije jonizacije [21-23].



## 1.4. Hromatografski uslovi

U nastavku uvoda ove doktorske disertacije biće opisani hromatografski parametri koji imaju uticaj na efikasnost jonizacije u LC/MS sistemu, a koji su dalje tokom disertacije korišćeni za detaljnu analizu u cilju razvoja brzih, osetljivih i efikasnih LC-MS/MS metoda za analitiku i bioanalitiku odabranih glikopeptidnih antibiotika, vankomicina i teikoplanina [20-23].

### 1.4.1. Uticaj sastava mobilne faze na efikasnost jonizacije u LC/MS sistemu

#### *Izbor rastvarača*

Uobičajno korišćeni rastvarači u RP-HPLC sistemu su acetonitril, voda i metanol, koji su ujedno i idealni rastvarači u LC/MS sistemima. U cilju održavanja stabilnosti jonskog signala potrebno je degazirati sve rastvarače pre LC/MS analize. U slučaju korišćenja mobilne faze sa većim udelom vode, potrebno je povećati temperaturu izvora i probe kako bi se olakšala desolvacija u jonskom izvoru [16].

#### *Izbor dodataka mobilne faze*

Dodaci mobilne faze koriste se u cilju podešavanja pH vrednosti i postizanja efikasne i pouzdane separacije u HPLC sistemu. U slučaju kiselih jedinjenja smanjenje pH vrednosti dovodi do povećanja retencionog vremena, dok povećanje pH vrednosti dovodi do smanjenja retencionog vremena. Kada je reč o baznim jedinjenjima, smanjenje pH vrednosti dovodi do smanjenja retencionog vremena dok povećanje pH vrednosti dovodi do povećanja retencionog vremena. Korišćeni dodaci moraju biti kompatibilni sa ESI uslovima funkcionisanja. Ukoliko je potrebno smanjiti pH vrednost kako bi se postigla što bolja separacija, za LC/MS sistem najpogodnije su sirćetna i mravlja kiselina u koncentraciji od 0,1% do 1,0%. Treba imati na umu da dodatak kiselina suprimira jonizaciju u negativnom *mode*-u. Slabo kisela jedinjenja neće formirati deprotonovane oblike u kiselim uslovima. Ako je potrebno povećati pH vrednost mobilne faze u cilju poboljšanja LC separacije, amonijum-hidroksid (u koncentraciji od 0,1 do 1,0%) je najpogodniji [20].

Soli imaju veliku primenu u hromatografiji jer imaju uticaj na retenciono ponašanje, oblik pika. Upotreba neisparljivih soli kao što su fosfati je nepoželjna jer lako krisališu u jonskom izvoru i uslovljavaju njegovu blokadu, kao i supresiju procesa jonizacije.

Neki od nepoželjnih dodataka u mobilnoj fazi za LC/MS sistem su surfaktanti/deterdženti i neorganske kiseline (sumporna ili fosforna kiselina). Surfaktanti/deterdženti teže da suprimiraju jonizaciju jedinjenja, dok neorganske kiseline mogu usloviti koroziju metalnih delova jonskog izvora.

Međutim, dešava se da, i kada se koriste dozvoljeni aditivi u mobilnoj fazi za LC/MS sistem, nastanu neočekivani protonovani i deprotonovani oblici molekula usled uzorkovanja jako baznih ili jako kiselih rastvora ispitivanih jedinjenja. Za rastvore mobilne faze približno neutralne pH vrednosti i niske jonske jačine, jonizujući protoni nastaju elektrolitičkim putem. U slučaju jako baznih rastvora koji sadrže amonijak, transfer protona sa amonijum jona može usloviti nastanak protonovanih oblika molekula. U rastvorima mobilne faze visoke jonske jačine i neutralne ili visoke pH vrednosti dolazi do jonizacije indukovane pražnjenjem (eng. *discharge induced ionization*) koja je odgovorna za generisanje protonovanih oblika molekula koji mogu usloviti supresiju jonskog signala [20].

#### *Formiranje adukta*

Dodaci mobilne faze, kao i nečistoće u rastvorima uzorka, mogu doprineti kompleksnosti masenog spektra. Uobičajna je pojava nekovalentnih kompleksnih jona kao što su protonovani dimerni joni  $[2M+H^+]$ . Pored njih, neretko se mogu javiti i kompleksi katjona ( $[M+NH_4^+]$ ,  $[M+Na^+]$ ,  $[M+K^+]$ ), adukti rastvarača ( $[M + H_2O + H^+]$ ,  $[M + CH_3OH + H^+]$ ,  $[M + CH_3CN + H^+]$ ,  $[M + Cl^-]$ ,  $[M + CH_3COO^-]$ ) i multimerni joni ( $[3M + H^+]$ ,  $[2M + Na^+]$ ). Formiranje aduktnih jona obezbeđuje dodatne informacije pri određivanju molekulske mase nepoznatih jedinjenja. Međutim, višak jona alkalnih metala u mobilnoj fazi može da suprimira jonizaciju jedinjenja, pa je često potrebno da budu uklonjeni pre analize. U nekim situacijama potrebno je u uzorak dodati katjone u tragovima kako bi se, ukoliko do protonovanja ne dolazi, obezbedilo formiranje kompleksa katjona sa analiziranim jedinjenjem [20].

#### *Uticaj koncentracije analita*

Kao što je već prethodno objašnjeno, odgovor dobijen primenom ESI metode jonizacije pokazuje koncentracionu zavisnost. Maksimalna koncentracija analita do koje je moguće uspostaviti linearnu zavisnost sa odgovorom (intenzitet signala) je  $10^{-5}$  M. Ukoliko koncentracija analita pređe ovu granicu, dolazi do pada intenziteta odgovora. Intenzitet ESI odgovora proporcionalan je površini naelektrisanih kapljica koja je raspoloživa za formiranje jona. Pri koncentraciji od  $10^{-5}$  M površine kapljica tečnosti su u potpunosti zasićene, pa dalje povećanje koncentracije ne povećava površinu naelektrisanih kapljica iz koje se generišu joni. U slučaju niskih koncentracija, limiti detekcije zavise od osetljivosti LC/MS sistema,

uključujući efikasnost transfera jona i njihove detekcije, kao i uklanjanje hemijskog šuma iz sistema [20-22].

*SIM* (eng. *Selecting Ion Monitoring*) i *MRM* (eng. *Multiple Reaction Monitoring*) pristupi u snimanju masenog spektra

Postoje dva pristupa za poboljšanje osetljivosti LC/MS sistema; a to su *SIM* i *MRM*. *SIM* pristup podrazumeva ograničavanje masenog analizatora da kontinuirano prati određeni jon ( $m/z$  vrednost reprezentativnog jona ispitivanog molekula), što značajno poboljšava odnos signal/šum. U *SIM mode*-u osetljivost instrumenta se povećava 100 do 1000 puta jer se povećava vreme praćenja jona, što ima veliki značaj pri detekciji i kvantifikaciji veoma niskih koncentracija jedinjenja.

*MRM* predstavlja visoko specifičnu i osetljivu tehniku koja se koristi za selektivnu kvantifikaciju jedinjenja iz kompleksne smeše. *MRM mode* se najčešće izvodi u trostrukom kvadrupolnom analizatoru. Uloga prvog kvadrupola ( $Q_1$ ) je da propusti jon određene  $m/z$  vrednosti (*parent* jon). Drugi kvadrupol ima ulogu kolizione ćelije gde dolazi do fragmentacije *parent* jona usled njegove kolizije sa neutralnim gasom. Treći kvadrupol propušta samo određene *product* jone nastale fragmentacijom *parent* jona. *MRM* ima široku primenu u analizi kompleksnih smeša [21-23].

### *Gradijentno eluiranje*

Tradicionalno, izokrasko eluiranje mobilne faze je reproduktivnije u odnosu na gradijentno eluiranje. Isti sastav mobilne faze obezbeđuje konstantne uslove na koloni i konstantnu brzinu kretanja komponenata kroz kolonu; analit-eluent i analit-stacionarna faza interakcije su takođe konstantne tokom trajanja analize. Ove činjenice čine izokrasko eluiranje predvidljivijim od gradijentnog, iako ima znatno manju separacionu moć. Gradijentno eluiranje se primenjuje za analizu kompleksnih multikomponentnih smeša koje se sreću u LC/MS analizama jer je razdvajanje i kvantifikacija komponenata neefikasna primenom izokraskih uslova. U cilju postizanja što bolje selektivnosti za komponente smeše i optimalnog vremena trajanja analize u toku razvoja metode treba uzeti u obzir nagib gradijenta, kao veoma važnu varijablu. Optimizacijom nagiba gradijenta postiže se željena selektivnost. U slučaju da analiza predugo traje, kako bi se zadržala postignuta selektivnost, nagib gradijenta treba držati konstantnim, a promenom (povećanjem) protoka mobilne faze optimizovati vreme trajanja analize. Međutim, povećanje protoka mobilne faze je ograničeno zbog ograničenih vrednosti pritiska HPLC sistema.

Nakon izbora *mode*-a gradijenta, treba izvršiti izbor tipa gradijenta; linearni ili *multistep* gradijent. Generalno je preporučljivo upotreba prostog linearnog gradijenta zbog bolje reproducibilnosti, manjeg stresiranja kolone i bolje rezolucije. Prisustvo izokratskih koraka u gradijentu uslovljava širenje pika, što se odražava na rezoluciju sistema. Prilikom primene gradijentnog eluiranja potrebno je kondicionirati kolonu početnim uslovima gradijenta [20].

#### *Stacionarna faza*

Izbor stacionarne faze (kolone) zavisi od karakteristika ispitivanog jedinjenja i cilja analize. Najšire korišćene kolone sadrže hemijski modifikovanu silika stacionarnu fazu. Hemijskom modifikacijom utiče se na polarnost kolone. Dosta često se koriste kolone sa vezanom C18 alkil grupom za površinu silike.

Naravno, moguće su još brojne modifikacije u cilju postizanja što bolje separacije. Kolona mora biti stabilna pri pH vrednosti i opsegu temperature primenjene u razvoju metode. Dobro poznavanje hemijske stabilnosti stacionarne faze je iz tog razloga od velike važnosti [20].

### **1.5. Priprema uzorka**

Uzorak za analizu u LC/MS sistemu može biti različitog porekla, i često zahteva posebnu pripremu pre analize. Postupak pripreme uzorka predstavlja kritičan korak za kvantitativnu i kvalitativnu analizu, odnosno može imati veliki uticaj na specifičnost, osetljivost, tačnost i preciznost bioanalitičke procedure.

Priprema uzoraka iz različitih izvora obuhvata njihovu ekstrakciju, prečišćavanje i koncentrisanje pre LC/MS analize u cilju postizanja dobre selektivnosti metode. To podrazumeva uklanjanje ili smanjenje uticaja interferirajućih supstanci matriksa, odnosno uklanjanje proteina, soli i lipida iz biološkog materijala. Metoda tečno-tečne ekstrakcije (eng. *Liquid Liquid Extraction*, LLE), čvrsto-tečne ekstrakcije (eng. *Solid Phase Extraction*, SPE) i precipitacije proteina (eng. *Protein Precipitation*, PP) su najčešće korišćene metode [24].

Za pripremu uzorka u doktorskoj disertaciji korišćena je metoda precipitacije proteina, pa je u nastavku i opisana.

#### *Precipitacija proteina*

Metoda precipitacije proteina podrazumeva uklanjanje proteina iz uzorka njihovom denaturacijom korišćenjem odgovarajućeg precipitirajućeg agensa. Kao precipitirajući agensi najčešće se koriste metanol ili acetonitril.

### *Efekat matriksa*

Efekat matriksa predstavlja modifikaciju odgovora analita, odnosno modifikaciju visine/površine hromatografskog pika uslovljene endogenim supstancama matriksa (proteini, fosfolipidi i soli) i egzogenim supstancama koje mogu biti unete u uzorak usled njegove pripreme. Interferirajuće supstance iz matriksa generalno predstavljaju problem svih analitičkih tehnika. U slučaju LC/MS metoda, efekat matriksa najčešće se odražava kroz supresiju jonskog signala analita uslovljen isparljivim komponentama matriksa koje mogu uticati na proces raspršivanja (samim tim i na veličinu nastalih kapljica) i evaporaciju rastvarača iz uzorka, a onda i na količinu jona analita koji stižu do detektora [25]. Različiti potencijal ovog fenomena odražava se generalno na detekciju jona, kao i na selektivnost, ponovljivost, tačnost, linearnost i limit kvantifikacije postavljene metode. Takođe, usled uticaja matriksa na izgled masenog spektra teško je dobiti pouzdanu biblioteku spektara.

Jonska supresija odražava se na kvantifikaciju i identifikaciju analita. Različita jedinjenja mogu usloviti jonsku supresiju. To mogu biti endogene supstance, već prisutne kao komponente uzorka ili prisutne nakon ekstrakcije. Jonska supresija može dovesti do lažno negativnih rezultata jer smanjuje intenzitet jonizacija analita, ali i do lažno pozitivnih u slučaju da interni standard podleže intenzivnijoj supresiji od ispitivanog analita. Dodatak internog standarda se široko primenjuje. Kako bi se postigla željena eliminacija efekta matriksa potrebno je da interni standard bude slične hemijske strukture i retencionog ponašanja kao ispitivano jedinjenje. Očekivano je da je uticaj ko-eluirajućih komponenta matriksa na analit i interni standard komparabilan.

Procena efekta matriksa i metode za njegovo prevazilaženje treba da budu uključene u proces validacije metode [26]. Efekat matriksa je uobičajna pojava i regulatorni organi u okviru dela za validaciju bioanalitičkih metoda zahtevaju njegovu procenu i eliminaciju, ne navodeći, bar za sad, za to eksperimentalnu proceduru [27].

Stepen jonske supresije varira ne samo od uzorka do uzorka, već i od jedinjenja do jedinjenja i zavisi od postupka pripreme uzorka [28], kao i od koncentracije analita odnosno odnosa matriksa i koncentracije analita [29]. Izborom pogodnijih hromatografskih uslova i postupka prečišćavanja uzorka ovaj efekat treba minimizirati.

Molekulska masa i naelektrisanje analita utiču na proces jonizacije. Generalno, joni veće mase pokazuju potencijal da suprimiraju signal manjih jona [25]. Polarnija jedinjenja su podložnija jonskoj supresiji, dok organski rastvarači generalno pojačavaju intenzitet jonizacije u elektrosprej izvoru, naročito u pozitivnom jon-modu [29,30].

## 1.6. Pregled literature

Detaljnim pregledom literature utvrđeno je da ne postoji ni jedan rad koji opisuje analizu teikoplanina i vankomicina u humanoj plazmi i farmaceutskom doziranom obliku primenom UHPLC-MS/MS metode koja je razvijena u skladu sa naučno zasnovanim AQBd pristupom. U nastavku je dat pregled objavljenih radova koji opisuju analizu ispitivanih antibiotika primenom drugih metoda.

Precizna, visoko selektivna i efikasna HPLC metoda razvijena je za određivanje teikoplanina u injektibilne farmaceutske oblike, opisuju *Passoni MH* i saradnici [31]. Analiza je sprovedena na Waters C<sub>18</sub> (250 × 4,6 mm, 5 μm veličina čestice) koloni, sa mobilnom fazom koja sadrži acetonitril i metanol (50:50, v/v). Primenjen je izokratski režim eluiranja sa protokom mobilne faze od 1,0 mL min<sup>-1</sup>. Talasna dužina detekcije bila je 279 nm. Navedena metoda uspešno je validirana.

*Chapelle G* i saradnici opisuju određivanje glavne komponente teikoplanina u humanoj plazmi primenom HPLC metode [32]. Ova metoda je osetljiva i specifična pri čemu je primenjena metoda čvrsto-tečne ekstrakcije za pripremu uzoraka plazme, dok je detekcija vršena na 240 nm talasne dužine. Linearnost metode je ispitana korišćenjem uzoraka u kojima je koncentracije teikoplanina u plazmi bilau opsegu 5-40 mg mL<sup>-1</sup>. Koeficijent varijacije kojim je procenjena *intra-day* i *inter-day* preciznost nije bio veći od 5,4%. Zapremina uzorka potrebnog za ispitivanje bila je 250 μL, što je bilo dovoljno za praćenje koncentracije teikoplanina u plazmi.

*Mochizuki N* i saradnici opisali su analizu komponenata teikoplanina HPLC metodom sa elektrohemijском detekcijom u uzorcima plazme ili cerebrospinalne tečnosti [33]. Linearnost metode za određivanje teikoplanina ispitana je u opsegu koncentracija 0,025-10 μg mL<sup>-1</sup>. Koeficijenti korelacije bili su veći od 0,999 za obe vrste uzoraka. Limit detekcije glavne komponente teikoplanina bio je 1 ng mL<sup>-1</sup> (odnos signal/šum > 3). Vrednost relativne standardne devijacije, RSD, koja je izračunata u okviru ispitivanja *intra-day* preciznosti bila je 5,9%. dok je u slučaju *inter-day* preciznosti bila od 2,6% do 6,8%.

*Kim KY* i saradnici opisali su LC/MS/MS metodu za određivanje koncentracije teikoplanina u uzorcima humane plazme [34]. Uzorci plazme pacijenata razblaženi su vodenim rastvorom pufera pre injektovanja u LC/MS/MS sistem. Hromatografsko razdvajanje sprovedeno je na Cadenza HS-C18 koloni primenom gradijentnog eluiranja sa mobilnom fazom koju čini smeša acetonitril/voda (sa dodatkom mravlje kiseline u koncentraciji od 0,1%). Protok mobilne faze bio je 0,5 mL min<sup>-1</sup>. Ispitivani analiti su analizirani u MRM režimu primenom elektrosprej jonizacije u pozitivnom *mode-u*. Koncentracija teikoplanina određena je kao zbir koncentracija šest komponenata (A3-1, A2-1, A2-2, A2-3, A2-4, i A2-5). Linearnost metode je ispitana u osegu koncentracija 1-50 mg mL<sup>-1</sup> što obuhvata terapijske koncentracije

teikoplanina u plazmi. Vrednosti RSD za procenu *intra*- i *inter-day* preciznosti bile su manje od 15%. Validirana metoda je primenjena za praćenje koncentracije teikoplanina u kliničkoj praksi.

Razvoj UPLC-MS/MS metode za određivanje teikoplanina u serumu pacijenata opisali su *Fung FH* i saradnici [35]. Kao interni standard primenjen je ristocetin. Jonska supresija, linearnost, stabilnost, efekat matriksa, *recovery*, preciznost, LOQ i LOD uspešno su ispitani. Vreme eluiranja teikoplanina bilo je 1,39 min, dok je vreme eluiranja internog standarda bilo 1,24 min. Linearnost metode je ispitana u opsegu koncentracija rastvora teikoplanina 0-200 ng mL<sup>-1</sup>. Postekstrakciona stabilnost postignuta je do 20h, minimalan efekat matriksa sa prinosom ekstrakcije > 93%. Vrednost limita kvantifikacije, LOQ, bio je 1 µg mL<sup>-1</sup>, dok je vrednost limita detekcije, LOD, bio 0,2 µg mL<sup>-1</sup>. Ova metoda predstavlja dodatnu opciju za određivanje teikoplanina u serumu pacijenata.

*Begou O* i saradnici prikazali su razvoj i validaciju UPLC-MS/MS metode sa ciljem da se primeni za kvantifikaciju koncentracija teikoplanina u plazmi kod novorođenčadi [36]. Farmakokinetički podaci o teikoplaninu u neonatalnoj populaciji su veoma ograničeni, pa je osetljiva i pouzdana metoda za određivanje svih izoformi teikoplanina primenjena u maloj zapremini uzorka. Glavne komponente teikoplanina su ekstrahovane jednostavnom metodom precipitacije acetonitrilom i analizirane na C18 hromatografskoj koloni pomoću trostrukog kvadrupolnog masenog spektrometra. Metoda obezbeđuje pouzdane podatke u opsegu koncentracija od 25-6400 ng mL<sup>-1</sup> sa vrednostima LOD od 8,5 ng mL<sup>-1</sup> i LOQ 25 ng mL<sup>-1</sup> za ukupni teikoplanin. Metoda je primenjena u uzorcima plazme novorođenčadi da podrži farmakokinetičke podatke i korišćena je za određivanje nivoa koncentracije teikoplanina u plazmi odojčadi tokom terapije u Jedinici intenzivne nege.

*Tsai IL* i saradnici opisali su studiju koja je razvila brzu, jednostavnu i osetljivu UPLC-MS/MS metodu za istovremeno određivanje koncentracija vankomicina, teikoplanina, daptomicina i kolistina u ljudskoj plazmi [37]. Proces pripreme uzorka uključuje jednostavan korak denaturacije proteina korišćenjem acetonitrila, nakon čega sledi 11-struko razblaživanje sa 0.1% mravlje kiseline. Osam ciljnih pikova za četiri leka može se analizirati u roku od 3 minuta korišćenjem Kinetek™ 2,6 mm C18 kolone. Optimizovani su parametri masene spektrometrije, pri čemu su praćene po dve tranzicije svakog leka u MRM režimu, što je obezbedilo visoku osetljivost i specifičnost. UPLC-MS/MS metoda je validirana u opsezima kliničkih koncentracija leka u plazmi. RSD vrednosti određene za *inter*- i *intra-day* preciznosti bile su 12,7% odnosno 14,7%. Tačnost određena pri niskim, srednjim i visokim koncentracijama analita u uzorku bila je između 89,3% i 110,7%. Standardne kalibracione krive za analite su bile linearne i imale su koeficijente korelacije veće od 0,997. Limiti detekcije za sve analite imale su vrednosti ispod 70 ng mL<sup>-1</sup>. Primena ove metode za analizu uzoraka plazme pacijenata potvrdila je njenu efikasnost za terapijsko praćenje ova četiri leka, što je preduslov za poboljšanje terapijske efikasnosti i bezbednosti ovih antibiotika.

*Jesús Valle MJ* i saradnici razvili su i validirali brzu i jednostavnu HPLC metoda sa UV detekcijom za kvantifikaciju vankomicina u uzorcima veštačke perfuzione tečnosti i plućnog tkiva [38]. Hromatografsko razdvajanje izvedeno je Nucleosil 120 C18 5  $\mu\text{m}$  (dužina 15 cm; unutrašnji prečnik 0,4 cm) korišćenjem smeše 0,05 M  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  (pH 4,0) - acetonitril (92:8, v/v) kao mobilne faze pri protoku od 1  $\text{mL min}^{-1}$ , sa UV detekcijom na 220 nm. Metoda korišćena za kvantifikaciju vankomicina pokazala je linearnost za opsege koncentracija od 0,1-2, 2-15 i 15-250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Vrednost LOQ bila je je 0,1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , a koeficijenti varijacije tokom procene *inter-* i *intra-day* preciznosti bili su između 0,6% i 7,0%. Retenciono vreme vankomicina bilo je 8,5 min. Metoda je uspešno korišćena za ispitivanje farmakokinetike vankomicina u izolovanim plućima pacova nakon njegove sistemske i inhalacione primene.

*Shibata N* i saradnicu razvili su LC/MS/MS metodu za određivanje vankomicina u plazmi pacova [39]. Nakon precipitacije 100  $\mu\text{L}$  uzorka plazme sa 300  $\mu\text{L}$  10% trifluorosirćetne kiseline-metanola (2:1, v/v), supernatant je razblažen sa 300  $\mu\text{L}$  destilovane vode. Kalibraciona kriva je imala linearni opseg od 0,01 do 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  sa dužinom trajanja analize od 5 min. Preciznost, tačnost i vrednost LOQ pokazali su da je ova metoda pogodna za određivanje vankomicina u plazmi pacova.

Za analizu vankomicina u humanom serumu razvijena je LC/MS metoda koju su opisali *Zhang T* i saradnici [40]. Kao interni standarda korišćen je atenolol. Vankomicin je ekstrahovan iz seruma upotrebom ekstrakcije čvrsto-tečne ekstrakcije sa mehanizmom zadržavanja analita zasnovanom na katjonskoj izmeni. Utvrđeno je da je metoda linearna u opsegu koncentracija vankomicina 0,05-10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , što je bilo adekvatno za kvantifikaciju vankomicina u uzorcima. Osim toga, određene su I vrednosti LOQ od 0,005  $\mu\text{g mL}^{-1}$  i LOD od 0,001  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Metoda je korišćena za određivanje koncentracije vankomicina kod pacijenata tokom perioperativne infuzije leka, za koju je utvrđeno da dovodi do koncentracije leka unutar potrebnog terapijskog okvira

Za određivanje vankomicina u serumu i urinu opisana je LC/MS/MS metoda od *strane Cass RT* i saradnika [41]. Nakon dodavanja internog standarda (teikoplanina), uzorci seruma i urina su direktno injektovani u HPLC sistem. Uz minimalnu prethodnu obradu uzorka, metoda je jednostavna i brza. Detekcija vankomicina bila je tačna i precizna, sa vrednošću LOD od 1  $\text{ng mL}^{-1}$  u serumu i urinu. Kalibracione krive za vankomicin kod pacova, pasa i primata bile su linearne u opsegu koncentracija od 0,001-10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  za serum i urin. Ova metoda je uspešno primenjena za određivanje koncentracije vankomicina u uzorcima seruma i urina pacova, pasa i primata u farmakokinetičkim studijama.

HPLC metoda razvijena je za određivanje teikoplanina u parenteralnom doziranom obliku. Korišćena je Ksterra RP C18, 250 $\times$ 4,6 mm, kolona sa veličinom čestica od 5  $\mu\text{m}$  i mobilnom fazom koja se sastoji od 0,02 M kalijum-dihidrogen-ortofosfata, 0,02 M dikalijum- hidrogen-ortofosfata i 0,5% rastvora trietil amina u vodi(pH vrednost vodenog dela mobilne faze



podešen je orto-fosfornom kiselinom na 3,2) i acetonom (40:50, v/v). Korišćen je acetonitril u izokratskom režimu. Brzina protoka mobilne faze je bila  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ , a talasna dužina detekcije 210 nm. Retenciono vreme teikoplanina bilo je 4,178 min. Opseg koncentracija kalibracione krive za procenu linearnosti bio je 24,1-289,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Vrednosti LOD i LOQ bile su 1,205  $\mu\text{g mL}^{-1}$  i 3,615  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , tim redosledom Metoda je validirana ispitivanjem tačnosti, preciznosti i podobnosti sistema [42].

Studija koju su predstavili *Marrubinia G* i saradnici opisuje razvoj LC metode za odvajanje teikoplanina i njenih povezanih nečistoća kompatibilnih sa detekcijom MS. Uslovi separacije za teikoplanin su postavljeni na koloni LiChrospher 100 RP-18 pod gradijentim eluiranjem sa mobilnom fazom sastavljenom od rastvora amonijum-formijata 25 mM čija pH vrednost je podešena na 6,00 i acetonitrila. Nova metoda se pokazala ekvivalentnom u smislu selektivnosti u odnosu na metodu koja je objavljena u monografiji teikoplanina iz Evropske farmakopeje, i validirana je prema ICH Q2 R1 smernici [43].

Veliki je broj radova je publikovan u kojima se opisuje implementacija AQbD (eng. *Analytical Quality by Design*) pristupa u razvoju metoda. Kao što je već istaknuto, u ovoj doktorskoj disertaciji, AQbD je prvi put primenjen u analitici i bioanalitici teikoplanina i vankomicina. U nastavku je dat pregled nekoliko radova koja opisuju primenu AQbD pristupa.

Ove studije opisuju sistematski razvoj i validaciju HPLC bioanalitičke metode reverzne faze za nevirapin u plazmi pacova sa primenom QbD-a. Hromatografsko razdvajanje izvedeno na C18 koloni korišćenjem izokratskog eluiranja sa mobilnom fazom koju čini 68:9:23% (v/v) metanola, acetonitrila i vode (pH 3, podešen ortofosfornom kiselinom) pri brzini protoka od  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  i primenu UV detekcije na 230 nm. *Box-Behnken* dizajn je primenjen za optimizaciju hromatografskih uslova uzimajući odnos mobilne faze, pH i brzinu protoka kao kritične parametre metode. Ukratko, studije pokazuju korisnost analitičkog QbD pristupa za racionalan razvoj bioanalitičke metode sa poboljšanim hromatografskim odvajanjem i dobijanjem nevirapina u plazmi pacova, opisali su Beg S i saradnici [44].

Kalariya PD i saradnici primenili su princip QbD u razvoju metode za brzo i selektivno odvajanje dolutegravira i njegovih proizvoda razgradnje. Razvijena metodologija je zasnovana na eksperimentalnom dizajnu za ispitivanje kritičnih parametara hromatografskih sistema. Efikasno hromatografsko razdvajanje je postignuto na Waters Acquity UPLC fenil heksil ( $100 \times 2,1 \text{ mm}$ ,  $1,7 \text{ mm}$ ) koloni sa gradijentnim eluiranjem. Rastvor 10 mM acetatnog pufera (pH 4,0) i methanol čine mobilnu fazu. Program gradijenta je podešen na taj način da je početni udeo metanola 15%, a zatim raste do 65% tokom 5 minuta, a zatim je zadržan nepromenjen tokom narednih 6 minuta pri brzini protoka od  $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ . Metoda je uspešno prenesena na UPLC-QTOF-MS/MS system za potrebe strukturne karakterizacije četrnaest proizvoda razgradnje dolutegravira, [45].

## **1.7. Analytical Quality by Design pristup u razvoju leka i analitičkih metoda za kontrolu kvaliteta lekova**

*Quality by Design* (QbD) predstavlja savremeni, sistematičan i naučno zasnovan pristup sa jasno unapred definisanim ciljevima i odgovarajućom procenom rizika.

Početak XXI veka počela je implementacija QbD pristupa u farmaceutskoj industriji za proizvodne procese jer je Međunarodna konferencija za harmonizaciju (eng. *International Conference on Harmonisation – ICH*) u smernicama Q8 i Q11 definisala QbD; ICH Q8 – za farmaceutski razvoj i Q11 – za razvoj i proizvodnju aktivnih supstanci. Primenu ovog pristupa u razvoju analitičkih procedura opisana je u smernici ICH Q14 [46-47].

Rezultat primene ovog pristupa jeste dobijanje proizvoda željenog profila i kvaliteta. Suština je ugradnja kvaliteta u svakoj fazi proizvodnje leka kroz sistematičnu procenu svih potencijalnih rizika na kvalitet proizvoda i dobro razumevanje svake faze procesa proizvodnje.

Pored primene u procesima proizvodnje, kao neizostavan i primarni korak u obezbeđenju kvaliteta finalnog proizvoda, jeste i primena u razvoju svake analitičke metode. QbD u razvoju analitičkih metoda definisan je kao *Analytical Quality by Design* (AQbD) pristup. Rezultat primene AQbD pristupa je dobijanje analitičke metode željenih performansi, a koje dalje predstavlja osnovu za dobijanje finalnog proizvoda željenog kvaliteta.

Do razvoja AQbD pristupa, primenjivan je empirijski pristup, a koji podrazumeva nasumično izvođenje eksperimenata na osnovu kojih se definišu optimalni uslovi analize finalnog proizvoda. Primena ovako dobijene metode u rutinkoj kontroli kvaliteta leka ispitivana je u fazi validacije. Nedostatak ovog pristupa je što ne daje mogućnost procene rizika na performanse metode.

Uzimajući u obzir sve navedene prednosti AQbD pristupa u odnosu na empirijski pristup, danas je najčešće prvi izbor od strane analitičara u razvoju metode.

Savremena i naučno zasnovana AQbD metodologija u postizanju željenog cilja podrazumeva sledeće korake [46-50]:

- 1) Definisavanje željenih osobina hromatografske metode (eng. *Analytical Target Profile – ATP*) i definisanje kritičnih atributa kvaliteta (eng. *Critical Quality Attributes – CQA*);
- 2) Definisavanje kritičnih parametara hromatografskog procesa (eng. *Critical Process Parameters – CPP*) i procena rizika kvaliteta (eng. *Quality Risk Assessment – QRA*);

- 3) Definisanje prostora znanja (eng. *Knowledge Space* – KS) i primena eksperimentalnog dizajna (eng. *Design of Experiments* – DoE) kao efikasnog pristupa za ispitivanje uticaja definisanih CPP na kritične odgovore sistema;
- 4) Definisanje prostora dizajna (eng. *Design Space* – DS);
- 5) Definisanje radnih uslova i procena robusnosti metode;
- 6) Validacija metode

#### 1.7.1. Definisanje željenih osobina hromatografske metode i definisanje kritičnih atributa kvaliteta

Željeni kvalitet proizvoda predstavlja skup svih karakteristika kvaliteta farmaceutskog proizvoda koje bi se mogle postići u idealnim uslovima uz očuvanje bezbednosti i efikasnosti samog proizvoda [51].

Željeni kvalitet hromatografske metode (ATP) predstavlja kriterijume i zahteve koji se odnose na karakteristike same metode (npr. tačnost, preciznost i opseg) [46], a u cilju postizanja željenog razdvajanja pikova analizirane smeše i što kraćem vremenu trajanja analize.

Uopšteno kritični atributi kvaliteta (eng. *Critical Quality Attributes*, CQA) je karakteristika (fizička, hemijska, biološka ili mikrobiološka) koja treba da bude u okviru odgovarajućeg opsega, a u cilju dobijanja proizvoda željenog kvaliteta [46]. U razvoju hromatografske metode, CQAs su odgovori sistema koji se prate (eng. *output*), odnosno, zavisno promenljive. Njačešće su to faktor rezolucije, faktor selektivnosti i kriterijum koji se zasniva na odnosu visine pika i doline koja spaja susedne pikove (eng. *Peak-to-Valley Ratio*) [52].

#### 1.7.2. Definisanje kritičnih parametara hromatografskog procesa i procena rizika kvaliteta

ICH Q8 (R2) smernica [46] definiše kritične parametre, CPPs (eng. *Critical Process Parameters*) kao parametre čija varijabilnost utiče na CQAs, pa je njihovo praćenje od izuzetnog značaja kako bi se postigao željeni kvalitet proizvoda. Parametri procesa nazivaju se faktori, input-i ili nezavisno promenljive.

Najčešći parametri koji se mogu procenjivati u razvoju LC metode su tip stacionarne faze, tip i udeo organskog rastvarača u mobilnoj fazi, pH vrednost vodene faze, temperatura kolone, vreme trajanja gradijenta (u slučaju metoda gradijentnog eluiranja).

### 1.7.3. Definisiranje prostora znanja i primena eksperimentalnog dizajna

Cilj razvoja metode je utvrđivanje odgovarajuće kombinacije faktora (CPPs) i definisanje opsega (interval) CPPs koja će omogućiti dobijanje željenih CQAs. Takav interval CPPs čini jedan deo ukupnog mogućeg eksperimentalnog prostora koji se naziva *prostor znanja* (KS). QRA pristup, iskustvo istraživača i preliminarni eksperimenti omogućavaju definisanje KS. Posle definisanja KS pristupa se primeni metodologije DoE, čiji je cilj da detaljno opiše variranje CQAs u zavisnosti od variranja definisanih CPPs. DoE metodologija je sistematičan pristup koji podrazumeva izvođenje relativno malog broja dobro isplaniranih eksperimenata u okviru *prostora znanja*, na osnovu kojih se primenom statističkih i matematičkih tehnika detaljno objašnjava zavisnost CQAs od CPPs.

Metodologija DoE omogućava procenu interakcija različitih CPPs kroz eksperimente u kojima je moguće istovremeno menjati više CPPs. Ovo je i glavna prednost DoE metodologije u odnosu na *one factor at the time* ispitivanje koje podrazumeva da jedan CPP bude održavan na konstantnom nivou, a da se drugi CPPs menjaju. Istovremena promena različitih CPPs mnogo realnije opisuje stvarni sistem i može se desiti da je efekat takve promene značajno različit u odnosu na pojedinačne efekte pojedinačnih promena.

### 1.7.4. Definisiranje prostora dizajna

*Prostor dizajna* (eng. *Design Space*, DS) predstavlja multidimenzionalnu kombinaciju i interakciju faktora i procesnih parametara za koju je pokazano da omogućava obezbeđenje kvaliteta [46,53-56]. Suštinski, DS predstavlja region teorijske robusnosti i deo eksperimentalnog prostora u kome će definisani CQAs ostati na željenom nivou kvaliteta bez obzira na promenu faktora. Stoga se uslovi metode više ne definišu kao tačno određene tačke već kao oblast u okviru DS-a. Takođe, postiže se velika fleksibilnost u rutinskoj primeni metode jer se pomeranje u okviru DS-a ne smatra promenom koja zahteva dodatnu potvrdu adekvatnosti metode. Na sličan način, olakšan je i transfer metode između laboratorija jer se svi uslovi unutar DS-a smatraju prihvatljivim. Konačno, glavni razlog definisanja DS-a je mogućnost da se na osnovu njegove veličine tačno proceni koliko često će metoda moći da zadovolji definisane zahteve kvaliteta .

Procena DS-a vrši se u dve faze, odnosno prvo se definiše DS za stacionarnu fazu, a zatim DS za mobilnu fazu, kao i za ostale procesne parametre. DS za mobilnu fazu i ostale parametre procesa definiše se na osnovu uspostavljene matematičke veze između ispitivanih CPPs i CQAs.

Naime, jednačine omogućavaju da se tačno izdvoje regioni eksperimentalnog prostora u kojima će kombinacija CPPs dati zadovoljavajuću vrednost jednog CQA, a zatim se takvi regioni preklapaju kako bi se pronašao deo eksperimentalnog prostora u kome će kombinacija CPPs dati željene odgovore za sve posmatrane CQAs. Ukoliko je broj ispitivanih CPPs relativno mali, grafički prikaz DS-a dobija se preklapanjem površina odgovora za ispitivane CQAs. U slučaju složenijih sistema mogu se koristiti i različite funkcije hromatografskog odgovora [54].

Međutim, rezultati koji se dobijaju ovako jednostavnom analizom ne uzimaju u obzir nesigurnost koja može poticati od nesigurnosti u izračunavanju koeficijenata matematičkog modela, pa se ovakav DS naziva još i pseudo-DS. Kako bi se definisao DS maksimalne pouzdanosti potrebno je nesigurnosti u podešavanju CPPs dodati i nesigurnost u izračunavanju koeficijenata matematičkog modela. Postoje različiti statistički pristupi za postizanje ovakvog DS-a, a jedan od najčešće primenljivanih je *Monte–Karlo* simulacija.

#### 1.7.5. Definisanje radnih uslova i procena robusnosti metode

Kao radna tačka može biti bilo koja tačka u okviru *prostora dizajna* DS. To može biti tačka sa najboljom vrednošću CQA ili neka tačka koja je odgovarajuća sa praktične tačke gledišta. Međutim, veoma je pogodno odabrati one tačke koje će biti najrobusnije, tako da nije preporučljivo birati tačke koje se nalaze na samim ivicama *prostora dizajna* DS. Poželjno je odabrati tačku u kojoj će biti najveća verovatnoća postizanja željenog odgovora.

## 2. CILJ RADA

Cilj ove doktorske disertacije jeste sveobuhvatna studija retencionog i jonizacionog ponašanja vankomicina i teikoplanina, kao odabranih glikopeptidnih antibiotika, s ciljem unapređenja procesa njihove analitike i bioanalitike kroz sledeće faze:

- 1) Hemijska karakterizacija procesa jonizacije odabranih glikopeptidnih antibiotika u masenom spektrometru sa hemometrijskim pristupom
- 2) Razvoj nove, AQbD usaglašene UPLC-MS/MS metode za praćenje teikoplanina, njegove farmakopejske nečistoće i vankomicina u odgovarajućim farmaceutskim oblicima
- 3) Procena stepena degradacije i predviđanje potencijalnih puteva degradacije odabranih glikopeptidnih antibiotika sprovođenjem *studija forsirane degradacije*, a primenom prethodno razvijene i validirane UPLC-MS/MS metode
- 4) Izbor optimalnih hromatografskih uslova za analizu šest oblika teikoplanina i vankomicina u uzorcima humane plazme primenom AQbD pristupa
- 5) Optimizacija pripreme uzoraka plazme i biovalidacija–optimizirane UPLC-MS/MS metode, kao i njena primena za određivanje koncentracije vankomicina i teikoplanina (teikoplanin A3-1, teikoplanin A2-1, teikoplanin A2-2, teikoplanin A2-3, teikoplanin A2-4 i teikoplanin A2-5) u uzorcima plazme pacijenata.

### 3. EKSPERIMENTALNI DEO

#### 3.1. Aparati, laboratorijski pribor, reagensi i matematičko-softverski sistemi

Tečni hromatograf : Waters Acquity H-Class UPLC System, Milford, Masačusets, SAD

- *Pumpa: Waters Quaternaty UPLC Pump sa sistemom za deaeraciju, SAD*
- *Detektor: UV/VIS Plus detektor*
- *Sistem za injektovanje: autosempler sa kapacitetom od 112 standardnih bočica*
- *Softver za obradu podataka: MassLynx® v4.1 Software Upgrade, Waters Group*
- *Zapremina injektovanja: 1 µL*

Tandem maseni spektrometar: Waters Triple Quadrupole System, Masačusets, SAD

- *Jonski izvor: Elektrosprej jonizacija*
- *Maseni analizator: Trostruki kvadrupol*
- *Detektor: Elektronski multiplikator kanonskog tipa*

Elektronska analitička vaga: Sartorius tip 121, Sartorius GmbH, Getingen, Nemačka

Ultrazvučno kupatilo: Fungilab, Barselona, Španija

pH-metar sa kombinovanim staklenom elektrodom: Metrohm tip 780, Herisau, Švajcarska

Vorteks mešalica: Vortex-Genie tip 2T, Scientific Industries Inc, Njujork, SAD

Centrifuga: Eppendorf tip 5424R, Eppendorf Ltd, Stivenidž, Velika Britanija

Laboratorijski pribor

- *Sistem za filtriranje: Whatman 47 mm glass/mesh membranski nosač, Whatman International Ltd, Mejdston, Engleska*
- *Membranski filteri: Nylon membranski filteri, 0,45 µm i 0,22 µm veličina pora, Whatman International Ltd, Mejdston, Engleska*
- *Automatske pipete: FinnpiPETTE™ F1 adjustable-volume pipettes, Thermo Fisher Scientific Inc, Vanta, Finska*

Reagensi

- *Acetonitril: LC-MS grade, Fischer Scientific International, Hampton, SAD*
- *Voda: HPLC gradient grade, Fischer Scientific International, Hampton, SAD*
- *Mravlja kiselina: ~ 99%, Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD*

### Hromatografske kolone

- UPLC Acquity CSH Phenyl-hexyl – dimenzije 50 mm × 2,1 mm, 1,7 μm veličina čestica, Waters, Milford, Masačusets, SAD
- UPLC Acquity BEH Amide – dimenzije 50 mm × 2,1 mm, 1,7 μm veličina čestica, Waters, Milford, Masačusets, SAD

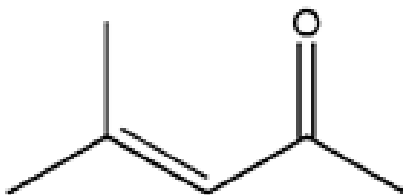
### Matematičko-softverski sistemi

- Design-Expert® 10.0. – Stat-Ease Inc, Mineapolis, Minesota, SAD
- Microsoft Office Excel 2010 – Microsoft, Neitik, Masačusets, SAD
- Modde Pro 12, Umetrics, Umea. Švedska

### Standardne supstance i farmaceutski oblik

- Teikoplanin (sledećeg sastava teikoplanin A3-1, 11.7%; A2-1, 7.3%; A2-2/2-3, 60.2%; A2-4/A2-5, 20.8 %) – referentni standard, Sigma Aldrich St Louis, SAD
- Nečistoća A, nečistoća teikoplanina - referentni standard, Sigma Aldrich St Louis, SAD
- Vankomicin – referentni standard, Sigma Aldrich St Louis, SAD
- Roksitromicin – interni standard, Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA)
- Targocid 400 mg puder za rastvor za injekciju/infuziju ili oralni rastvor (broj serije: A 6186) and Vancomycin 1 g puder za rastvor za infuziju (broj serije 2742606)
- Čista plazma – matriks, Sanguin, Amsterdam

Strukturne formule internog standarda i analizirane nečistoće A (nečistoće teikoplanina) date na slici 7 i 8.



**Slika 7.** Strukturna formula nečistoće A





## 3.2. Optimizacija hromatografskog razdvajanja izomera teikoplanina, njegove nečistoće A i vankomicina u UHPLC-MS/MS sistemu – farmaceutski oblik

### 3.2.1 Optimizacija uslova tandem masenog spektrometra

- Maseni analizator – trostruki kvadrupolni system (TQD, Waters, SAD)
- Metoda jonizacije – elektrosprej jonizacija (metoda praćenja višestrukih reakcija - *multiple reaction monitoring* (MRM))
- Desolvacioni gas – Azot
  - temperatura desolvacije - 500 °C
  - Protok desolvacionog gasa - 1000 L h<sup>-1</sup>
- Kolizioni gas – argon
- Protok gasa konusa - 10 L h<sup>-1</sup>
- Temperatura jonskog izvora - 150 °C
- Softverski programi – Modde Pro 12, Umetrics, Umea. Švedska

Detekcija i kvantifikacija analita sprovedena je korišćenjem pozitivne elektrosprej jonizacije i MRM mode-a praćenja.

Parametri masenog spektrometra (MS) – napon kapilare (*capillary voltage*), napon konusa (*cone voltage* (CV)) i koliziona energija (*collision energy* (CE)) optimizovani su implementacijom metodologije ekperimentalnog dizajna. Optimalne vrednosti navedenih MS parametara za svaki fragmenti jon koji je korišćen u kvantifikaciji definisane su praćenjem njihovog intenziteta jonskog signala/odgovora izvođenjem eksperimenata prema matrici *Rechtschaffen* dizajna, a koja je prikazana u tabeli 2.

**Table 2.** Eksperimentalni plan *Rechtschaffen* dizajna sa prikazanim rezultatima intenziteta jonskog signala/odgovora

Br. Eksp	A	B	C	$I_{T A2-2/A2-3}$	$I_{T A2-4/A2-5}$	$I_{T A2-1}$	$I_{T A3-1}$	$I_v$	$I_{ImpA}$
1	2.5	10	10	301255	104101	3658	5821	218324	582541
2	2.5	50	40	1,52363e+06	675810	30254	36254	1,33256e+06	3,00146e+06
3	4.5	10	40	402581	158741	4002	6258	417524	800526
4	4.5	50	10	584251	219452	7152	10247	435265	1,11479e+06
5	2.5	10	40	1,42584e+06	601254	15247	30251	1,17259e+06	2,54784e+06
6	2.5	50	10	75841	3425	1241	1568	63824	150487
7	4.5	10	10	625841	222584	70025	10284	432256	1,24781e+06
8	4.5	30	25	1,25647e+06	514725	16254	26785	1,05122e+06	2,50148e+06
9	3.5	50	25	1,72548e+06	914752	20192	46257	1,8811e+06	3,48751e+06
10	3.5	30	40	1,65847e+06	870521	17258	40855	1,5525e+06	3,30148e+06
11	3.5	30	25	1,95698e+06	884561	32015	45265	1,74021e+06	3,86325e+06
12	3.5	30	25	1,89256e+06	895241	30254	47352	1,73013e+06	3,89654e+06
13	3.5	30	25	1,84752e+06	897593	29217	48523	1,73258e+06	3,84215e+06

A - napon kapilare; B – napon konusa; C – koliziona energija;  $I_{T A2-2/2-3}$  - intezitet jonskog signala T A2-2/2-3 tranzicije (940,6→316,3);  $I_{T A2-4/2-5}$  – intezitet jonskog signala T A2-4/2-5 tranzicije (947,6→330,0);  $I_{T A2-1}$  – intezitet jonskog signala T A2-1 tranzicije (939,8→314,3);  $I_{T A3-1}$  – intezitet jonskog signala T A3-1 tranzicije (782,4→125,8);  $I_v$  – intezitet jonskog signala vankomicin tranzicije (725,1→99,9);  $I_{ImpA}$  – intezitet jonskog signala tranzicije nečistoće A (98,9→42,9)

Za postupak optimizacije korišćeni su rastvori koncentracije  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  ukupnog teicoplanina,  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  vancomicina,  $10 \text{ng mL}^{-1}$  nečistoće teikoplanina (nečistoća A) and  $200 \text{ng mL}^{-1}$  roksitromcina (interni standard) pripremljeni u smeši acetonitril / voda (50/50, v/v) sa 0,1% mravljom kiselinom.

Uzorci su direktno injektovani u maseni detektor. Optimalne vrednosti ispitivanih MS parametara prikazani su u tabeli 3.

**Table 3.** Optimalne vrednosti MS parametara

	m/z vrednost	CV (V)	CE (V)	Napom kapilare (kV)
Teikoplanin A3-1	782,4→203,7	29,2	33,8	3,0
	782,4→125,8*	29,0	32,7	3,3
Teikoplanin A2-1	939,8→296,2	25,1	29,2	3,0
	939,8→314,3*	24,0	26,0	3,1
Teikoplanin A2-2/A2-3	940,6→298,2	28,3	34,4	3,2
	940,6→316,3*	26,0	30,6	3,2
Teikoplanin A 2-4/A 2-5	947,6→204,2	28,9	33,9	3,3
	947,6→330,0*	36,9	32,9	3,3
Nečistoća A	98,9→77,9	28,0	17,2	3,1
	98,9→42,9*	29,6	22,5	3,3
Vancomicin	725,1→144,0	28,1	29,5	3,2
	725,1→99,9*	28,0	32,0	3,5
Roksitromicin	837,6→679,5	30,0	20,0	3,0
	837,6→158,1*	30,0	30,0	3,0

CV- napon konusa (eng. *cone voltage*); CE- kolizijska energija (eng. *collision energy*); kV- napon kapilare (eng. *capillary voltage*)

\*Tranzicije koje su praćene u cilju kvantifikacije

### 3.2.2. Optimizacija hromatografskih uslova

- Sastav mobilne faze – voda sa 0,1% mravljom kiselinom (mobilna faza A) i acetonitril (mobilna faza B)
- Protok mobilne faze – 0,25 mL min<sup>-1</sup>
- Zapremina injektovanja – 3 µL
- Kolona - *UPLC Acquity CSH Phenyl-hexyl* – dimenzije 50 mm × 2,1 mm, 1,7 µm veličina čestica
- Temperatura kolone – 30 °C
- Softverski programi – Modde Pro 12, Umetrics, Umea. Švedska

Smeša rastvora 10 µg mL<sup>-1</sup> ukupnog teicoplanina, 5 µg mL<sup>-1</sup> vancomicina, 1 ng mL<sup>-1</sup> nečistoće teicoplanina (nečistoća A) i 200 ng mL<sup>-1</sup> roxitromcina (interni standard) pripremljena u smeši acetonitril / voda (50/50, v/v) sa 0,1% mravljom kiselinom korišćena je za izvođenje eksperimenata prema matrici *Rechtschaffen* dizajna, a cilju definisanja optimalnih hromatografskih uslova.

Matrica - plan eksperimenata navedenog dizajna prikazana je u tabeli 4.

Optimizirani linerni gradijent počinje sa 6,5% (v/v) udela mobilne faze B i završava se sa 95,8% (v/v) mobilne faze B u trajanju od 3,20 minuta. Nakon toga početni uslovi se vraćaju na početne vrednosti za 0,1 minuta kako bi se u naredna 2 minuta izvršila re-ekvilibracija kolone.

**Table 4.** Eksperimentalni plan *Rechtschaffen* dizajna sa rezultatima odgovora koji su praćeni

Exp. number	A	B	C	s <sub>1</sub>	s <sub>2</sub>	s <sub>3</sub>
1	5	2	90	0,01	0,12	0,18
2	5	4	100	0,02	0,36	0,42
3	10	2	100	0,01	0,15	0,25
4	10	4	90	0,04	0,38	0,49
5	5	2	100	-0,01	0,14	0,20
6	5	4	90	0,06	0,35	0,52
7	10	2	90	0,08	0,24	0,38
8	10	3	95	0,03	0,32	0,46
9	7.5	4	95	0,05	0,35	0,30
10	7.5	3	100	0,07	0,28	0,54
11	7.5	3	95	0,08	0,30	0,45
12	7.5	3	95	0,08	0,34	0,46
13	7.5	3	95	0,08	0,30	0,45

A- početni sadržaj acetonitrile (%); B-vreme linearnog dela gradijenta (min); C- završni sadržaj acetonitrila (%)

s<sub>1</sub> – razlika retencionog vremena početka roksitromicin pika i završetka teikoplanin A 2-2/A 2-3 pika; s<sub>2</sub> – razlika retencionog vremena početka pika nečistoće A i završetka pika roksitromicina; s<sub>3</sub> – razlika retencionog vremena početka pika nečistoće A i završetka teicoplanin A 2-2/A pika

### 3.3 Validacija UHPLC-MS/MS metode

#### *Priprema osnovnih i radnih rastvora standarda*

Osnovni rastvori standarda za vankomicin, teikoplanin i njegovu nečistoću A pripremljeni su u vodi LC/MS kvaliteta, u sledećim koncentracijama: vankomicin  $2 \text{ mg mL}^{-1}$ , teikoplanin  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  i nečistoća A  $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ . Osnovni rastvori standarda serijski su razblaženi smešom acetonitrile/voda (50/50, v/v) sa 0,1% mravljom kiselinom u cilju dobijanja radnih rastvora željenih koncentracija ( $0,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  -  $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  za vankomicin;  $5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  -  $75 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  za ukupni teikoplanin and  $0,25$ - $5 \text{ ng mL}^{-1}$  za nečistoću A). Osnovni rastvor roksitromicina (interni standard) pripremljen je u metanolu u koncentraciji  $2 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ . Svi rastvori koji su korišćeni za ispitivanje parametara validacije sadrže interni standard u koncentraciji  $100 \text{ ng mL}^{-1}$ .

#### *Limit kvantifikacije i limit detekcije (Limit of quantification (LOQ) and detection (LOD))*

Limit kvantifikacije predstavlja najmanju količinu analita koja može biti određena sa prihvatljivom preciznošću i tačnošću. LOQ je određen kao najniža koncentracija sa odnosom signal/šum  $> 10:1$  i relativnom standardnom devijacijom (RSD) za pet ponavljanja manjom od 20%.

Limit detekcije određen je kao najniža koncentracija sa odnosom signal/šum  $> 3:1$ .

LOD and LOQ određeni su za nečistoću A.

#### *Selektivnost*

U cilju potvrde selektivnosti razvijene metode injektovana je smeša acetonitril/voda (50/50, v/v) sa 0,1% mravljom kiselinom. Čisti rastvori (*blank samples*) upoređivani su sa "opterećenim" rastvorom (rastvor koji sadrži  $5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  vankomicin,  $25 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  ukupni teikoplanin and  $2 \text{ ng mL}^{-1}$  nečistoća A).

#### *Tačnost*

Tačnost metode procenjena je korišćenjem tri serije, tri nivoa koncentracije ispitivanih analita ( $4 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $6 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  za vankomicin;  $20 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $25 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $30 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  za ukupni teikoplanin;  $1,6 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $2 \text{ ng mL}^{-1}$  i  $2,4 \text{ ng mL}^{-1}$  za nečistoću A) pripremljeni u smeši acetonitril/voda (50/50, v/v) sa 0,1% mravljom kiselinom.

### *Preciznost*

Preciznost je ispitana na pravim uzorcima, pa su u tu svrhu korišćeni komercijalno dostupni Targocid 400 mg prašak za rasvor za injekciju/infuziju ili oralni rastvor Vancomycin 1 g prašak za rastvor za infuziju. Šest nezavisnih uzoraka vankomicina u koncentraciji  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  i teikoplanina u koncentraciji  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  korišćeni su za procenu preciznosti.

Uzimajući u obzir da je koncentracija nečistoće A bila ispod limita detekcije, uzorci su 'opterećeni' odgovarajućom zapreminom osnovnog rastvora nečistoće A.

### *Linearnost*

Linearnost za vankomicin, svih šest komponenata teikoplanina i njegove nečistoće A, procenjena je korišćenjem sedam rasvora različitih nivoa koncentracije pripremljenih u smeši acetonotril/voda (50/50, v/v) sa 0,1% mravljom kiselinom. Teikoplanin A2-2/A2-3 i teikoplanin A2-4/ A2-5 predstavljaju izomerne parove, pa je to razlog zašto je korišćena jedna kalibraciona kriva za izomerni par A2-2/A2-3 i jedna kalibraciona kriva za izomerni par A2-4/ A2-5.

Opseg linearnosti bio je sledeći:  $0,5-10 \mu\text{g mL}^{-1}$  za vankomicin;  $0,59-8,75 \mu\text{g mL}^{-1}$  za teikoplanin A3-1;  $0,37-5,46 \mu\text{g mL}^{-1}$  za teikoplanin A2-1;  $3,01-45,15 \mu\text{g mL}^{-1}$  za teikoplanin A2-2/A2-3 i  $1,04-15,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  za teikoplanin A2-4/A2-5 i  $0,25-5 \text{ ng mL}^{-1}$  za nečistoću A.



### 3.4. Ispitivanje stabilnosti vankomicina i teikoplanina u uslovima forsirane degradacije

#### 3.4.1 Studije forsirane degradacije

Osnovni rastvori vankomicina i ukupnog teikoplanina pripremljeni su u smeši acetonotril/voda (50/50, v/v) sa 0,1% mravljom kiselinom (50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  rastvor vankomicina i 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  rastvor teikoplanina). Korišćenjem 1 mL navedenih rastvora u odmernom sudu od 10 mL koji su dopunjeni do crte stres agensom (0,1 M HCl, 0,01 M HCl, 0,1 M NaOH, 0,01 M NaOH, 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 15%  $\text{H}_2\text{O}_2$  i 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) dobijeni su rastvori koncentracije 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (vankomicin) and 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (teikoplanin). Pre injektovanja 1,8 mL dobijenog rastvora i 200  $\mu\text{L}$  rastvora internog standarda (1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) prebačeno je u staklenu vialu. Dobijeni rastvori za svaki stress agens injektovani su pod optimalnim MS i hromatografskim uslovima uz praćenje stepena degradacije.

### 3.5. Optimizacija hromatografskog razdvajanja izomera teikoplanina i vankomicina u UPLC-MS/MS sistemu – u uzorcima humane plazme

#### 3.5.1 Optimizacija uslova tandem masenog spektrometra

- Maseni analizator – trostruki kvadrupolni system (TQD, Waters, SAD)
- Metoda jonizacije – elektrosprej jonizacija (metoda praćenja višestrukih reakcija - *multiple reaction monitoring (MRM)*)
- Desolvacioni gas – Azot
  - temperatura desolvacije - 500 °C
  - Protok desolvaacionog gasa - 1000 L h<sup>-1</sup>
- Kolizioni gas – argon
- Protok gasa konusa - 10 L h<sup>-1</sup>
- Temperatura jonskog izvora - 150 °C
- Softverski programi – Modde Pro 12, Umetrics, Umea. Švedska

Parametri masenog spektrometra (MS) - napon kapilare (*capillary voltage*), napon konusa (*cone voltage (CV)*) i kolizijska energija (*collision energy (CE)*) optimizovani su korišćenjem softverske opcije *IntelliStart*. Optimalne vrednosti gore navedenih parametara date su u tabeli 5.

**Tabela 5.** Optimalne vrednosti MS parametara

	m/z vrednost	CV (V)	CE (V)	Napon kapilare (kV)
Teikoplanin A3-1	782.4→203.7	20	15	3.0
	782.4→125.8*	20	30	3.0
Teikoplanin A2-1	939.8→296.2	18	20	3.0
	939.8→314.3*	18	15	3.0
Teikoplanin A2-2/A2-3	940.6→298.2	20	20	3.0
	940.6→316.3*	20	15	3.0
Teikoplanin A 2-4/A 2-5	947.6→204.2	20	20	3.0
	947.6→330.0	20	15	3.0
Vankomicin	725.1→144.0	20	15	3.5
	725.1→99.9*	20	40	3.5
Roksitromicin	837.57→679.45	30	20	3.5
	837.57→158.13*	30	30	3.5

CV- napon konusa (eng. *cone voltage*); CE- koliziona energija (eng. *collision energy*); kV- napon kapilare (eng. *capillary voltage*)

\*Tranzicije koje su praćene u cilju kvantifikacije

### 3.5.2 Optimizacija hromatografskih uslova

- Sastav mobilne faze – voda sa 0,1% mravljom kiselinom (mobilna faza A) i acetonitril (mobilna faza B)
- Protok mobilne faze – 0,25 mL min<sup>-1</sup>
- Zapremina injektovanja – 1 µL
- Kolona - UPLC ACQUITY CSH (Charge Surface Hybrid) C18 – dimenzije 50 mm × 2,1 mm, 1,7 µm veličina čestica
- Temperatura kolone – 30 °C
- Softverski programi – Modde Pro 12, Umetrics, Umea. Švedsk

Za efikasno razdvajanje vankomicina i komponenata teikoplanina primenjeno je gradijetno eluiranje. U cilju dobijanja optimalnih vrednosti parametara gradijetnog eluiranja primenjena je metodologija ekperimentalnog dizajna, odnosno eksperimenti su izvedene prema matrici definisanoj *Rechtschaffen* dizajnom. Plan ekperimentalata prikazan je u tabeli 6.

**Tabela 6.** Eksperimentalni plan *Rechtschaffen* dizajna sa rezultatima odgovora koji su praćeni

Exp. number	A	B	C	s <sub>1</sub>	s <sub>2</sub>	s <sub>3</sub>
1	5	2	90	1,36	-0,02	1,24
2	5	4	100	1,58	0,02	1,41
3	10	2	100	1,37	-0,02	1,25
4	10	4	90	1,75	0,06	1,52
5	5	2	100	1,29	0,10	1,19
6	5	4	90	1,64	0,03	1,46
7	10	2	90	1,46	-0,01	1,27
8	10	3	95	1,61	0,03	1,43
9	7.5	4	95	1,55	0,01	1,41
10	7.5	3	100	1,43	-0,04	1,29
11	7.5	3	95	1,46	0,01	1,32
12	7.5	3	95	1,46	0,01	1,32
13	7.5	3	95	1,48	0,01	1,31

A – početni sadržaj acetonitrila(%); B-vreme linearnog dela gradijenta (min); C- završni sadržaj acetonitrila (%)

s<sub>1</sub> – razlika retencionog vremena početka pika roksitromicina i završetka pika vankomicina; s<sub>2</sub> – razlika retencionog vremena početka pika roksitromicina i završetka pika teikoplanina A 2-2/A 2-3; s<sub>3</sub> – razlika retencionog vremena početka teikoplanin A 2-2/A 2-3 i završetka pika vankomicina

Smeša rastvora  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  ukupnog teicoplanina,  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  vancomicina i  $200 \text{ ng mL}^{-1}$  roksitromcina (interni standard) pripremljena u smeši acetonitril/voda (50/50, v/v) sa 0,1% mravljom kiselinom korišćena je za optimizaciju hromatografskih uslova.

Optimalni hromatografski uslovi bili su sledeći: linearni gradijent počinje sa 5% (v/v) udela mobilne faze B i završava se sa 94% (v/v) mobilne faze B za 3,10 minuta. Izokratsko eluiranje sa 94% (v/v) mobilne faze B nastavlja se tokom naredna 2 minuta, a potom se kolona re-ekvilibriše sa 5% (v/v) mobilne faze B još dodatnih 2 minuta.

### 3.5.3 Optimizacija metode pripreme uzorka

Za definisanje optimalnih uslova pripreme uzorka plazme primenjen je *D-optimal* dizajn. Odabrani faktori za optimizaciju i plan eksperimenata prema *D-optimal* dizajnu prikazani su u tabeli 7.

U cilju optimizacije metode pripreme uzorka plazme korišćena je smeša koju čine  $100 \mu\text{L}$  *blank* plazme sa  $25 \mu\text{L}$  internog standarda (koncentracije  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) i  $25 \mu\text{L}$  rastvora koji sadrži  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  ukupnog teicoplanina i  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  vancomicina.

Optimalni uslovi pripreme uzorka su sledeći:  $100 \mu\text{L}$  humane plazme preneto je u *eppendorf* tubu, a potom je dodato  $25 \mu\text{L}$  internog standarda (roksitromicin,  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) i  $350 \mu\text{L}$  0,16% mravlje kiseline u acetonitrilu. Uzorci su nakon toga mešani na *Vortex* aparatu u trajanju od 4 minuta, a potom centrifugirani pri brzini od 21 000 rcf u trajanju od 13 minuta na temperaturi od  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nakon centrifugiranja, supernatant je prenet u staklenu vialu i direktno injektovan u UPLC-MS/MS sistem.

Design Expert 10.0 softverski program korišćen je za kreiranje experimentalnog plana i dalju obradu i analizu dobijenih rezultata. Plan eksperimenata definisan *D-optimal* dizajnom i dobijene vrednosti praćenih odgovora prikazane su u tabeli 7.

**Tabela 7.** Plan eksperimenata definisan *D-optimal* dizajnom i dobijene vrednosti praćenih odgovora

Br. Eksp.	A	B	C	D	Vankomicin (%)	Teikoplanin (%)
1	0,15	10	2	ACN	61,3	57,6
2	0,15	20	3	ACN	58,8	51,9
3	0,15	20	3	ACN	57,8	55,3
4	0,15	10	3,2	MeOH	49,1	19,4
5	0,093	18,2	2	MeOH	53,8	28,1
6	0,05	10	4	MeOH	20,3	29,9
7	0,05	10	3	ACN	56,2	55,6
8	0,15	14,2	4	ACN	59,7	70,2
9	0,10	15	3	MeOH	59,5	37,1
10	0,05	10	2	MeOH	18,7	23,5
11	0,05	20	4	ACN	64,9	54,5
12	0,109	10	4	ACN	69,9	74,2
13	0,05	20	2	ACN	34,3	48,3
14	0,10	15	3	MeOH	61,3	35,1
15	0,1375	13,7	2	MeOH	60,3	18,8
16	0,05	20	2,8	MeOH	50,3	38,2
17	0,15	20	4	MeOH	61,6	28,2
18	0,05	10	3	ACN	58,5	48,6
19	0,086	13,35	2	ACN	44,6	69,9
20	0,118	12,8	4	MeOH	57,9	28,3
21	0,15	20	2	MeOH	60,3	30,1
22	0,06	16,2	3,9	MeOH	45,7	44,7
23	0,15	14,2	4	ACN	60,9	70,3
24	0,1	15	3	MeOH	60,7	34,1

A – sadržaj mravlje kiseline (%), B – vreme centrifugiranja (min), C – vreme vorteksiranja (min), D – agens precipitacije (metanol – MeOH ili acetonitril – ACN); Vancomicin (%)– odnos intenziteta jonskog signala vankomicina u plazmi i rastvoru, Teikoplanin (%)– odnos intenziteta jonskog signala ukupnog teikoplanina u plazmi i rastvoru

#### 3.2.4. Validacija UHPLC-MS/MS metode

Optimizirana UHPLC-MS/MS metoda validirana je prema zvaničnim smernicama američke Agencije za hranu i lekove (eng. *Food and Drug Administration* – FDA) za validaciju bioanalitičkih metoda iz 2013. godine [57].

Proces validacije podrazumevao je određivanje LODs, LOQs, tačnosti, preciznosti, linearnosti, stabilnosti, efekta matriksa i *Recovery* efekta.

#### *Priprema rastvora standarda i uzoraka za kontrolu kvaliteta*

Osnovni rastvori standarda vankomicina i teikoplanina pripremljeni su u vodi LC/MS kvaliteta u koncentraciji od 2 mg mL<sup>-1</sup> odnosno 10 mg mL<sup>-1</sup>. Osnovni rastvori standarda korišćeni su za pripremu radnih rastvora standarda željenih koncentracija i to 1 µg mL<sup>-1</sup> - 200 µg mL<sup>-1</sup> za vankomicin i 10 µg mL<sup>-1</sup> - 4000 µg mL<sup>-1</sup> za ukupni teikoplanin. Za razblaživanje osnovnih rastvora korišćena je smeša acetonitril/voda (50/50, v/v). Osnovni rastvor roksitromicina (interni standard) pripremljen je u metanolu u koncentraciji 100 µg mL<sup>-1</sup>, a potom razblažen sa smešom acetonitril/voda (50/50, v/v) do koncentracije 2 µg mL<sup>-1</sup>.

Rastvori standarda za procenu linearnosti metode i rastvora za procenu kvaliteta uzorka (eng. *Quality Control, QC samples*) za sve komponente teikoplanina i vankomicina pripremljeni su u 100 µL *blank* plazme, dodavanjem 25 µL internog standarda (koncentracije 2 µg mL<sup>-1</sup>) i 25 µL radnog rastvora standarda odgovarajuće koncentracije. u cilju dobijanja željenih koncentracija vankomicina (0,05 µg mL<sup>-1</sup> – 10 µg mL<sup>-1</sup>) i ukupnog teikoplanina (0,5 µg mL<sup>-1</sup> – 200 µg mL<sup>-1</sup>).

Za svaki od ispitivanih analita pripremljeno je po tri nivoa koncentracija (LOQ, srednja i visoka koncentracija) prema opsegu koji je naveden u zagradi za svaki analit.

#### *Limit kvantifikacije i limit detekcije*

Limit kvantifikacije predstavlja najmanju količinu analita koja može biti određena sa prihvatljivom preciznošću i tačnošću. LOQ je određen kao najniža koncentracija sa odnosom signal/šum > 10:1 i relativnom standardnom devijacijom (RSD) za pet ponavljanja manjom 20%.

Limit detekcije određen je kao najniža koncentracija sa odnosom signal/šum > 3:1.

### *Selektivnost, tačnost i preciznost*

Kako bi selektivnost razvijene metode bila potvrđena, korišćeno je šest uzoraka *blank* plazme. Uzorci *blank* plazme upoređeni su sa uzorcima plazme koji sadrže vankomicin, teikoplanin i interni standard kako bi potencijalne interferencije endogenih supstanci bile uočene. Kriterijum prihvatljivosti bio je da površina pika interferirajućih supstanci na retencionom vremenu analita bude manja od 20% u odnosu na njegovu površinu pika, odnosno da na retencionom vremenu internog standarda bude manja od 5% u odnosu na njegovu površinu pika.

U cilju procene tačnosti i preciznosti razvijene metode, analizirano je po pet QC uzoraka u tri nivoa koncentracije ( $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  za vankomicin;  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  ukupnog teikoplanina za teikoplanin A3-1;  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  ukupnog teikoplanina za teikoplanin A2-1,  $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  ukupnog teikoplanina za teikoplanin A2-2/2-3,  $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  ukupnog teikoplanina za A2-4/2-5). Svaki uzorak sadržao je interni standard u koncentraciji  $100 \text{ ng mL}^{-1}$ .

*Intra-day* preciznost i tačnost određeni su u okviru istog dana dok su *inter-day* preciznost i tačnost određeni u okviru tri uzastopna dana.

*Intra- i inter-day* preciznost izračunata je i prikazana kao RSD vrednost, dok je *intra- i inter-day* tačnost izračunata kao srednja vrednost.

Kriterijumi prihvatljivosti uključili su preciznost i tačnost unutar regiona  $\pm 15\%$  od teorijske koncentracije za srednju i veliku koncentraciju, odnosno  $\pm 20\%$  od teorijske koncentracije za LOQ uzorke.

### *Procena linearnost metode – konstrukcija kalibracionih krivi*

Za procenu linernosti metode i konstrukciju kalibracioni krivi korišćeno je sedam nivoa koncentracije ispitivaih analita. Teikoplanin A2-2/A2-3 i teikoplanin A2-4/ A2-5 predstavljaju izomerne parove, pa je to razlog zašto je korišćena jedna kalibraciona kriva za izomerni par A2-2/A2-3 i jedna kalibraciona kriva za izomerni par A2-4/ A2-5. Opseg linearnosti bio je sledeći:  $0,05-10 \mu\text{g mL}^{-1}$  za vankomicin;  $0,12-23,4 \mu\text{g mL}^{-1}$  za teikoplanin A3-1;  $0,18-14,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  za teikoplanin A2-1;  $0,15-120,4 \mu\text{g mL}^{-1}$  za teikoplanin A2-2/A2-3 i  $0,11-41,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  za teikoplanin A2-4/A2-5. Svaki uzorak sadržao je interni standard u koncentraciji  $100 \text{ ng mL}^{-1}$ .

### *Prinos ekstrakcije*

*Recovery* vrednosti procenjene su za sve komponente teikoplanina i vankomicina na tri nivoa koncentracije (niska, srednja i visoka koncentracija) kao odnos površine pikova ekstrahovanih uzoraka i odgovarajućih rastvora standarda u vodi istih koncentracija ali bez procesa ekstrakcije.

### *Efekat matriksa*

Efekat matriksa određen je deljenjem odnosa površine pika analita i internog standarda u plazmi i odnosa površine pika analita i internog standarda u vodenom rastvoru (za nisku, srednju i visoku koncentraciju analita i koncentraciju internog standarda od 100 ng mL<sup>-1</sup>).

### *Ispitivanje stabilnosti*

Studije stabilnosti sprovedene su na QC uzorcima niske i visoke koncentracije analite. Kratkoročna stabilnost ispitana je čuvanjem uzoraka na sobnoj temperaturi (25 °C) do 24 h. Dugoročna stabilnost procenjena je čuvanjem uzoraka na temperaturi -80 °C tokom 30 dana. Stabilnost u toku zamrzavanja i odmrzavanja (eng. *freeze-thaw* stabilnost) ispitana je u tri *freeze-thaw* ciklusa sa temperature od -80 °C do sobne temperature. Stabilnost je određena kao odnos koncentracije analita ispitivanog uzorka i *ex-tempore* pripremljenim uzorkom odgovarajuće koncentracije. Dobijena vrednost je izražena u procentima.

### 3.2.5. Primena UHPLC-MS/MS metode za određivanje koncentracije vankomicina i teikoplanina u uzorcima humane plazme

Razvijena i validirana UHPLC-MS/MS bioanalitička metoda uspešno je primenjena za kvantitativno određivanje vankomicina i svih komponenata teikoplanina u uzorcima plazme pacijenata lečenih bilo kojim od ova dva antibiotika. Uzorci plazme uzeti su od 10 pacijenata sa Klinike za nefrologiju Vojnomedicinske akademije, Beograd, Srbija. Pacijenti su podeljeni u dve grupe, 5 pacijenata lečenih vankomicinom i 5 pacijenata lečenih teikoplaninom. Studiju je odobrio Etički komitet Vojnomedicinske akademije u Beogradu 26. aprila 2017. godine. Svi učesnici su pismeno i usmeno upoznati sa neophodnim informacijama o leku i cilju izvođenja ispitivanja (Obaveštenje za ispitanike) uz davanje saglasnosti potpisivanjem Formulara pristanka za učešće u praćenju efekata terapije.



## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

Pregledom literature zapaženo je da se sve veći broj naučnih radova zasnovaniva na tzv. hibridnim tehnikama. Kako savremena analitika lekova, kao i sve oblasti naučnih istraživanja koja se bave aktivnim farmaceutskim supstancama zahtevaju veoma separacione tehnike sa osetljivim načinima detekcije, to je sistem UHPLC sa tandemskom masenom spektrometrijom izabran za unapređenje analitike glikopeptidnih antibiotika. Tome je posebno doprineo i savremeni hemometrijski pristup koji je omogućio dobijanje željenih karakteristika, a time i postizanje postavljenih strogih zahteva u pogledu osetljivosti, tačnosti i preciznosti metode.

U slučaju analize predloženih odabranih glikopeptidnih antibiotika, vankomicina i teikoplanina, definisano je retenciono ponašanje u UHPLC sistemu, kao i opisano jonizaciono ponašanje u masenom spektrometru. Primenom AQbD pristupa znatno su proširena znanja o mogućnostima ovih udruženih metoda, što predstavlja svojevrsni doprinos dosadašnjim naučnim rezultatima, imajući u vidu da je ovakav pristup prvi put sproveden kod analitike i bioanalitike ovih antibiotika.

### 4.1. Optimizacija hromatografskog razdvajanja izomera teikoplanina, njegove nečistoće A i vankomicina u UHPLC-MS/MS sistemu – farmaceutski oblik

Glavni cilj prvog dela naučnog istraživanja bio je razvoj osetljive, pouzdane i efikasne UHPLC-MS/MS metode za istovremenu kvantifikaciju vankomicina, svih šest komponenti teikoplanina i njegove farmakopejske nečistoće A u odgovarajućim farmaceutskim doziranim oblicima. U cilju postizanja navedenih ciljeva, u razvoju MS i UHPLC metoda implementiran je naučno zasnovan AQbD pristup.

Razvoj analitičke metode zasnovan na holističkim principima AQbD metodologije dobija sve širu primenu u cilju boljeg razumevanje uticaja svih faktora povezanih sa razvojem LC/MS metode i dobijanje unapred definisanih i željenih ciljeva optimizacije.

Zbog složenosti strukture odabranih glikopeptida i različite mogućnosti jonizacije ispitani su uticaji parametara masenog spektrometra na stepen jonizacije i fragmentacije. Eksperimentalni dizajn primenjen je u opisivanju procesa jonizacije ovih antibiotika što je dalje omogućilo detaljno sagledavanje i predviđanje uticaja ispitivanih parametara, s ciljem dobijanja maksimalnog intenziteta jonskog odgovora.

Postizanje visokog stepena jonizacije obezbedio je i znatno olakšao dalji razvoj visokoosetljive i selektivne UHPLC-MS/MS metode.

Na kraju ispitivanja, razvijena UHPLC-MS/MS metoda je uspešno validirana i dalje primenjena za praćenje stepena degradacije ispitivanih antibiotika u prisustvu stres agenasa.

#### 4.1.1 Optimizacija parametara masenog spektrometra

Prvi korak u razvoju UHPLC-MS/MS metode bio je jasno definisanje metode i režima jonizacija i uticaja MS parametara na stepen jonizacije i fragmentacije. Uzimajući u obzir da su vankomicin i teikoplanin jedinjenja velike molekulske mase i polipeptidne strukture, za njihovu detaljnu analizu odabrana je elektrospej jonizacija (*eng. electrospray ionization, ESI*) kao najpogodnija metoda jonizacije. Štaviše, vankomicin i teikoplanin jonizuju kao joni sa dvostrukim naelektrisanjem  $[M+2H]^{2+}$  [37] unutar ESI jonskog izvora u režimu pozitivne jonizacije. Međutim, nečistoća teikoplanina (nečistoća A) i roksitromicin (primenjen kao interni standard) jonizuju kao jednostruko naelektrisani joni  $[M+H]^{1+}$ .

Jednostruko i dvostruko naelektrisani joni generisani su zbog prisustva 0,1% mravlje kiseline u mobilnoj fazi i uzorcima, jer se, kao što je u uvodnom delu navedeno, mravlja kiselina ponaša kao donor  $H^+$  jona.

Dvostruko naelektrisani molekulske joni vankomicina i šest glavnih komponenata teikoplanina, kao i jednostruko naelektrisani joni nečistoće A i internog standarda, korišćeni su za dalje ispitivanje uticaja MS parametara u cilju dobijanja najvećeg intenziteta odgovora.

Od velike je važnosti napomenuti da su teikoplanin A2-2/A2-3 (izomeri 1) i teikoplanin A2-4/A2-5 (izomeri 2) parovi izomera sa istim obrascem fragmentacije, jonizacije i hromatografskim ponašanjem (slika 1 i slika 2). Stoga su upravo pomenuti parovi izomera praćeni kao dva pika.

Da bi se postigao stabilan intenzitet jonskog signala i razvila pouzdana MS metoda, definisana su po dva dominantna fragmentna jona za svaki molekulske jon korišćenjem softverske opcije *IntelliStart Mass Lynx* softverskog programa. Uzimajući u obzir složenost strukture analita i značaj precizne i pouzdane analize, potpuna karakterizacija jona je prepoznata kao veoma značajan korak u razvoju MS metode. Pouzdanost MS metode posebno zavisi od parametara MS detektora koji dalje utiču na stepen jonizacije analita i stabilnost jonskog signala.

Praćenje i detaljno razumevanje MS parametara izuzetno doprinose u uspostavljanju pouzdane i osetljive metode, pa je u tom cilju odabran i primenjen AQbD pristup. Ova naučno zasnovana strategija obezbedila je mno go bolje razumevanje svih značajnih MS parametara povezanih sa razvojem MS metode i dobijanje poboljšanih i stabilnijih jonskih odgovora. Detaljni koraci AQbD strategije navedeni su u uvodnom delu. Dodatno, treba istaći da je AQbD pristup prvi put primenjen u razvoju MS metode ove odabrane grupe antibiotika.

Tokom preliminarne faze ovog dela istraživanja određeni su MS parametri i njihov opseg sa značajnim uticijem na intenzitet i stabilnost jonskog signala najdominantnijih fragmentnih jona, a koji su za dalje ispitivanje definisani kao CPPs (napon kapilare, napon konusa i koliziona energija). Kao ATP definisan je stabilan jonski signal visokog intenziteta ispitivanih analita. Za manje značajne MS parametre, takođe su procenjene optimalne vrednosti primenom manuelnog podešavanja i pojedinačnog (eng. *one factor at a time*) testiranja.

Primena visokog napona kapilare dovodi do formiranja manjih kapljica elektrospreja i posledično visokog intenziteta jona, ali isto tako može dovesti do visokonaponskog pražnjenja i na taj način onemogućiti stvaranje kapljica. Povećanje vrednosti napona konusa može dovesti do neselektivne fragmentacije jona u konusu, što utiče na dalju fragmentaciju molekulskih jona i osetljivost metode.

U slučaju kolizione energije, veoma visoke vrednosti mogu uticati na fragmentaciju već generisanih fragmenata što dovodi do stvaranja manje stabilnih i manjih jona fragmenata. Iz svih navedenih razloga, ovi parametri su izabrani kao CPPs za dalju optimizaciju.

Konačni opsezi CPPs bili su sledeći: napon kapilare 2,5-4,5 eV; napon konusa 10-40 eV i koliziona energija 10-40 kV. Definisavanje opsega ispitivanih parametara je zahtevan i kritičan korak AQbD pristupa, odnosno metodologije eksperimentalnog dizajna koja je neizostavan deo AQbD pristupa.

U cilju detaljnog ispitivanja uticaja odabranih MS faktora, odabran je *Rechtschaffen* optimizacioni dizajn, a merenje intenziteta jonskog signala kao kritični atribut metode (CQA). *Rechtschaffen* dizajn je dizajn na dva nivoa faktora (granični gornji i granični donji). Broj eksperimenata (N) dobija se na osnovu sledećeg izraza:  $N = 1 + k + k(k - 1)/2 + cp$ , gde je k broj faktora, a cp centralna tačka. Prednost ovog dizajna je što ne zahteva izvođenje velikog broja eksperimenata [58].

Eksperimentalni plan i obrada podataka urađeni su MODDE Pro 12 softverskim programom. Eksperimentalni plan i dobijene vrednosti intenziteta jonskog signala kao praćenog odgovora prikazani su u Tabeli 2, 3.2.1 poglavlja u Ekperimentalnom delu.

Primena metodologije eksperimentalnog dizajna omogućava uspostavljanje matematičke korelacije i kreiranje matematičkih modela za predviđanje ponašanja svakog fragmentnog jona tokom procesa jonizacije gde koeficijenti modela koreliraju sa stepenom uticaja faktora na intenzitet jonskog signala. Statistička validacija kreiranih modela izvršena je korišćenjem ANOVA testa kojim su dobijeni statistički parametri modela: koeficijent determinacije ( $R^2$ ), prilagođeni koeficijent determinacije ( $Adj R^2$ ) i koeficijent predikcije ( $Q^2$ ). Vrednost ovih parametara, kao i vrednosti koeficijenta modela za svaki ispitivani fragmentni jon prikazani su u tabeli 8.

Visoke vrednosti parametara modela  $R^2$  i  $Adj R^2$  pokazuju da kreirani modeli uspostavljaju dobru matematičku korelaciju između eksperimentalno dobijenih podataka, dok visoke vrednosti  $Q^2$  potvrđuju dobre prediktivne karakteristike matematičkih mode

**Tabela 8.** Vrednosti koeficijenata i statistički parametara dobijenih matematičkih modela za ispitivane MS parametre i praćene odgovore

$I_{T A2-2/2-3}$	Koeficijent	Standarda greška	p-vrednost	Interval pouzdanosti
Konstanta	1.9356e+06	22320,4	3,38005e-06	71033,9
A	-247059	24065,3	0,00197061	76586,9
B	34957,2	24065,3	0,0242275	76586,9
C	-68599,8	43762,1	0,0214979	139271
A <sup>2</sup>	-496392	41852,3	0,00128869	133193
B <sup>2</sup>	-170145	41852,3	0,0268428	133193
C <sup>2</sup>	-940865	74404	0,00106656	236788
A*C	-454357	28559,3	0,000539983	90889,1
B*C	102659	28559,3	0,0369028	90889,1
$Q^2$ - 0,980; $R^2$ - 0,999; $R^2$ adj.-0,995 <i>Lack of fit</i> - 0,752 Interval pouzdanosti- 0,95				
$I_{T A2-4/2-5}$	Koeficijent	Standarda greška	p-vrednost	Interval pouzdanosti
Konstanta	934018	12234,9	4,95383e-06	38937,2
A	-90375,6	13191,4	0,00636565	41981,1
B	45454,3	13191,4	0,0410634	41981,1
C	28350,9	23988,2	0,0322407	76341,6
A <sup>2</sup>	-358737	22941,3	0,000568381	73009,9
B <sup>2</sup>	-376352	40784,6	0,00269223	129795
A*C	-176055	15654,8	0,00150744	49820,8
B*C	69354,2	15654,8	0,0213681	49820,8
$Q^2$ - 0,689, $R^2$ - 0,999 $R^2$ adj.-0,995 <i>Lack of fit</i> - 0,025 Interval pouzdanosti- 0,95				
$I_{T A2-1}$	Koeficijent	Standarda greška	p-vrednost	Interval pouzdanosti
Konstanta	27331,5	699,959	3,69551e-05	2227,59
A	-7337,83	754,677	0,00231077	2401,73

<b>B</b>	-10051.2	754.677	0.000914873	2401.73
<b>C</b>	-16583.2	1372.36	0.00121973	4367.49
<b>A<sup>2</sup></b>	-14249.1	1312.47	0.00167213	4176.89
<b>C<sup>2</sup></b>	-9468.57	2333.28	0.0269701	7425.58
<b>A*B</b>	-14821.4	671.707	0.000203771	2137.68
<b>A*C</b>	-25480.5	895.609	9.53398e-05	2850.24
<b>B*C</b>	6198,18	895,609	0,00618468	2850,24
Q <sup>2</sup> - 0,853, R <sup>2</sup> - 0,998 R <sup>2</sup> adj.-0,994 Lack of fit- 0,393 Interval pouzdanosti- 0,95				
<b>I<sub>T A3-1</sub></b>	<b>Koeficijent</b>	<b>Standarda greška</b>	<b>p-vrednost</b>	<b>Interval pouzdanosti</b>
Konstanta	48046,7	648,926	5,42978e-06	2065,19
<b>A</b>	-6219,45	699,655	0,00300211	2226,63
<b>B</b>	2326,55	699,655	0,0448767	2226,63
<b>A<sup>2</sup></b>	-16376,4	1216,78	0,000886929	3872,36
<b>C<sup>2</sup></b>	-24533,1	2163,16	0,00147048	6884,19
<b>A*C</b>	-9501,87	830,312	0,00143204	2642,44
<b>B*C</b>	3402,14	830,312	0,0262938	2642,44
Q <sup>2</sup> - 0,997, R <sup>2</sup> - 0,999, R <sup>2</sup> adj.-0,994 Lack of fit- 0,972 Interval pouzdanosti- 0,95				
<b>I<sub>v</sub></b>	<b>Koeficijent</b>	<b>Standarda greška</b>	<b>p-vrednost</b>	<b>Interval pouzdanosti</b>
Konstanta	1,79802e+06	16814,8	1,8031e-06	53512,3
<b>A</b>	-158473	18129,2	0,00315247	57695,6
<b>B</b>	85133.9	18129,2	0,0182635	57695,6
<b>C</b>	-49918.5	32967,5	0,022721	104918
<b>A<sup>2</sup></b>	-639816	31528,8	0,000261604	100339
<b>C<sup>2</sup></b>	-974121	56051,2	0,000415177	178381
<b>A*C</b>	-307688	21514,7	0,000740896	68469,9
<b>B*C</b>	120135	21514,7	0,0113414	68469,9
Q <sup>2</sup> - 0,833, R <sup>2</sup> - 0,999, R <sup>2</sup> adj.-0,997 Lack of fit- 0,008 Interval pouzdanosti- 0,95				
<b>I<sub>Imp A</sub></b>	<b>Koeficijent</b>	<b>Standarda greška</b>	<b>p-vrednost</b>	<b>Interval pouzdanosti</b>
Konstanta	3,91035e+06	34102,9	1,46243e-06	108531

<b>A</b>	-432056	36768,8	0,00132458	117015
<b>B</b>	118701	36768,8	0,0482774	117015
<b>C</b>	-182281	66863,1	0,032172	212790
<b>A<sup>2</sup></b>	-1,06803e+06	63945,1	0,000467273	203503
<b>B<sup>2</sup></b>	-357900	63945,1	0,0112673	203503
<b>C<sup>2</sup></b>	-1,8928e+06	113680	0,000471626	361783
<b>A*C</b>	-833883	43635,1	0,000312896	138867
<b>B*C</b>	265536	43635,1	0,00891095	138867
Q <sup>2</sup> - 0,851, R <sup>2</sup> - 0,999, R <sup>2</sup> adj.-0,997 Lack of fit- 0,051 Interval pouzdanosti- 0,95				

A - napon kapilare; B – napon konusa; C – koliziona energija; **I<sub>T A2-2/2-3</sub>** - jonski intenzitet T A2-2/2-3 tranzicije (940,6→316,3); **I<sub>T A2-4/2-5</sub>** – jonski intenzitet T A2-4/2-5 tranzicije (947,6→330,0); **I<sub>T A2-1</sub>** – jonski intenzitet T A2-1 tranzicije (939,8→314,3); **I<sub>T A3-1</sub>** – jonski intenzitet T A3-1 tranzicije (782,4→125,8); **I<sub>v</sub>** – jonski intenzitet vankomicin tranzicije (725,1→99,9); **I<sub>Imp A</sub>** – jonski intenzitet tranzicije nečistoće A (98,9→42,9)

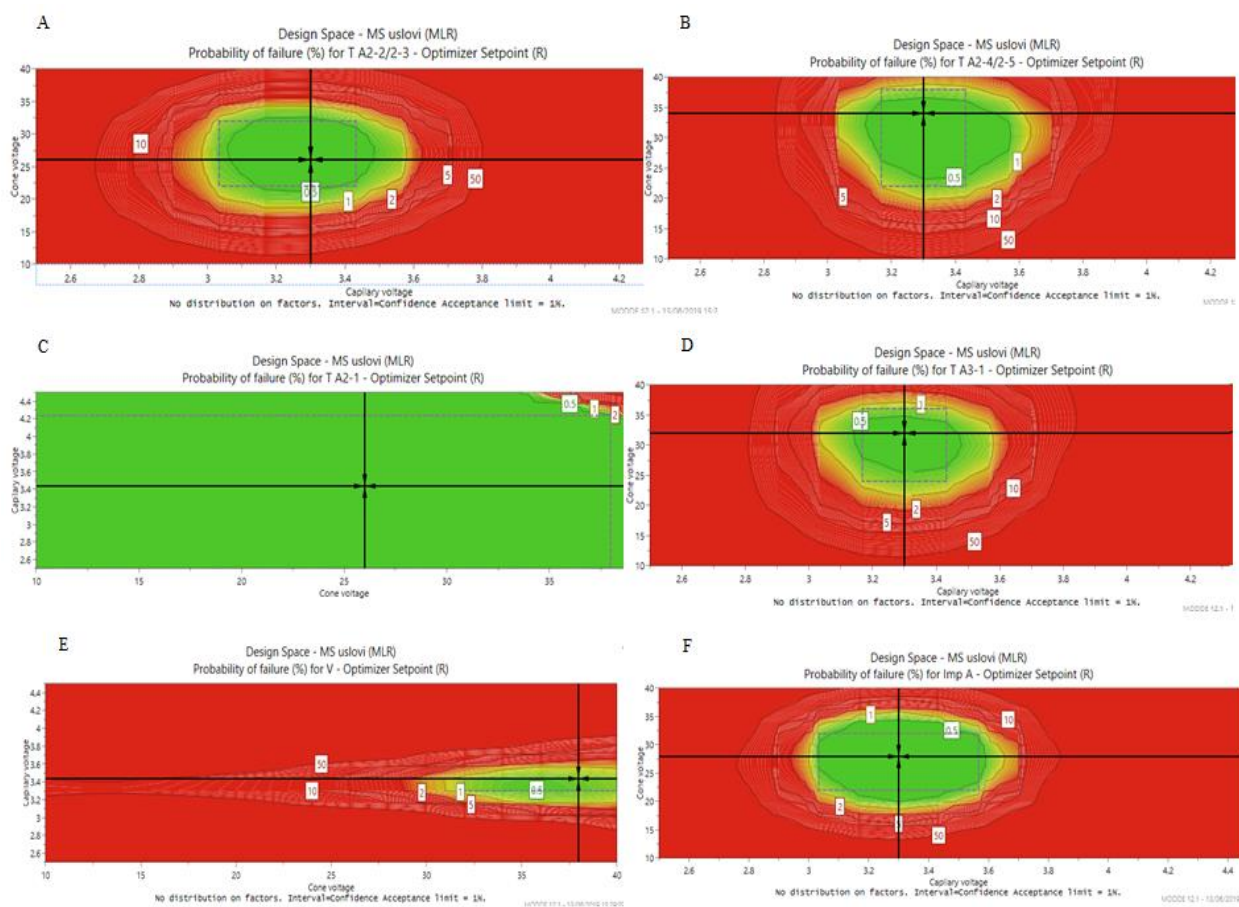
Može se primetiti da su na praćeni CQA uticala sva tri CPPs. p-vrednost manja od 0,05 ukazuje da faktor ima značajan uticaj na ispitivani odgovor.

Praćenje analita sprovedeno je u MRM režimu što pokazuje da fragmentacija, a samim tim i ispitivani MS parametri imaju veliki značaj za njihovo precizno određivanje.

Najvažniji korak AQbD pristupa predstavlja definisanje prostora gde su performanse MS metode postignute, pa je iz tog razloga tokom dalje obrade podataka, za svaki praćeni fragmenti jon konstruisan dizajn prostora (*eng. Design Space, DS*) odnosno dizajn operabilnog regiona metode (*eng. method operable design region MODR*). DS odnosno MODR definisan je u ICH Q8 smernici i predstavlja prostor vrednosti ispitivanih varijabli (napona kapilare, napona konusa i kolizione energije) u okviru kojeg je rizik da dođe do greške metode minimalan, odnosno performance metode ostaju nepromenjene. Pomenuti MODR za svaki ispitivani fragmenti jon konstruisan je u MODDE 12 Pro softverskom programu korišćenjem Monte Carlo simulacija.

Optimalne vrednosti ispitivanih faktora definisane su korišćenjem softverske opcije Optimizer postavljanjem “maksimizacija” intenziteta jonskog signala za svaki fragment jona kao važnog cilja optimizacije, uzimajući u obzir da je visoka osetljivost metode jedan od glavnih ciljeva ovog dela istraživanja. Optimalne vrednosti MS parametara date su u tabeli 3 odeljka 3.2.1. u Eksperimentalnom delu.

Na slici 9 prikazani su gore navedeni DS/MODR za svaki praćeni analit. Zeleno obojene površine pokazuju region vrednosti ispitivanih faktora u okviru kojih su performanse metode očuvane.



**Slika 9.** MODR ispitivanih MS parametara sa značajnim uticajem na intenzitet jonskog signala odabranih fragmentnih jona za teikoplanin komponente -A, B, C, D; vankomicin – E i nečistoću teikoplanina (nečistoća A) – F

#### 4.1.2. Optimizacija hromatografskih uslova

Sledeća faza prvog dela istraživanja ove doktorske disertacije bila je razvoj visoko selektivne i efikasne UHPLC metode u sprezi sa prethodno razvijenom MS metodom detekcije.

Uzimajući u obzir da su ispitivana jedinjenja proizvodi fermentacije gde mala promena fermentacionih uslova može dovesti do odstupanja u njihovom ukupnom sadržaju ili sadržaju nekih od komponenata teikoplanina [59], razvoj visoko selektivne i pouzdane metode je od posebnog značaja za kontrolu kvaliteta ovih lekova.

Dodatno, svaka mala promena u sadržaju dovodi do promene u njihovoj kinetici i sledstveno do promene u efikasnosti.

Tokom preliminarne faze ovog dela istraživanja, ispitivani su izokratski i gradijentni režim eluiranje, pri čemu je odabran gradijentni program eluiranja koji je dalje optimizovan u cilju postizanja što bolje separacije. Pošto su ispitivani antibiotici kompleksne polipeptidne strukture uz mogućnost promene sadržaja pri malim promenama fermentacionih uslova, odabran je gradijentni metod eluiranja.

U cilju postizanja što bolje selektivnosti za komponente smeše i optimalnog vremena trajanja analize, u toku razvoja metode treba uzeti u obzir nagib gradijenta, kao veoma važnu varijablu. Optimizacijom nagiba gradijenta postiže se željena selektivnost. U slučaju da analiza predugo traje, kako bi se zadržala postignuta selektivnost, nagib gradijenta treba držati konstantnim, a promenom (povećanjem) protoka mobilne faze optimizovati vreme trajanja analize. Međutim, povećanje protoka mobilne faze je ograničeno zbog ograničenih vrednosti pritiska UHPLC sistema.

Nakon izbora programa eluiranja, sledeći korak bio je izbor tipa gradijenta; linearni ili multistep gradijent. Generalno je preporučljiva upotreba jednostavnog linearnog gradijenta zbog bolje reproducibilnosti, manjeg "stresiranja" kolone i bolje rezolucije.

Još jedan korak tokom preliminarne faze ispitivanja bio je izbor stacionarne faze. Odabrana UHPLC kolona koja je mnogo kraća i uža omogućava bolju rezoluciju i oblik pika, značajno kraće vreme trajanja analize u poređenju sa HPLC kolonom koja je korišćena u oficinalnoj hromatografskoj metodi koja je definisana u evropskoj farmakopeji (Ph. Eur 8) [60]. Dodatno, UHPLC kolona omogućava mnogo jednostavnije povezivanje sa masenim detektorom zbog mogućnosti primene nižih protoka mobilne faze.

Iz navedenih razloga, za dalju optimizaciju hromatografskih uslova odabrana je CSH *Phenyl-hexyl* kolona koja je posebno pogodna za separaciju aromatičnih jedinjenja kroz  $\pi$ - $\pi$  interakcije sa *phenyl* ligandom.



U cilju što boljeg i detaljnijeg sagledavanja hromatografskog ponašanja ispitivanih jedinjenja, holistički AQbD pristup je primenjen i u ovoj fazi razvoja metode.

AQbD metodologija primenjena je praćenjem identičnih koraka kao što je to opisano 1.7. odeljku u Uvodnom delu ove doktorske disertacije.

Kao ATP definisana je efikasna separacija vankomicina, šest glavnih komponenata teikoplanina, njegove nečistoće A i internog standarda praćena vrednostima faktora separacije  $s \geq 0$ , *Recovery* vrednostima 98%-102% za aktivne supstance i 80%-120% za nečistoću, RSD  $\leq 2\%$  za aktivne supstance i RSD  $\leq 15\%$  za nečistoću.

Kao što je već pomenito, nagib gradijenta je odabran kao značajna varijabla za dobijanje dobrog retencionog ponašanja, oblika pika i stabilnog signala jonskog odgovora.

U cilju što bolje optimizacije uslova gradijenta, definisani su faktori sa značajnim uticajem na nagib gradijentnog eluiranja i njihov opseg a koji su tokom daljeg ispitivanja praćeni kao CPPs.

Početni sadržaj acetonitrila (sadržaj acetonitrile na početku gradijenta), vreme trajanja linearnog dela gradijenta, i završni sadržaj acetonitrila (sadržaj acetonitrila na kraju linearnog gradijenta) odabrani su kao značajni faktori i definisani njihovi opsezi 5–10% (v/v), 2-4 minuta i 90–100% (v/v).

U ovoj fazi implementacije AQbD ne može se zaboraviti da CQA mora biti jasno procenjen. Da bi se dobilo željeno i kontrolisano retenciono ponašanje, faktori separacije  $s$  između kritičnih hromatografskih parova praćeni su kao CQA. Pošto je vankomicin pokazao dobro razdvajanje u poređenju sa teikoplaninom A 2-2/A 2-3, nečistoćom A i internim standardom, kritični parovi bili su sledeći: roksitromicin/teikoplanin A 2-2/A 2-3; nečistoća A/roksitromicin i nečistoća A/teikoplanin A 2-2/A 2-3, a za koje su dalje praćeni faktori separacije  $s_1$ ,  $s_2$  i  $s_3$  (koje se ovim redosledom odnose na navedene kritične parove). Najintenzivniji i ujedno najzastupljeniji oblik je teikoplanin A 2-2/A 2-3 i to je razlog zašto je ovaj oblik odabran za dalju optimizaciju. Takođe, ostale komponente su pokazale dobar oblik pika, zadovoljavajuće retenciono ponašanje, ponovljiv odgovor kao i stabilan intenzitet jonskog odgovora. Odnos intenziteta jonskog odgovora između komponenenata je sve vreme bio isti, tako da je metoda selektivna za sve navedene komponente teikoplanina.

Kao što je već pomenuto, sledeća faza implementacije AQbD pristupa uključivala je primenu *Rechtschaffen* optimizacionog dizajna za postizanje ciljeva optimizacije. Za generisanje matrice eksperimenata i analizu podataka korišćen je isti softverski program kao što je navedeno u odeljku 3.2.2. tabela 4 u Eksperimentalnom delu.

Obrada dobijenih rezultata obavljena je na isti način kao i za optimalne MS uslove i matematički modeli su procenjeni korišćenjem istih statističkih parametara. U tabeli 9 prikazani su koeficijenti i statistički parametri dobijenih matematičkih modela

**Tabela 9.** Koeficijenti i statistički parametri matematičkih modela za optimalne hromatografske uslove

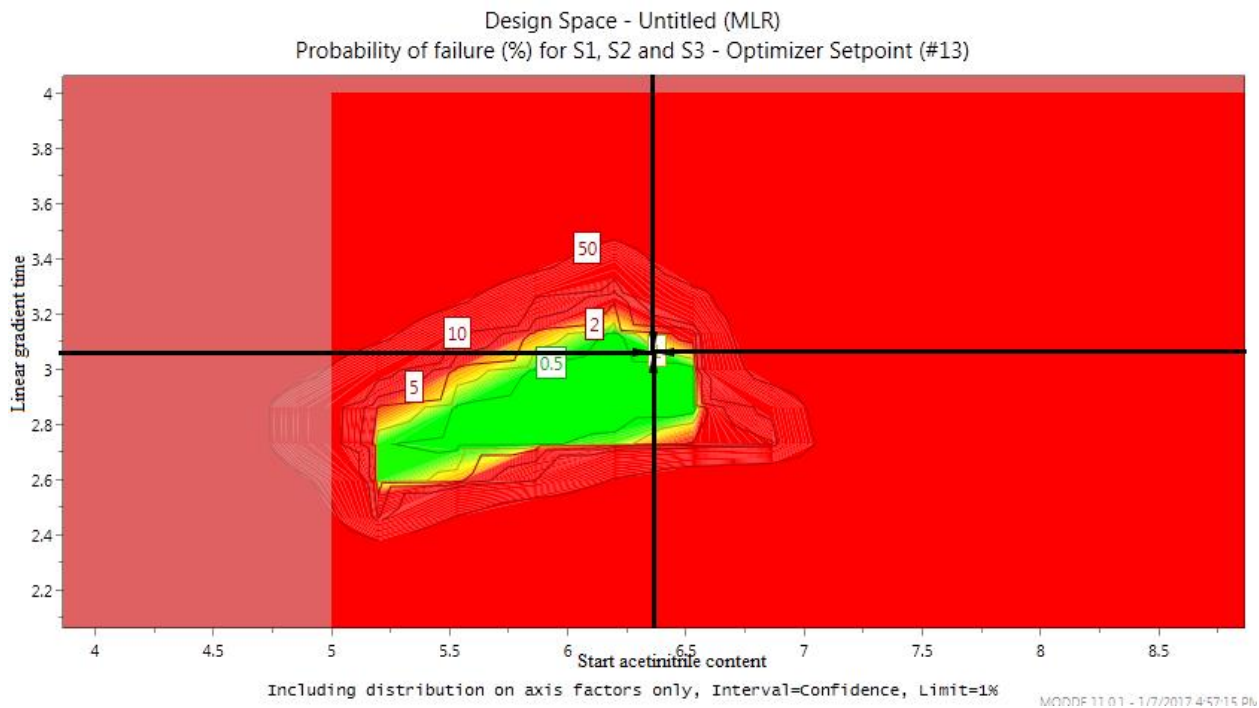
<b>s1</b>	<b>Koeficijent</b>	<b>Standarda greška</b>	<b>p-vrednost</b>	<b>Interval pouzdanosti</b>
Konstanta	0,0790244	0,00146532	1,40426e-05	0,00466333
<b>A</b>	-0,000602129	0,00124229	0,066108	0,00395353
<b>B</b>	-0,00310214	0,00124229	0,00879293	0,00395353
<b>C</b>	-0,0268521	0,00124229	0,000216702	0,00395353
<b>A<sup>2</sup></b>	-0,0494589	0,00255358	0,000300633	0,00812669
<b>B<sup>2</sup></b>	-0,0269588	0,00255358	0,00181537	0,00812669
<b>C<sup>2</sup></b>	0,0167912	0,00255358	0,00715568	0,00812669
<b>A*B</b>	-0,0232317	0,00130689	0,00038817	0,00415914
<b>A*C</b>	-0,0119817	0,00130689	0,00274372	0,00415914
<b>B*C</b>	-0,00448172	0,00130689	0,0415596	0,00415914
Q <sup>2</sup> - 0,844, R <sup>2</sup> - 0,998 R <sup>2</sup> adj.-0,992 Lack of fit- 0,447 Interval pouzdanosti – 0,95				
<b>s2</b>	<b>Koeficijent</b>	<b>Standarda greška</b>	<b>p-vrednost</b>	<b>Interval pouzdanosti</b>
<b>Constant</b>	0,312439	0,00982306	6,82924e-05	0,0312616
<b>A</b>	0,00916159	0,00832791	0,0351643	0,0265033
<b>B</b>	0,0891615	0,00832791	0,00174209	0,0265033
<b>C</b>	-0,0208384	0,00832791	0,0875339	0,0265033
<b>A*C</b>	-0,0281708	0,00876102	0,0487523	0,0278816
Q <sup>2</sup> - 0,947, R <sup>2</sup> - 0,998 R <sup>2</sup> adj.-0,989 Lack of fit- 0,893 Interval pouzdanosti – 0,95				
<b>s3</b>	<b>Koeficijent</b>	<b>Standarda greška</b>	<b>p-vrednost</b>	<b>Interval pouzdanosti</b>
<b>Constant</b>	0,456098	0,00405815	1,55295e-06	0,0129149
<b>A</b>	0,00759147	0,00344046	0,0114472	0,0109491
<b>B</b>	0,0850914	0,00344046	0,000144915	0,0109491
<b>C</b>	-0,0549085	0,00344046	0,000534931	0,0109491

<b>A<sup>2</sup></b>	-0,245335	0,00707205	5,26658e-05	0,0225066
<b>C<sup>2</sup></b>	0,134665	0,00707205	0,000316265	0,0225065
<b>A*B</b>	-0,0554269	0,00361939	0,000604768	0,0115186
<b>A*C</b>	-0,0354269	0,00361939	0,00226618	0,0115186
<b>B*C</b>	-0,0279269	0,00361939	0,00452535	0,0115186
Q <sup>2</sup> - 0,833, R <sup>2</sup> - 0,999 R <sup>2</sup> adj.-0,996				
Lack of fit- 0,201				
Interval pouzdanosti- 0.95				

R<sup>2</sup> – koeficijent determinacije; R<sup>2</sup> adj. – prilagođeni koeficijent determinacije; Q<sup>2</sup> – koeficijent predikcije. A-početni sadržaj acetonitrila; B-završni sadržaj acetonitrila; C-vreme trajanja lineranog dela gradijenta

Na osnovu p-vrednosti i vrednosti koeficijenta modela može se zaključiti o uticaju faktora na ispitivane odgovore, a na praćene odgovore  $s_1$ ,  $s_2$ ,  $s_3$  uticali su svi ispitivani CPPs. p-vrednosti manje od 0,05 ukazuju da faktor ima značajan uticaj na ispitivani odgovor. Takođe, najveća vrednost koeficijenta znači da ovaj faktor ima najveći uticaj na posmatrane odgovore. *Lack of fit* modela takođe nije značajan. MODR je kreiran Monte Karlo simulacijama korišćenjem softvera MODDE 12 Pro, na isti način kao i za procenu optimalnih MS uslova prikazanih u delu 3.2.1. Optimalna tačka izabrana je u okviru MODR regiona korišćenjem alata Optimizer (u pomenutom softverskom programu) i postavljanjem ciljnih vrednosti za  $s_1$ ,  $s_2$  i  $s_3$  na 0,06, 0,35 i 0,40.

Na slici 10 prikazan je DS/MODR.

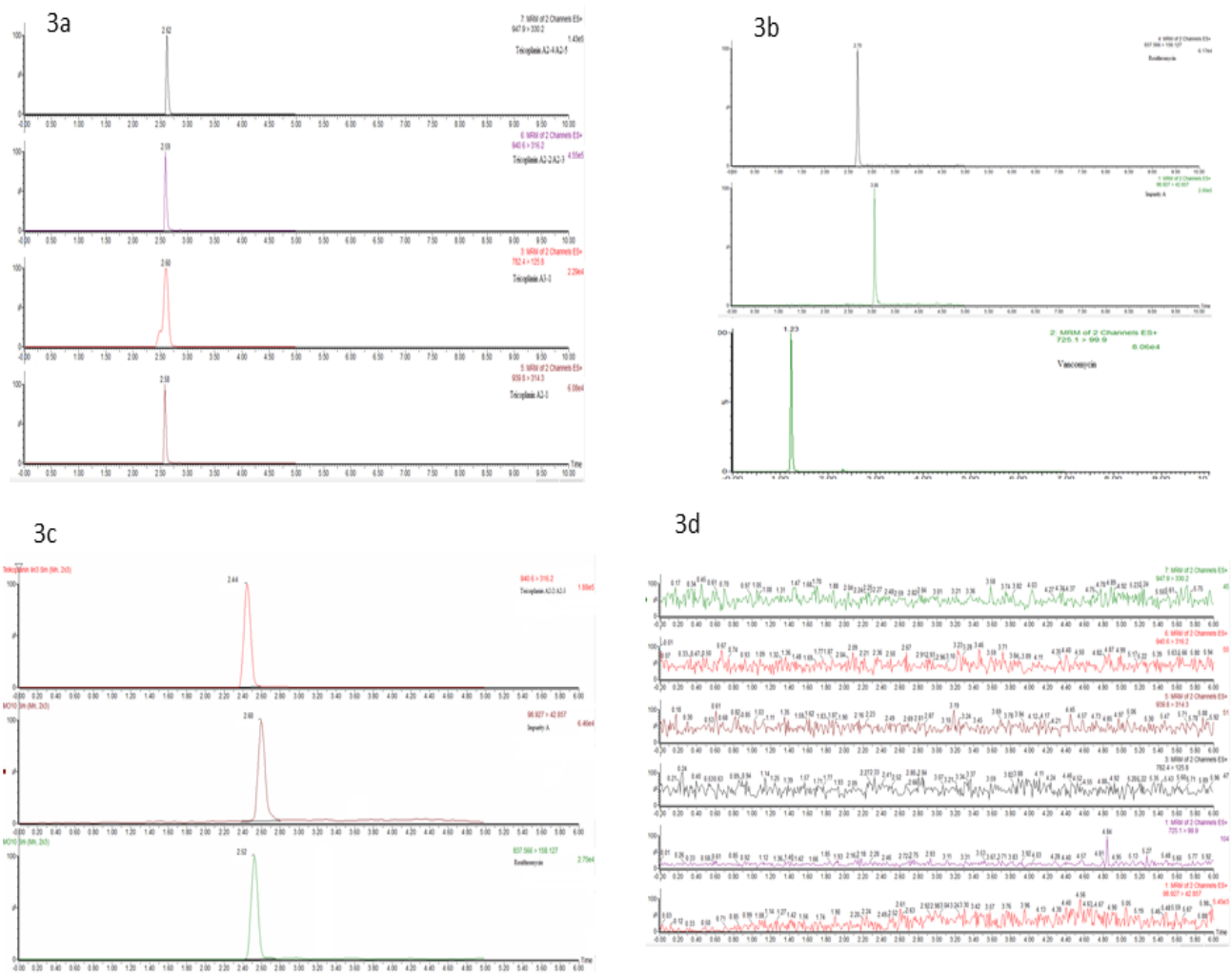


**Slika 10.** Dizajn prostora za ispitivane hromatografske parametre

Prema prethodno navedenim ciljnim vrednostima faktora separacije, definisani optimalni hromatografski uslovi su sledeći: 6,5% (v/v) početni sadržaj acetonitrila, 95,8% (v/v) završni sadržaj acetonitrila i 3,2 minuta vreme trajanja gradijenta.

Definisani optimalni uslovi verifikovani su i dobijeni hromatogrami prikazani su na slici 11 (11a i 11b).

Kako bi analitički problem bio prikazan, hromatogrami kritičnih parova predstavljani su na slici 11c. U ovom slučaju korišćeno je izokratsko eluiranje sa mobilnom fazom sastavljenom od 70% (v/v) acetonitrila i 30% (v/v) vode sa 0,1% mravlje kiseline.



**Slika 11.** Hromatogrami svih šest oblika teikoplanina pod optimalnim hromatografskim uslovima u MRM režimu (11a); hromatogrami vankomicina, nečistoće A i roksitromicina pod optimalnim hromatografskim uslovima (11b); hromatogrami teikoplanina A2-2/A2-3, nečistoće A i roksitromicina pod navedenim izokratskim uslovima (11c); hromatogrami “čistih“ (eng. *blank*) uzoraka u cilju potvrde selektivnosti (11d)

#### 4.1.3 Validacija UHPLC-MS/MS metode

Poslednji korak ovog dela doktorske disertacije bio je validacija razvijene UHPLC-MS/MS metode. Proces validacije podrazumevao je procenu selektivnosti, linearnosti, tačnosti i preciznosti, kao i određivanje limita detekcije (LOD) i limita kvantifikacije (LOQ) za nečistoću A.

Najpre je ispitana selektivnost metode. Pokazano je da nema interferirajućih pikova na retencionim vremenima ispitivanih supstanci i nečistoće A. Slika 11d pokazuje hromatograme “čistih“ (*blank*) uzoraka gde se jasno može videti da interferencija nema.

Za konstrukciju kalibracionih krivi primenjen je metod najmanjih kvadrata uz korišćenje odnos površine pika analita i internog standarda kao factor merenja (eng. *weighting factor*).

Regresioni faktori bili su u okviru kriterijuma prihvatljivosti ( $r > 0,99$  za aktivne supstance,  $r > 0,98$  za nečistoće) [61,62]. *Recovery* vrednosti praćene za procenu tačnosti nalaze se u granicama prihvatljivosti (98%– 102% za aktivne supstance i 80%– 120% za nečistoće). Takođe, dobijene RSD vrednosti za procenu *intra i inter-day* preciznosti ispunjavanju postavljene kriterijume ( $RSD \leq 2\%$  za aktivne supstance,  $RSD \leq 15\%$  za nečistoće). Vrednosti LOD i LOQ su eksperimentalno definisane za nečistoću A. Rezultati ispitivanih parametara validacije prikazani su u tabeli 10.

	<b>Teikoplanin A 3-1</b>	<b>Teikoplanin A 2-1</b>	<b>Teikoplanin A 2-2/A 2-3</b>	<b>Teikoplanin A 2-4/A 2-5</b>	<b>Vankomycin</b>	<b>Nečistoća A</b>
<b>LOD</b> (ng mL <sup>-1</sup> )						0,15
<b>LOQ</b> (ng mL <sup>-1</sup> )						0,25
<b>Linearnost</b>						
Opseg koncentracije (µg mL <sup>-1</sup> )	0,58–8,78	0,37–5,48	3,01–45,15	1,04 – 15,60	0,50-10,00	0,25-5,00
<i>A</i>	0,1838	0,4945	0,5143	0,5365	0,4839	0,6158
<i>B</i>	0,3812	0,8301	0,2492	0,0481	-0,3731	0,0472
<i>R</i>	0,993	0,998	0,997	0,998	0,992	0,994
<b>Preciznost</b>						
Srednja koncentracija (µg mL <sup>-1</sup> )	2,93	1,82	15,05	5,20	5,20	2,00
<i>RSD</i> (%)	1,94	2,00	1,70	1,99	1,78	1,76
<b>Tačnosti</b>						
Niska koncentracija (µg mL <sup>-1</sup> )	2,34	1,46	12,04	4,16	4,00	1,60
<i>Recovery</i> (%)	100,74	98,89	99,75	98,2	98,88	100,66
Srednja koncentracija (µg mL <sup>-1</sup> )	2,93	1,82	15,05	5,20	5,00	2,00
<i>Recovery</i> (%)	101,70	100,20	99,42	99,48	100,30	100,78
Visoka koncentracija (µg mL <sup>-1</sup> )	3,51	2,19	18,06	6,24	6,00	2,40
<i>Recovery</i> (%)	99,94	99,45	99,57	98,86	98,43	99,13

**Table 10.** Vrednosti parametara validacije

*a* – nagib, *b* – odsečak na ordinati, *r* – koeficijent korelacije

Konačno, razvijena i validirana UHPLC-MS/MS metoda primenjena je na odgovarajuće farmaceutske dozne oblike (Targocid® 400 mg prašak za rastvor za injekcije/infuziju ili oralni rastvor koji sadrži 400 mg teikoplanina; Vankomicin-MIP 1 g, prašak za rastvor za infuziju koji sadrži 1 g vankomicina). Određeni sadržaj vankomicina bio je 99,02%, a ukupnog teikoplanina 98,56%.

#### 4.1.4. Studije forsirane degradacije

U ovoj studiji praćen je stepen degradacije ispitivanih glikopeptidnih antibiotika u stres uslovima pomoću razvijene i validirane UHPLC-MS/MS metode. Studije forsirane degradacije sprovedene su pod stres agensima propisani u ICH Q1(R2) smernicama [63]; kiselina, baza, voda, oksidativni agens, toplota i svetlost.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su glavne komponente teikoplanina i vankomicina nestabilne u kiselim i baznim uslovima. Utvrđeno je da su vodeni rastvori ispitivanih lekova stabilni u neutralnim uslovima i nivo razgradnje posle 48 h bio je manji od 5%. Oksidacioni agens 3%, 15% i 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nije pokazao značajnu degradaciju teikoplanina, ali to nije bio slučaj sa vankomicinom. Slabiji oksidativni agens je izazvao značajnu degradaciju vankomicina. Vodeni rastvori vankomicina i teikoplanina bili su izloženi sunčevoj svetlosti tokom 24 h i 48 h sa stepenom razgradnje manjim od 5%. Ovi rezultati ukazuju na fotostabilnost ispitivanih lekova. Na kraju studija stabilnosti ispitan je uticaj toplote na stabilnost glikopeptidnih antibiotika. Teikoplanin se degradirao na povišenoj temperaturi i primećeno je da se oko 20% dva najzastupljenija oblika vodenog rastvora teikoplanina razgradi zagrevanjem na 60 °C tokom 3h. Vankomicin je pokazao stabilnost na povišenoj temperaturi.

Primenljivost metode je potvrđena i kroz njenu sposobnost praćenja ponašanja vankomicina i teikoplanina u stres uslovima.



## 4.2. Optimizacija hromatografskog razdvajanje izomera teikoplanina i vankomicina u UHPLC-MS/MS sistemu – u uzorcima humane plazme

Vankomicin i teikoplanin primenjuju se u terapiji teških infekcija izazvanih gram pozitivnim, multirezistentnim bakterijama. Značaj u terapiji, kao i ozbiljni neželjeni efekti koji se mogu javiti usled njihove primene (nefrotoksičnost i ototoksičnost) zahtevaju primenu visokoosetljive metode u cilju praćenja njihove kinetike u organizmu [64- 65] .

Drugi deo doktorske disertacije posvećen je postavljenju nove UHPLC-MS/MS metode za analizu vankomicina i šest oblika teikoplanina u uzorcima humane plazme. AQbD koncept implementiran je kroz nekoliko tačno definisanih faza, u okviru kojih je, u cilju preciznog definisanja hromatografskog optimuma, primenjen hemometrijski pristup.

Implementacija AQbD pristupa omogućila je razvoj brze, pouzdane hromatografske metode, čime je omogućena precizna i pouzdana bioanalitika pomenutih antibiotika. Takođe, precizno i brzo određivanje koncentracije ove grupe izuzetno značajnih antibiotika u humanoj plazmi znatno će unaprediti bezbednost i efikasnost njihove primene.

### 4.2.1. Optimizacija parametara masenog spektrometra

Prvi korak drugog dela doktorske disertacije podrazumevao je definisanje optimalnih uslova masenog spektrometra. U odeljku 4.1.1. detaljno su objašnjeni razlozi izbora pozitivne ESI metode jonizacije. ESI predstavlja najbolji izbor u slučaju polarnih i jedinjenja visoke molekulske mase. Molekuli kompleksne strukture koji imaju više potencijalnih jonizujućih mesta u ESI izvoru jonizuju kao višestruko naelektrisani joni što je bio slučaj sa vankomicinom i teikoplaninom.

Takođe, u odeljku 4.1.1. objašnjeno je da vankomicin i teikoplanin jonizuju kao joni sa dvostrukim naelektrisanjem  $[M+2H]^{2+}$  dok roksitromicin (primenjen kao interni standard) jonizuje kao jednostruko naelektrisani joni  $[M+H]^{1+}$ . Takođe, teikoplanin A2-2/A2-3 (izomeri 1) i teikoplanin A2-4/A2-5 (izomeri 2) su parovi izomera sa istim obrascem fragmentacije, jonizacije i hromatografskim ponašanjem. Stoga su upravo pomenuti parovi izomera praćeni kao dva pika.

Pošto je kao uzorak korišćena humana plazma, u sledećem koraku definisani su dominantni fragmentni joni najvećeg intenziteta jonskog odgovora kao i optimalne vrednosti napona konusa i kolizione energije.

U ovom delu doktorske disertacije za definisanje optimalnih vrednosti značajnih MS parametara svakog fragmentnog jona, korišćena je *IntelliStart* softverska opcija u MRM

režimu. Fragmentni joni ispitivanih analita i internog standarda praćeni su u MRM režimu. Fragmentni joni i optimalne vrednosti napona konusa i kolizione energije prikazani su u odeljku 3.5.1. tabela 5 Eksperimentalnog dela.

#### 4.2.2. Optimizacija hromatografskih uslova

Tokom preliminarne faze ispitivanja, odabrana je pogodna stacionarna faza ACQUITY CSH C18. Takođe, unapred su definisane optimalne vrednosti protoka mobilne faze i temperatura kolone koje dalje nisu menjanje tokom izvođenja eksperimenata za optimizaciju hromatografskih uslova.

Pored svih prednosti gradijentnog programa eluiranja koji su navedeni u odeljku 4.1.2 dodatni razlog izbora ovog načina eluiranja je i sama kompleksnost sastava uzoraka humane plazme. Ključni momenat u optimizaciji hromatografskih uslova bile su upravo karakteristike gradijenta programa eluiranja. Kako bi se dobila šira slika hromatografskog ponašanja ispitivanih analita, uzimajući u obzir kompleksnost uzorka, i u ovom delu ispitivanja primenjen je AQB<sup>D</sup> koncept. Detaljni koraci AQB<sup>D</sup> pristupa opisani su u odeljku 1.7. u Uvodnom delu. Već je u odeljku 4.1.2. istaknuto koliko je značajan nagib linarnog gradijenta, pa su iz tog razloga kao CPPs odabrani faktori i njihove opsezi koji imaju uticaj na njega. To su bili identični faktori koji su optimizovani u prvom delu doktorske disertacije, u odeljku 4.1. Uzimajući u obzir da za sprovođenje eksperimenata nije korišćena identična kolona kao kod definisanja optimalnih hromatografskih uslova za ispitivane analite u odgovarajućim farmaceutskim oblicima, kao i kompleksnost sastava uzoraka plazme, nisu dobijeni identični optimalni uslovi nakon završetka ispitivanja.

Početni sadržaj acetonitrila (sadržaj acetonitrile na početku gradijenta), vreme trajanja linearnog gradijenta, i završni sadržaj acetonitrila (sadržaj acetonitrila na kraju linearnog gradijenta) odabrani su kao značajni faktori i definisani njihovi opsezi 5-10% (v/v), 2-4 minuta i 90-100% (v/v).

Istovremeno su definisani CQAs. Uzimajući u obzir da je glavni cilj razvoja metode postizanje najboljeg razdvajanja analita praćenog kratkim trajanjem analize, faktor separacije s između hromatografskih pikova definisani su kao CQAs. Faktor separacije s definisan je kao razlika između vremena početka i vremena završetka prethodnog pika u paru kritičnih pikova. Identifikovani s faktori kao CQAs su sledeći:  $s_1$  – razlika između vremena početka pika roksitromicina i vremena završetka pika vankomicina;  $s_2$  – razlika između vremena početka pika roksitromicina i vremena završetka pika teikoplanina A 2-2/A 2-3;  $s_3$  – razlika između vremena početka pika teikoplanina A 2-2/A 2-3 i vremena završetka pika vankomicina. Teikoplanin A 2-2/ A 2-3 je izabran jer je najzastupljeniji oblik teikoplanina.

Za uspostavljanje matematičke korelacije između CPPs i CQAs primenjena je DoE metodologija. U tu svrhu izabran je *Rechtschaffen* optimizacioni dizajn. Plan eksperimenata i interpretacija rezultata urađeni su u MODDE 12 Pro softverskom programu. Plan eksperimenata definisan *Rechtschaffen* dizajnom sa dobijenim rezultatima za odgovore  $s_1$ ,  $s_2$  i  $s_3$  prikazan je u odeljku 3.5.2 u tabeli 6 u Eksperimentalnom delu.

Da bi se postigli ciljevi optimizacije koji su prethodno pomenuti, ciljne vrednosti za faktore separacije  $s_1$ ,  $s_2$  i  $s_3$  su postavljeni na 1,45, 0,01, 1,30 (redosledom kojim su navedeni).

Sledeći korak bio je kreiranje matematičkih modela. Njihova pogodnost “fitovanja” dobijenih odgovora kao i prediktivne mogućnosti potvrđuju statistički parametri  $R^2$ , Adj.  $R^2$  i  $Q^2$ .

Koeficijenti dobijenih matematičkih modela i vrednosti pomenutih statističkih parametara prikazani su u tabeli 11.

**Table 11.** Koeficijenti dobijenih matematičkih modela i vrednosti statističkih parametara

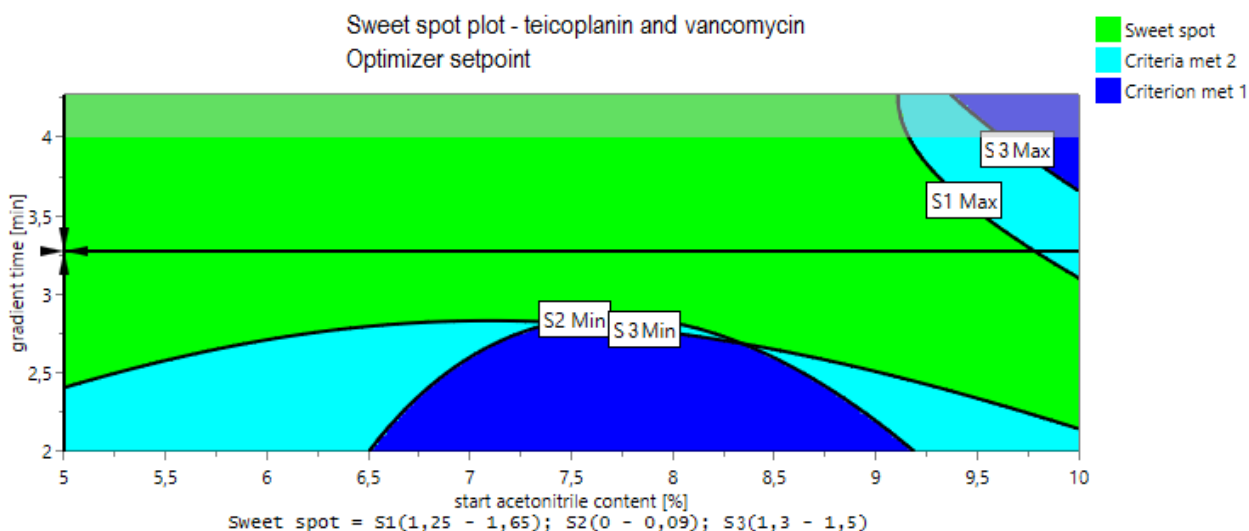
	Koeficijent	Standardna greška	<i>p</i> -vrednost	Interval pouzdanosti
$s_1$				
Konstanta	1,4653	0,0051	9,3850e-008	0,0163
A	0,0463	0,0043	0,0018	0,0138
B	0,1437	0,0043	6,0345e-005	0,0138
C	-0,0387	0,0043	0,0029	0,0138
A <sup>2</sup>	0,1003	0,0085	0,0015	0,0283
B <sup>2</sup>	-0,0572	0,0089	0,0077	0,0283
Q <sup>2</sup> - 0,964, R <sup>2</sup> - 0,998 R <sup>2</sup> adj.-0,994 <i>Lack of fit</i> - 0,702 Interval pouzdanosti- 0,95				
$s_2$				
Konstanta	0,0105	0,0006	0,0004	0,0018
A	-0,0220	0,0005	2,3441e-005	0,0015
B	-0,0020	0,0005	0,0244	0,0015
C	-0,0045	0,0005	0,0026	0,0015
A <sup>2</sup>	0,0408	0,0010	3,2038e-005	0,0032
C <sup>2</sup>	-0,0417	0,0009	3,0112e-005	0,0032
A*B	0,0054	0,0005	0,0018	0,0016
A*C	-0,0321	0,0005	8,8164e-006	0,0016
B*C	-0,0321	0,0005	8,8164e-006	0,0016
Q <sup>2</sup> - 0,941, R <sup>2</sup> - 0,999 R <sup>2</sup> adj.- 0,999 <i>Lack of fit</i> -/ Interval pouzdanosti- 0,95				
$S_3$				
Konstanta	1,3178	0,0028	2,0765e-008	0,0089
A	0,0311	0,0024	0,0009	0,0075
B	0,1186	0,0024	1,7348e-005	0,0075
C	-0,0164	0,0024	0,0060	0,0075
A <sup>2</sup>	0,0794	0,0048	0,00055	0,0154
B <sup>2</sup>	-0,0281	0,0048	0,0102	0,0079
A*B	0,0084	0,0025	0,0435	0,0079
A*C	0,0084	0,0025	0,0435	
Q <sup>2</sup> - 0,941, R <sup>2</sup> - 0,999 R <sup>2</sup> adj.- 0,999 <i>Lack of fit</i> - 0,520 Interval pouzdanosti- 0,95	69			

$R^2$  – koeficijent determinacije;  $R^2$  adj. – prilagođeni koeficijent determinacije;  $Q^2$  – koeficijent predikcije. A-početni sadržaj acetonitrila; B-završni sadržaj acetonitrila; C-vreme trajanja lineranog dela gradijent

Visoke vrednosti parametara  $R^2$  i Adj.  $R^2$  potvrđuju adekvatnost modela da “fituju” ispitivane odgovore, dok parametar  $Q^2$  potvrđuje dobru prediktivnost modela. Vrednosti *lack of fit* za ove modele pokazuju da nisu statistički značajni.

Detaljnijom analizom dobijenih rezultata može se zaključiti da na praćene odgovore  $s_1$ ,  $s_2$ ,  $s_3$  značajan uticaj imaju CPPs što potvrđuju  $p$ -vrednosti niže od 0.05.  $p$ -vrednost niža od 0.05 pokazuje da factor ima statistički značajan uticaj na ispitivani odgovor. Najvišu vrednost ima koeficijent za vreme trajanje linearnog dela gradijenta što pokazuje da je to faktor za najvećim uticajem na sve CQAs. Ovaj rezultat je očekivan jer je za adekvatnu separaciju analita potreban niži nagib linearnog gradijenta.

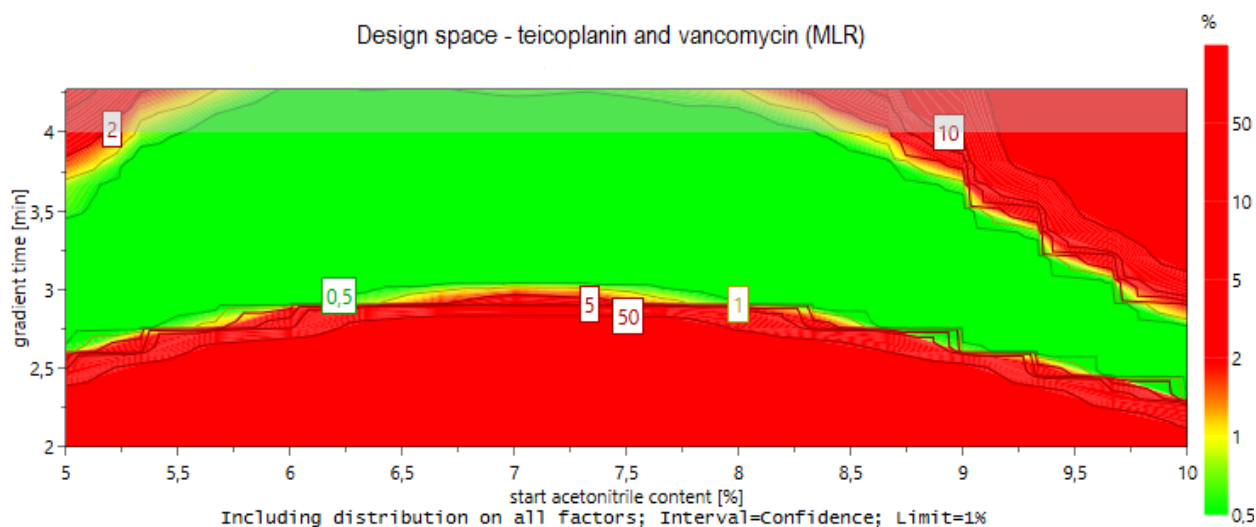
U cilju vizualizacije regiona/prostora u okviru kojeg promene CPPs ne dovode do promene CQAs, konstruisan je *sweet spot plot* grafikom, a koji je prikazan na slici 12.



**Slika 12.** *Sweet spot plot* grafik definisan za vreme trajanja gradijenta i početnog sadržaja acetonitrila pri 94% (v/v) sadržaja acetonitrila na kraju gradijeta

Tamno plava boja na prikazanom grafiku označava region gde je postignut jedan od postavljenih kriterijuma. Svetlo plava boja predstavlja region gde su postignuta dva kriterijuma, dok je zelenom bojom obeležen region sa postignutim svim kriterijumima. Zapravo, to je površina gde CPPs nemaju uticaja na CQAs. Kako bismo dobili potvrdu o robustnosti odgovora u pomenutom regionu, pristupljeno je konstrukciji DS/MODR koji je prikazan na slici 13.

Definicija kao i detaljno objašnjenje DS/MODR dato je već u prvom delu doktorske disertacije, odeljak 4.1.2.



**Slika 13.** Grafik prostora dizajna definisan za vreme trajanja gradijenta i početnog sadržaja acetonitrila pri 94% (v/v) sadržaja acetonitrila na kraju gradijeta

Na samom kraju, korišćenjem već pomenute softverske opcije Optimizer (MassLynx softver), definisana je optimalna tačka sa sledećim CPPs vrednostima: početni sadržaj acetonitrila 5% (v/v), završni sadržaj acetonitrila 94,0% (v/v) i vreme trajanja linearnog gradijenta 3,10 minuta.

Definisani optimalni hromatografski uslovi potvrđeni su i ekperimentalno.

### 4.3. Razvoj metode pripreme uzoraka plazme

Prvi korak u razvoju metode za pripremu uzorka bio je odabir metode pripreme.

Odabrana je metoda precipitacije proteina. Metoda precipitacije proteina je jednostavna metoda koja podrazumeva uklanjanje proteina iz uzorka njihovom denaturacijom odgovarajućim organskim rastvaračem. Spada u jednostavnu, troškovno isplativu, efikasnu i vremenski ne mnogo zahtevnu metodu. Tokom preliminarne faze ispitivanja, ova metoda je pokazala dobre rezultate stepena čistoće ekstrakta, pa je to bio dodatni razlog zašto je odabrana upravo ova metoda pripreme uzorka za dalji razvoj.

Takođe, precipitacija proteina bila je metoda izbora u publikovanim radovima gde su vankomicin ili teikoplanin određivani u uzorcima plazme ili seruma. [31-33].

Nakon preliminarne faze ispitivanja i odabira metode, pristupljeno je određivanju optimalnih uslova pripreme uzorka i minimizaciji efekta matriksa. U tom cilju, i u ovom koraku primenjena je DoE metodologija, i to prvi put u pripremi uzoraka plazme za bioanalitiku ispitivanih jedinjenja.

Preliminarnim ispitivanjem moglo se utvrditi koji to faktori imaju značajan uticaj na sam postupak pripreme uzorka. A da bi na adekvatan način bio procenjen njihov uticaj odabran je *D-optimal* dizajn. Prednosti *D-optimal* dizajna ogledaju se u tome što omogućava procenu utucaja ne samo kvalitativnih, već i kvantitativnih faktora.

Kao što je već pomenuto, tokom preliminarne faze ispitivanja odabrani su kvantitativni faktori koje treba dalje ispitati i to: sadržaj mravlje kiseline u uzorku (%), vreme centrifugiranja (min), vreme mešanja na *Vortex* aparatu (min). Kao kvalitativni faktor ispitivan je organski rastvarač (metanol ili acetonitril). Ostali faktori kao što je zapremina precipitirajućeg agensa i brzina centrifugiranja nisu pokazali značajan uticaj te je njihova vrednost tokom ispitivanja bila konstantna.

Za kreiranje matrice eksperimenata *D-optimal* dizajna korišćen je Design Expert 10.0 softverski program, dok su kao odgovori tokom eksperimenta praćeni odnos intenziteti jonskog odgovora ispitivanog analita u vodenom rastvoru i uzorku.

Experimentalni plan i vrednosti dobijenih odgovora prikazani su u odeljku 3.5.3 tabela 7 Eksperimentalnog dela.

Nakon izvođenje eksperimenata pristupljeno je detaljnoj analizi dobijenih podataka. Uspostavljenjem matematičke korelacije između ispitivanih faktora (varijabli) i praćenih odgovora dobijeni su matematički modeli. Koeficijenti matematičkih modela i vrednosti statističkih parametara prikazani su u tabeli 12.

**Table 12.** Koeficijenti matematičkih modela i vrednosti statističkih parametara model

	Koeficijent	Standardna greška	p-vrednost	95% interval pouzdanosti	95% interval pouzdanosti
<b>Vankomicin</b>					
Konstanta	64,73	2,00		60,27	69,20
A	7,36	1,03	< 0,0001	5,07	9,65
B	3,53	1,06	0,0078	1,16	5,90
C	5,23	1,06	0,0006	2,86	7,60
D	-4,10	0,88	0,0009	-6,06	-2,14
A*B	-2,77	1,15	0,0373	-5,34	-0,20
A*C	-4,06	1,26	0,0092	-6,87	-1,25
A*D	3,94	1,02	0,0032	1,66	6,22
B*C	3,23	1,38	0,0413	0,15	6,31
B*D	6,06	1,07	0,0002	3,68	8,44
C*D	-4,01	1,05	0,0034	-6,36	-1,67
A <sup>2</sup>	-9,59	2,72	0,0055	-15,65	-3,53
C <sup>2</sup>	-0,76	1,74	0,0019	-11,5	-3,38
R <sup>2</sup> – 0,96, adj.R <sup>2</sup> - 0,91, Q <sup>2</sup> - 0,59, Lack of fit – 0,0011					
<b>Teikoplanin</b>					
Konstanta	49,56	2,89		43,11	56,01
C	3,62	1,54	0,0401	0,20	7,04
D	-15,32	1,27	< 0,0001	-18,16	-12,49
A*D	-4,52	1,48	0,0122	-7,82	-1,22
B*D	4,75	1,54	0,0117	1,31	8,19
R <sup>2</sup> – 0,95, adj.R <sup>2</sup> - 0,89, Q <sup>2</sup> - 0,51, Lack of fit – 0,0179					

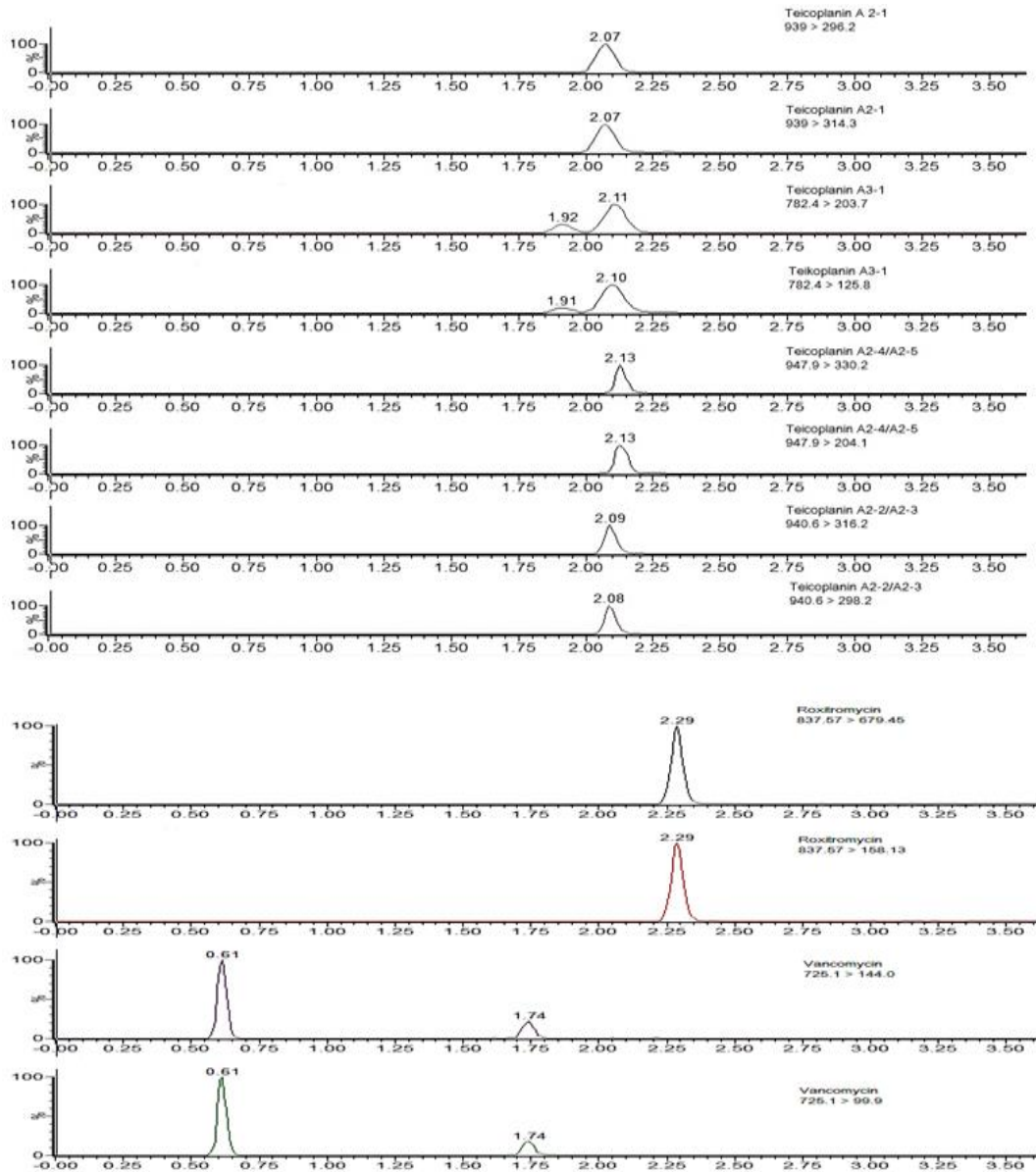
R<sup>2</sup> – koeficijent determinacije; R<sup>2</sup> – prilagođeni koeficijent determinacije; Q<sup>2</sup> – koeficijent predikcije; A-sadržaj mravlje kiseline (%), B-vreme centrifugiranja (min), C-vreme mešanja na Vorteks aparatu (min), D-precipitirajući agens (metanol-MeOH ili acetonitril-ACN)



Visoke vrednosti statističkih parametara  $R^2$ , Adj.  $R^2$ ,  $Q^2$  pokazatelj su adekvatnog “fitovanja” ispitivanih faktora i praćenih odgovora kao dobre prediktivnosti modela. Vrednosti parametra lack of fit za sve modele nisu statistički značajne,

Analizom dobijenih rezultata može se zaključiti da na odnos intenziteta jonskog odgovora vankomicina u uzorku plazme i vodenom rastvoru značajan uticaj imaju sva četiri ispitivana faktora. Vrednosti koeficijenata modela pokazuje da sadržaj mravlje kiseline u uzorku ima najveći uticaj na praćeni odgovor. U slučaju teikoplanina, na praćeni odgovor značajan uticaj imali su vreme mešanja na Vorteksu i tip precipitirajućeg agensa.

Poslednji korak u određivanju optimalnih uslova metode pripreme uzorka bio je odabir optimalne tačke koja je definisana sledećim vrednostima ispitivanih faktora: 0,11% sadržaj mravlje kiseline, 4,0 min vreme mešanja na Vorteksu, 13 minuta vreme centrifugiranja i acetonitril kao precipitirajući agens. Optimalna tačka verifikovana je pod prethodno definisanim optimalnim hromatografskim uslovima. Dobijeni hromatogrami predstavljeni su na slici 14.



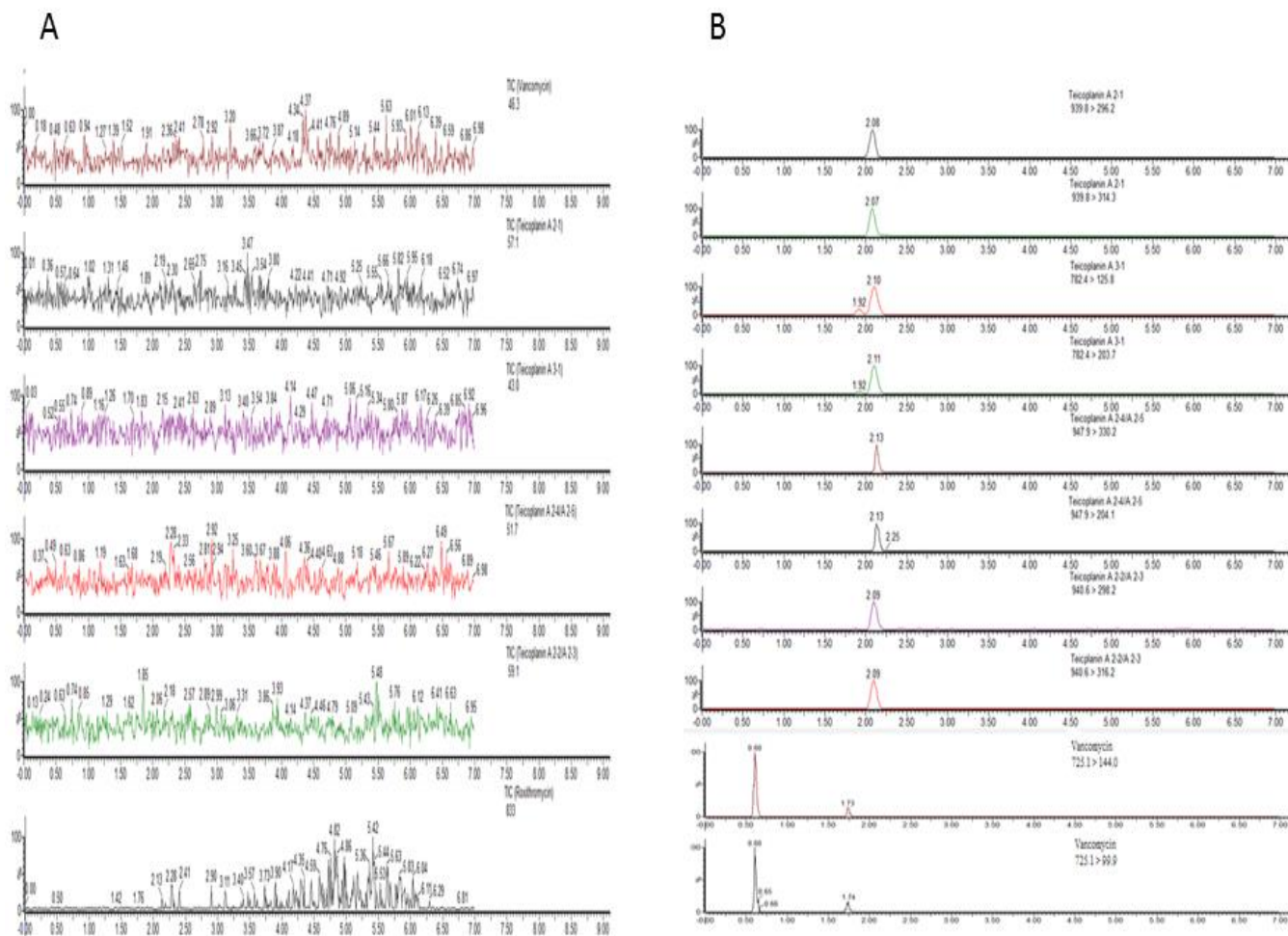
**Slika 14.** Hromatogrami šest komponenata teikoplanina, vakomicina i roksitromicina (interni standard) pod optimalnim hromatogramskim uslovima

#### 4.4. Validacija UHPLC-MS/MS metode

Optimizirana UHPLC-MS/MS metoda uspešno je validirana ispitivanjem parametara validacije u skladu sa FDA smernicama za validaciju bioanalitičkih metoda [53].

Hromatogrami *blank* plazme pokazuju da na retencionim vremenima ispitivanih analita i internog standarda nije bilo endogenih interferencija. Takođe, za ispitivane analite određene su vrednosti LOD i LOQ.

Hromatogrami *blank* plazme prikazani su na slici 15 (A) dok su hromatogrami vankomicina i svih šest komponenata teikoplanina na LOQ koncentraciji prikazani na slici 15 (B).



**Slika 15.** Hromatogrami *blank* plazme (A) i hromatogrami vankomicina i svih šest komponenta teikoplanina na LOQ koncentraciji (B)

RSD QC uzoraka za procenu *intra-day* i *inter-day* preciznosti bila je ispod 15%, dok je tačnost bila u skladu sa postavljenim kriterijumom 85–115%.

Kalibracione krive konstruisane su primenom metode najmanjih kvadrata, dok je kao faktor merenja (eng. *weighting factor*) korišćen odnos površine pika dominantnijeg fragmenta analita i internog standarda. Koeficijenti determinacije ( $r^2$ ) bili su iznad 0,99. Opseg linearnosti obuhvatio je terapijske opsege ispitivanih antibiotika kako bi ova UHPLC-MS/MS metoda mogla da se primenjuje za praćenje njihove koncentracije u uzorcima plazme pacijenata.

Efekat matriksa bio je manji od 25% što pokazuje da matriks nema značajan uticaj na intenzitet jonskog signala. *Recovery* vrednost za svaku komponentu teikoplanina nalazi se u opsegu između 74,7% i 85,7% dok je za vankomicin između 85,6% i 89,6%. Rezultati kratkoročne, dugoročne i *freeze-thaw* stabilnosti pokazali su neznačajan stepen degradacije ispitivanih analita.

Parametri validacije predstavljeni su u tabeli 13, dok su rezultati ispitivanja stabilnosti prikazani u tabeli 14.

**Tabela 13.** Vrednosti parametara validacije

	<b>Teikoplanin A 3-1</b>	<b>Teikoplani n A 2-1</b>	<b>Teikoplanin A 2-2/A 2-3</b>	<b>Teikoplanin A 2-4/A 2-5</b>	<b>Vankomicin</b>
<b>LOD</b>					
( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0,09	0,07	0,08	0,04	0,02
<b>LOQ</b>					
( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0,12	0,18	0,15	0,1	0,05
<b>Linearnost</b>					
Opseg koncentracije ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0,12–23,4	0,18–14,6	0,15–120,4	0,1 – 41,6	0,05 – 10,0
<i>A</i>	0,0373	0,045	0,0384	0,0386	0,1687
<i>B</i>	-0,0006	-0,0014	-0,0303	-0,0172	-0,0063
<i>R</i>	0,997	0,998	0,995	0,991	0,990
<b><i>Intra-day preciznost (RSD (%))</i></b>					
LOQ	13,3	12,9	13,8	14,1	10,1
Srednja koncentracija	8,4	11,3	7,3	9,4	2,2
Visoka koncentracija	2,6	4,3	2,4	3,1	2,3
<b><i>Inter-day preciznost (RSD (%))</i></b>					
LOQ	14,1	10,1	13,8	10,2	11,1
Srednja koncentracija	9,5	7,3	5,1	6,5	3,3
Visoka koncentracija	2,9	5,8	2,8	4,1	2,3
<b><i>Intra-day tačnost (Srednja tačnost (%))</i></b>					
LOQ	87,9	95,8	94,3	91,5	103,4
Srednja koncentracija	96,3	102,5	106,5	107,1	110,3
Visoka koncentracija	98,2	94,6	92,5	105,5	94,3

<b>Inter-day tačnost (Srednja tačnost (%))</b>					
LOQ	89,6	97,2	93,2	98,3	95,7
Srednja koncentracija	90,3	102,5	108,3	97,15	105,6
Visoka koncentracija	92,3	95,2	91,1	93,1	92,4
<b>Recovery (%)</b>					
LOQ	78,5	74,7	79,8	80,7	85,6
Srednja koncentracija	79,5	75,3	82,5	79,9	88,4
Visoka koncentracija	85,7	80,2	80,6	82,3	89,6
<b>Efekat matriksa (%)</b>					
LOQ	25,0	24,9	23,5	22,7	20,1
Srednja koncentracija	22,6	20,3	22,2	23,2	15,3
Visoka koncentracija	23,5	24,5	22,6	21,5	17,3

$a$  – nagib,  $b$  – odsečak na ordinati,  $r$  – koeficijent korelacije

**Table 14.** Stabilnost teikoplanina i vankomicina pod različitim uslovima čuvanja; kratkoročna (short-term) stabilnost, dugoročna (long-term) stabilnost i *freeze-thaw* stabilnost

Analit	c ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Short term (%)	RSD (%)	Long term (%)	RSD (%)	Freeze-thaw (%)	RSD (%)
Teikoplanin A 3-1	0,12	98,1	11,2	96,5	10,4	100,2	5,1
	23,4	96,3	3,2	94,3	2,1	105,3	2,4
Teikoplanin A 2-1	0,18	97,1	4,1	90,2	5,6	101,2	1,8
	14,6	94,5	1,5	91,2	4,3	99,7	5,3
Teikoplanin A 2-2/2-3	0,15	105,2	7,3	95,6	11,3	102,3	8,4
	120,4	103,2	1,1	93,5	4,1	98,6	2,8
Teikoplanin A 2-4/2-5	0,1	94,2	8,7	90,2	2,3	97,6	7,6
	41,6	108,6	2,0	99,5	6,2	99,8	1,1
Vankomicin	0,05	105,3	10,4	98,6	3,1	103,2	3,0
	10,0	102,6	2,6	97,5	5,0	101,6	5,2

#### 4.5. Primena validirane UHPLC-MS/MS metode na uzorcima humane plazme

Validirana UHPLC-MS/MS metoda uspešno je primenjena za analizu uzoraka plazme koji su dobijeni od 10 pacijenata (uzrasta od 18 do 60 godina) obolelih od MDR bakterijske infekcije. Među njima bilo je i pacijenata sa narušenom funkcijom bubrega. Pacijenti su bili podeljeni u dve grupe, 5 pacijenata koji su bili na terapiji vankomicinom i 5 pacijenata koji su bili na terapiji teikoplaninom. Uzorci plazme bili su uzorkovani 4 puta u toku dana nakon primene doze održavanja (vankomicin - 30min, 2h, 6h nakon primene doze i neposredno pre primene sledeće doze; teikoplanin – 2h, 6h, 12h nakon primene doze i neposredno pre primene sledeće doze)

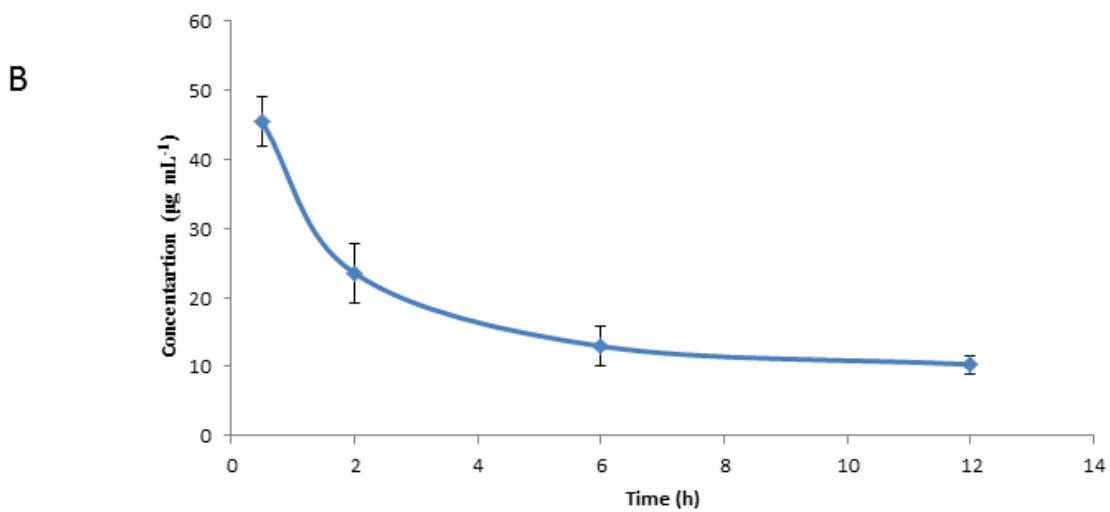
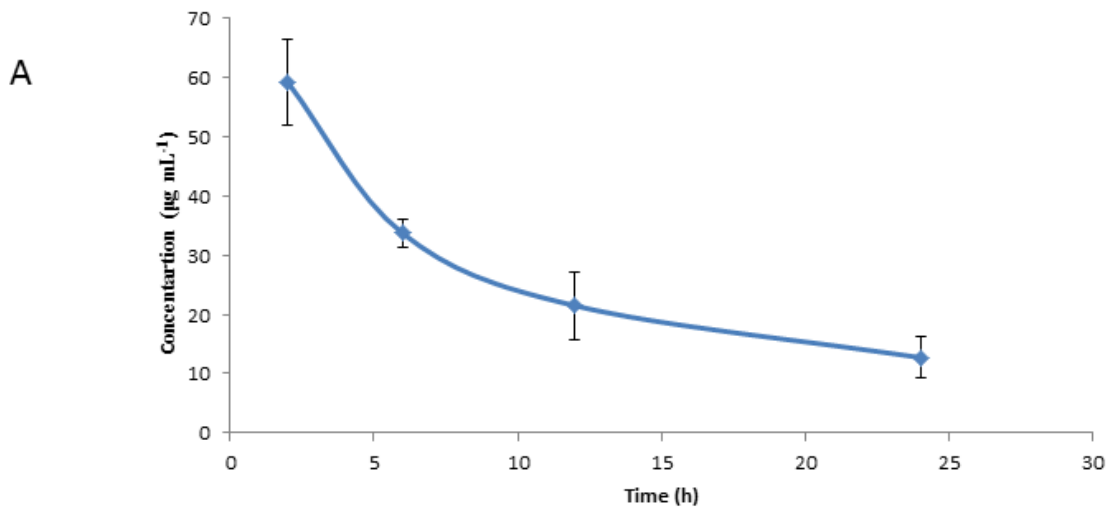
Doza održavanja teikoplanina (400 mg) primenjivana je jednom dnevno u obliku intravenske infuzije u trajanju od 30min, a doza održavanja vankomicina na svakih 12h u obliku intravenske infuzije u trajanju od 60min za pacijente sa očuvanom funkcijom bubrega. Pacijenti koji su imali narušenu funkciju bubrega doza održavanja bila je prilagođena.

Maksimalna koncentracija ukupnog teikoplanina bila je  $59,24 \pm 7,34 \mu\text{g mL}^{-1}$  dok je minimalna koncentracija bila  $12,74 \pm 3,46 \mu\text{g mL}^{-1}$  (srednje vrednosti koncentracije nakon 6h i 12h primene doze bile su  $33,70 \pm 2,33 \mu\text{g mL}^{-1}$  (nakon 6h) i  $21,48 \pm 5,66 \mu\text{g mL}^{-1}$  (nakon 12h)). Najviša koncentracija vankomicina u plazmi bila je  $45,46 \pm 3,63$ , dok je najniža bila  $10,02 \pm 1,31 \mu\text{g mL}^{-1}$  (srednja vrednost koncentracije nakon 2h bila je  $23,54 \pm 4,33 \mu\text{g mL}^{-1}$ , a nakon 6h  $12,97 \pm 2,82 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Vrednosti koncentracije ispitivanih antibiotika bile su u okviru terapijskog opsega.

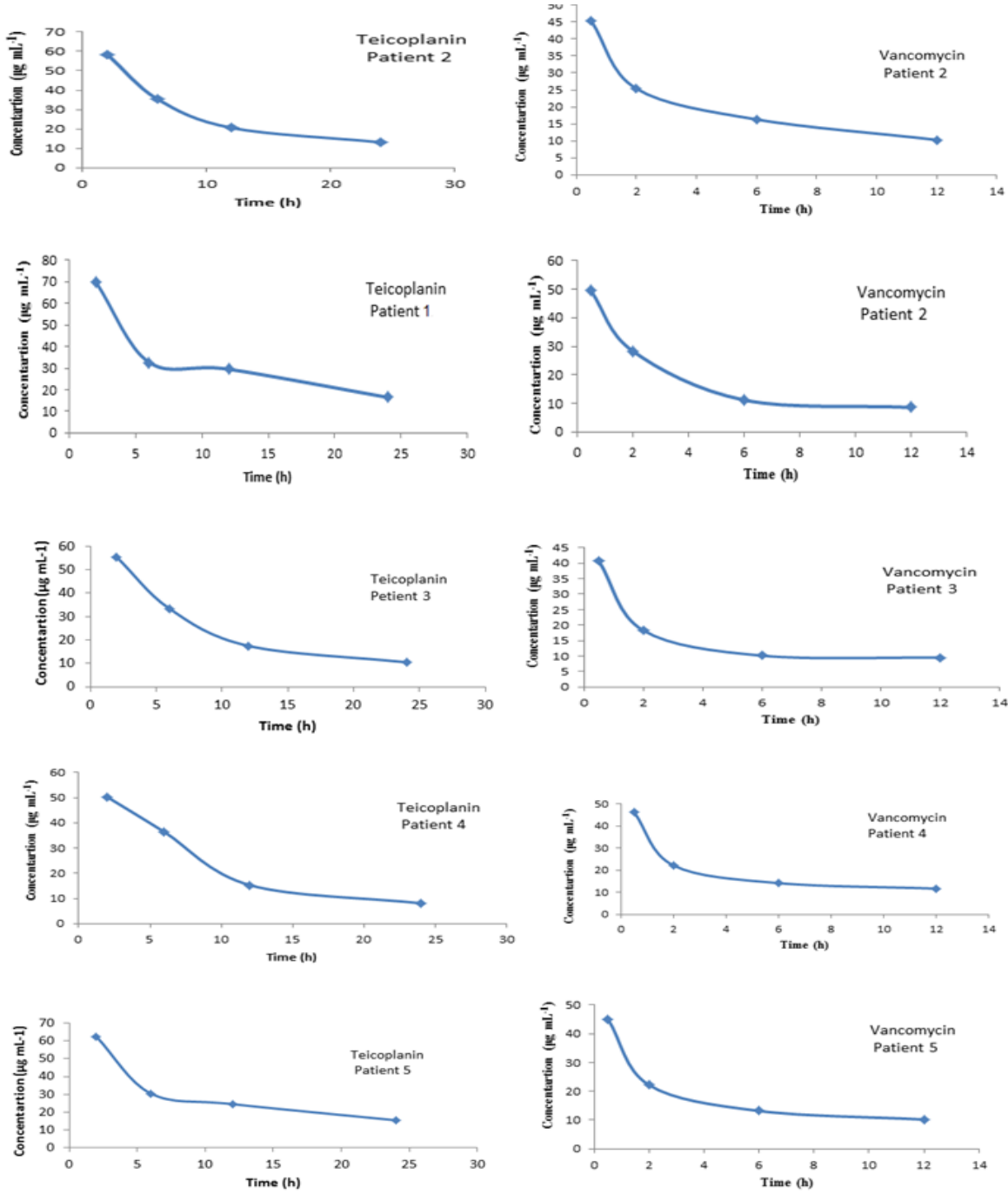
Na slici 16 predstavljeni su grafici zavisnosti koncentracije analita u plazmi i vremena uzimanja uzorka plazme.

Dodatno, na slici 17 date su gore pomenuti grafici za svakog pacijenta ponaosob.





**Slika 16.** Grafici zavisnosti koncentracije analita u plazmi i vremena uzimanja uzorka plazme za teicoplanin (grafik A) i vankomicin (grafik B).



**Slika 17.** Grafici zavisnosti koncentracije analita u plazmi i vremena uzimanja uzorka plazme za svakog pacijenta koji je učestvovao u studiji

## 5. ZAKLJUČAK

1. Primenom UHPLC-MS/MS metode razvijene prema AQbD konceptu, ispitano je šest oblika teikoplanina, njegova farmakopejska nečistoća i vankomicina u ogovarajućim doziranim oblicima.

Ispitani su uticaji parametara masenog spektrometra (napona kapilare, napona konusa i kolizione energije) na stepen jonizacije i fragmentacije vankomicina, svih šest oblika teikoplanina i njegove farmakopejske nečistoće A primenom *Rechtschaffen* ekperimentalnog dizajna. Pokazano je da su parametri sa najvećim uticajem na stepen jonizacije napon kapilare i koliziona energija. Na intenzitet jonskog odgovora teikoplanina A2-4/ A2-5, teikoplanina A3-1, vankomicina i nečistoće A, najveći uticaj imao je napon kapilare masenog spektrometra. Sa druge strane, primenjena koliziona energija u kolizionoj ćeliji imala je najveći uticaj na intenzitet jonskog odgovora teikoplanina A2-2/ A2-3 i teikoplanina A2-1.

2. UHPLC-MS/MS metoda razvijena je, u skladu sa AQbD konceptom, za određivanje šest oblika teikoplanina, njegove farmakopejske nečistoće, kao i vankomicina u ogovarajućim farmaceutskim oblicima.

*Rechtschaffen* optimizacioni dizajn korišćen je za postizanje ciljeva optimizacije. Uspešno su procenjeni uticaji značajnih parametara gradijenta (početni sadržaj acetonitrila, vreme trajanja linearnog dela gradijenta, i završni sadržaj acetonitrila) gde je pokazano da vreme trajanja linearnog dela gradijenta i završni sadržaj acetonitrila imaju najveći uticaj na praćene odgovore (faktore separacije za sledeće hromatografske parove: roksitromicin/teikoplanin A 2-2/A 2-3; nečistoća A/roksitromicin i nečistoća A/teikoplanin A 2-2/A 2-3 korišćenjem roksitromicina kao internog standarda).

Nakon završene optimizacije, UHPLC-MS/MS metoda je uspešno validirana. Dobijeni rezultati u skladu su sa definisanim zahtevima.

Razvijena metoda primenjena je u analizi ogovarajućih farmaceutskih oblika, kao i za sistematičnu procenu i praćenje stabilnosti teikoplanina i vankomicina. Primenljivost metode potvrđuju i rezultati praćenja koncentracije vankomicina i teikoplanina u različitim stres uslovima. Može se zaključiti da su svih šest oblika teikoplanina i vankomicina nestabilni u kiselim i baznim uslovima, pokazujući stepen degradacije 20%. Utvrđeno je da su vodeni rastvori ispitivanih lekova stabilni u neutralnim uslovima. Oksidacioni agens uslovio je značajnu degradaciju vankomicina. Vodeni rastvori vankomicina i teikoplanina bili su izloženi sunčevoj svetlosti tokom 24 h i 48 h sa stepenom razgradnje manjim od 5% što pokazuje fotostabilnost ispitivanih lekova. Teikoplanin je pokazao nestabilnost na povišenoj temperaturi i primećeno je da se dva najzastupljenija oblika teikoplanina razgradi za oko 20%.

Vankomicin je pokazao stabilnost na povišenoj temperaturi pošto dolazi do zanemarljive degradacije.

3. Postavljena je UHPLC-MS/MS metoda za analizu vankomicina i šest oblika teikoplanina u uzorcima humane plazme. AQbD koncept implementiran je kroz nekoliko tačno definisanih faza, u okviru kojih je, u cilju preciznog definisanja hromatografskog optimuma, primenjen hemometrijski pristup. Implementacija AQbD pristupa omogućila je razvoj brze metode željenih karakteristika i kvaliteta i bolje razumevanje uticaja ispitivanih faktora na dobijanje hromatografskog optimuma čime je postignuto da je analitika pomenutih antibiotika i oblast primene masene spektrometrije znatno pouzdanija i preciznija.

Za procenu uticaja ispitivanih značajnih hromatografskih parametara (početni sadržaj acetonitrila, vreme trajanja linearnog gradijenta i završni sadržaj acetonitrila) i definisanje hromatografskog optimuma korišćen je *Rechtschaffen* eksperimentalni dizajn. Pokazano je da su vreme trajanja linearnog gradijenta i završni sadržaj acetonitrila parametri sa najvećim uticajem na praćene odgovore (faktor separacije) i da su optimalni hromatografski uslovi sledeći: linearni gradijent % - 94% (v/v) mobilne faze B u trajanju od 3,10 minuta. Izokratsko eluiranje sa 94% (v/v) mobilne faze B dodatnih 2 minuta, a potom se kolona re-ekvilibriše sa 5% (v/v) mobilne faze B još 2 minuta.

4. Za pripremu uzoraka plazme odabrana je metoda precipitacije proteina. U cilju određivanja optimalnih uslova pripreme uzorka i minimizaciji efekta matriksa, primenjena je DoE metodologija i *D-optimal* dizajn, i to prvi put u pripremi uzoraka plazme za bioanalitiku ispitivanih jedinjenja. Ispitan je uticaj odabranih značajnih faktora: sadržaj mravlje kiseline u uzorku (%), vreme centrifugiranja (min), vreme mešanja na Vortex aparatu (min) kao kvantitativni faktori. Kao kvalitativni faktor ispitivan je organski rastvarač (metanol ili acetonitril). Može se zaključiti da na odnos intenziteta jonskog odgovora vankomicina u uzorku plazme i vodenom rastvoru značajan uticaj imaju sva četiri ispitivana faktora. Sadržaj mravlje kiseline u uzorku ima najveći uticaj na praćeni odgovor. U slučaju teikoplanina, na praćeni odgovor značajan uticaj imali su vreme mešanja na Vorteksu i tip precipitirajućeg agensa. Optimalni uslovi metode pripreme uzoraka plazme definisani su sledećim vrednostima ispitivanih faktora: 0,11% sadržaj mravlje kiseline, 4,0 min vreme mešanja na Vorteksu, 13 minuta vreme centrifugiranja i acetonitril kao precipitirajući agens.
5. UHPLC-MS/MS metoda uspešno je validirana ispitivanjem parametara validacije u skladu sa FDA smernicama za validaciju bioanalitičkih metoda. Dobijeni rezultati u skladu su sa definisanim zahtevima. Validirana UHPLC-MS/MS metoda uspešno je primenjena za analizu uzoraka plazme koji su dobijeni od 10 pacijenata (uzrasta od 18 do 60 godina) obolelih od MDR bakterijske infekcije. Maksimalna koncentracija ukupnog teikoplanina bila je  $59,24 \pm 7,34 \mu\text{g mL}^{-1}$  dok je minimalna koncentracija bila

12,74±3,46 µg mL<sup>-1</sup>. Najviša koncentracija vankomicina u plazmi bila je 45,46±3,63, dok je najniža bila 10,02±1,31 µg mL<sup>-1</sup>. Vrednosti koncentracije ispitivanih antibiotika bile su u okviru terapijskog opsega.

Precizno i brzo određivanje koncentracije ove grupe izuzetno značajnih antibiotika u humanoj plazmi znatno će unaprediti bezbednost i efikasnost njihove primene, a praćenje njihove kinetike u organizmu, kao i pojednostaviti procenu adekvatnosti doziranja.

## 6. LITERATURA

1. Loomba, P., Taneja, J., Mishra, B.; Methicillin and vancomycin resistant *S. aureus* in hospitalized patients; *Journal of Global Infectious Diseases* 2(3) 275-283 (2010).
2. Tanwar, J., Das, S., Fatima, Z., Hameed S.; Multidrug resistance: an emerging crisis; *Interdisciplinary Perspective on Infectious Diseases*, 2014 1-7 (2014).
3. Kang, H.K, Park, Y.; Glycopeptide antibiotics: structure and mechanisms of action; *Journal of Bacteriology and Virology*, 45(2) 67-78 (2015).
4. Atta-ur Rahman, *Studies in Natural Products Chemistry: Bioactive Natural Products (Part XIII)*, volume 50, Elsevier, United States.
5. Pramanik BN, Bartner PL, Chen G, The role of mass spectrometry in the drug discovery process, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* 2 401–417 (1999).
6. M. S. Lee, *LC/MS Applications in Drug Development*, John Wiley & Sons, New York, (2002).
7. Cooks RG, Chen G, Wong P, Mass spectrometers, in G. L. Trigg (ed), *Encyclopedia of Applied Physics*, VCH Publishers, New York, (1997)
8. Ho CS, Lam CVK, Chan MHM, Cheung RCK, Law LK, Lit LCW, Ng KV, Suen MWN, Tai HL, *Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications*, *Clin Biochem Rev.* 24(1) 3–12 (2003).
9. Catherine ED, Omnia AI, William RMJ, Matthew SH, Quantitative bioanalysis of intact large molecules using Mass Spectrometry, *J. Appl. Bioanalysis.* 6 (1) 52-64 (2020).
10. Ardrey RE, *Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction.* (1st edition) John Wiley & Sons, England (2003).
11. Van Berkel GJ, Zhou F, Aronson JT, Changes in bulk solution pH caused by the inherent controlled-current electrolytic process of an electrospray ion source. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process*, 162 55-67 (1997).
12. Gross ML, Charge-remote fragmentation: An account of research on mechanisms and applications, *Int. J. Mass Spectrom.* 200 611–624 (2000).
13. Gurpur R, Prabhu D, Williams ER, Matthias W, Pawel LU, Mass spectrometry using electrospray ionization, *Nat. Rev. Meth. Prim.* 3 23 (2023).
14. Kebarle P, A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 35 804–817 (2000).

15. Julia HJ, Ron MAH, Detection systems for mass spectrometry imaging: A perspective on novel developments with a focus on active pixel detector, *Rap. Comm. in Mass Spectr.* 27 (1) 1-284 (2013).
16. Cooks RG, Chen G, Weil C, Quadrupole mass filters and quadrupole Ion traps, in *Selected Topics in Mass Spectrometry in the Biomolecular Sciences, Series C, Vol. 504* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht,. 213–238 (1997).
17. Yost RA, Enke CG, Selected ion fragmentation with a tandem quadrupole mass spectrometer, *J. Am. Chem. Soc.* 100 2274–2275 (1978).
18. McLafferty FW, Tandem mass spectrometry, *Science* 214 280–287 (1981).
19. Chernushevich LV, Loboda AV, Thomson BA, An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 36 849–865 (2001).
20. Kazakevich Y, Lohrutto R, editors. *HPLC for pharmaceutical scientist*. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 2007
21. Hoffman E, Stroobant V. *Mass spectrometry: principles and application*. 3rd ed. London (UK): A John Wiley & Sons, Ltd; 2007
22. Ho CS, Lam CWK, Chan MHM, Cheung RCK, Law LK, Lit LCW, et al. Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clin Biochem Rev.* 24 (1) 3–12 (2003)
23. Kebarle P. A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 35 (7) 804–17 (2000).
24. Nadig DE. Preparation of drug samples for analysis. In: Ohannesian LA, Streeter AJ, editors. *Handbook of pharmaceutical analysis*. New York (USA): Marcel Dekker, Inc; 2002
25. Annesley TM, Ion suppression in mass spectrometry, *Clin. Chem.* 49 1041-1044 (2003).
26. Fabio G, Eleonora M, Davide Z, Maria CG, Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J Chromatogr. A.* 1217 3929–3937 (2010)
27. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez CM, Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS, *Anal. Chem.* 75 3019 (2003).
28. Bonfiglio R, King RC, Olah TV, Merkle K, The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13 1175 – 1185 (1999).
29. Leverage R, Avery MJ, Kavetskaia O, Bi H, Hop CECA, Gusev AI, Signal Suppression/Enhancement in HPLC-ESI-MS/MS from Concomitant Medications, *Biomed.Chromatogr.* 21 1143-1150 (2007).

30. Sterner JL, Johnston MV, Nicol GR, Ridge DP, Signal suppression in electrospray ionization Fourier transform mass spectrometry of multi-component samples, *J. Mass Spectrom.* 35 385 (2000).
31. Passoni MH, Salgado HRN. Development and validation of a new and rapid HPLC for determination of lyophilized teicoplanin, *Anal. Methods.* 4 (6) 1560-1564 (2012).
32. Chapelle G, Bouquet S, Rivet G, Barrier L, Rochard E, Courtois Ph. Rapid determination of teicoplanin in human plasma by high performance liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* 14(11) 2157-2167 (2007).
33. Mochizuki N, Ohno K, Shimamura T, Furukawa H, Todo S, Kishino S. Quantitative determination of individual teicoplanin components in human plasma and cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *J. Chromatogr. B* 847 (2) 78-81 (2007).
34. Kim KY, Cho SH, Song YH, Nam MS, Kim CW. Direct injection LC-MS/MS method for the determination of teicoplanin in human plasma. *J. Chromatogr. B.* 1008 (2016) 125-131 (2016).
35. Fung FH, Tang JC, Hopkins JP, Dutton JJ, Bailey LM, Davison AS. Measurement of teicoplanin by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: development of a novel method. *Ann. Clin. Biochem.* 49 (5) 475-481 (2012).
36. Begou O, Kontou A, Raikos N et al. An ultra-high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantification of teicoplanin in plasma of neonates. *J. Chromatogr. B.* 1047 215-222 (2017).
37. Tsai IL, Sun HY, Chen GY, Lin SW, Kuo CH. Simultaneous quantification of antimicrobial agents for multidrug-resistant bacterial infections in human plasma by ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* 116 593-603 (2013).
38. Jesús Valle MJ, López FG, Navarro AS. Development and validation of an HPLC method for vancomycin and its application to a pharmacokinetic study. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48(3) 835-839 (2008).
39. Shibata N, Ishida M, Prasad YVR, Gao W, Yoshikawa Y, Takada K. Highly sensitive quantification of vancomycin in plasma samples using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and oral bioavailability in rats. *J. Chromatogr. B.* 789(2) 211-218 (2003).
40. Zhang T, Watson DG, Azike C et al. Determination of vancomycin in serum by liquid chromatography-high resolution full scan mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 857(2) 352-356 (2007).
41. Cass RT, Villa JS, Karr DE, Schmidt DEJ. Rapid bioanalysis of vancomycin in serum and urine by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry using on-line sample extraction and parallel analytical columns. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 15(6) 406-412 (2001).



42. Pulla, R.P, Sastry, B.S., Rajendra Prasad, Y., Appala Raju, N.; Estimation of Teicoplanin in parenterals by RP-HPLC, *Inter J Pharm Sci and Res* 2 1807–1810 (2011).
43. Marrubinia, G., Tengattini, S., Colombo, R., Bianchi, D., Carlotti, F., Orlandini S., Terreni, M., Temporini, C., Massolini, G.; A new MS compatible HPLC-UV method for Teicoplanin drug substance and related impurities, part 1:Development and validation studies, *J Pharm and Biomed Anal.* 162 185–191(2019)
44. Beg S, Chaudhary V, Sharma G, Garg B, Panda SS, Singh B. QbD-oriented development and validation of a bioanalytical method for nevirapine with enhanced liquid-liquid extraction and chromatographic separation. *Biomed. Chromatogr.* 30 (6) 818-828 (2016).
45. Kalariya PD, Patel PN, Srinivas R, Talluri MVNK, Quality by design based development of a selective stability-indication UPLC method of dolutegravir and characterization of its degradation products by UPLC-QTOF-MS/MS, *New J. Chem.* 39(8) 6303–6314 (2015).
46. International Conference on Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Harmonized Tripartite Guideline. Topic Q8 (R2): Pharmaceutical Development and Topic Q11: Development and manufacture drug substances. Geneva (Switzerland); 2009.
47. ICH harmonized guideline Q14 on analytical procedure development, March 2022.
48. Orlandini, S., Pinzauti, S., Furulanetto, S.: Application of quality by design to the development of analytical separation methods. *Anal Bioanal Chem.* 405 443–450 (2013)
49. Cela, R., Ordonez, E.Y., Quintana, J.B., Rodil, R.: Chemometric–assisted method development in reversed–phase liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1287 2–22 (2013).
50. Zečević, M., Malenović, A., Stojanović, B.: Odabrana poglavlja farmaceutske regulative u kontroli lekova (prvo izdanje), Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd, Srbija, 2017.
51. Rozet, E., Lebrun, P., Debrus, B., Boulanger, P., Hubert, Ph.: Design space for analytical methods. *TRAC- Trends in Anal Chem.* 42 157–167 (2013)
52. Rivera, K.: A review of criterial functions and response surface methodology for the optimization of analytical scale HPLC separations. *J Liq Chromatogr R T* 23 2097–2121 (2000).
53. Hubert, C., Houari, S., Rozet, E., Lebrun, P., Hubert, Ph.; Towards a full integration of optimization and validation phases: An analytical-quality-by-design approach; *J. Chromatogr A.* 1395: 88–98. (2015)
54. Terzić J, Popović I, Tumpa A, Stajić A, Jančić-Stojanović B. Application of Analytical Quality by Design concept for bilastine and its degradation impurities

- determination by hydrophilic interaction liquid chromatographic method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 125 (2016) 385–393 (2016).
55. Tumpa A, Stajić A, Jančić-Stojanović B, Medenica M. Quality by Design in the development of hydrophilic interaction liquid chromatography method with gradient elution for the analysis of olanzapine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 134 18–26 (2017).
  56. Jovanović M, Rakić T, Tumpa A, Jančić-Stojanović B. Quality by Design approach in the development of hydrophilic interaction liquid chromatographic method for the analysis of ioxehol and its impurities. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 110 42–48 (2015).
  57. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Guidance for industry: Bioanalytical method validation. Draft guidance. Maryland (USA): Rockville; 2013.
  58. Vander, H.Y., Nijhuis, A., Smeyers-Verbeke, J., Vandeginste, B.G.M., Massart, D.L.: Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 24 723–753 (2001).
  59. Jung, HM, Jeya M, Kim SY, Moon HJ, Kumar Singh R, Zhang YW, Lee, JK.; Biosynthesis, biotechnological production, and application of teicoplanin: current state and perspectives; *Appl. Microb. and Biotech.* 84 417–428 (2009)
  60. European Pharmacopoeia, European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare (EDQM & HealthCare), Council of Europe 7th ed, 2013.
  61. Almeida AM, Castel-Branco MM, Falcão AC. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. *J Chromatogr B.* 774 (2) 215–22 (2002).
  62. Souza SVC, Junqueira RG. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Anal Chim Acta.* 552 25–35 (2005).
  63. ICH of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q1 (R2), Stability testing of new drug substances and products, step 4, (2003).
  64. Levine DP. Vancomycin: A history. *Clin. Infect. Dis.* 42 (1) 5-12 (2006).
  65. Svetitsky S, Leibovici L, Paul M. Comparative efficacy and safety of vancomycin versus teicoplanin: systematic review and meta-analysis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53(10) 4069-4079 (2009).

## **7. PRILOZI**

### **Biografija**

Ana Stajić rođena je 20. 07. 1988. godine u Vranju. Osnovnu školu „Branko Radičević“ završila je u Trgovištu, a gimnaziju „Bora Stanković“ u Vranju. Tokom osnovne škole i gimnazije bila je član Regionalnog centra za talente u Vranju. Tokom gimnazijskog školovanja, kao i za vreme studija bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Studije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2007/2008. godine i završila 2012. godine. Nakon završetka studija obavila je pripravnički staž i položila državni ispit.

Školske 2014/2015. godine upisala je doktorske akademske studije, modul – Analitika lekova. Od decembra 2014. godine do jula 2019. bila je zaposlena kao istraživač-pripravnik, a potom istraživač-saradnik na projektu Osnovnih istraživanja – Hemija koji finansira Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Od jula 2019.godine zaposlena je u farmaceutskoj kompaniji AstraZeneca kao Specijalista za cene i vrednost.

Objavila je deset naučnih radova u časopisima međunarodnog značaja kategorije M21 i M23, kao i jedan rad u časopisu nacionalnog značaja kategorije M51.

Dobitnik je Godišnje nagrade Farmaceutskog fakulteta u Beogradu za školsku 2016/2017. godinu, a koja se dodeljuje najboljim studentima doktorskih akademskih studija.

Govori engleski i ruski jezik, a služim se nemačkim jezikom.

## **Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine deo disertacije**

### *Objavljeni naučni radovi u časopisima međunarodnog značaja*

1. **Stajić A**, Maksić J, Maksić Đ, Forsdahl G, Medenica M, Jančić-Stojanović B, Analytical Quality by Design-based development and validation of ultra pressure liquid chromatography/MS/MS method for glycopeptide antibiotics determination in human plasma, *Bioanalysis*, 10(22) 1861–1876 (2018). **M22**
2. **Stajić A**, Janković - Maksić J, Jančić-Stojanović B, Medenica M, AQbD-Oriented UHPLC/MS/MS method development for glycopeptides assessment in pharmaceutical forms, *J Chromatogr Sci*, 59 (7) 650–658 (2021). **M23**

### *Objavljeni naučni radovi u časopisima nacionalnog značaja*

1. **Stajić A**, Jančić-Stojanović B, Overview of the analytical methods for vancomycin and/or teicoplanin determination in biological matrices. *Vet. Glas.* 71 87–97 (2017). **M51**

*Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34)*

1. Čudina, O., Tumpa, A., **Stajić, A.**, Janković, S., Stefanović, S., Jančić-Stojanović, B., Medenica, M.: Optimization and validation of an ultra-pressure liquid chromatography – tandem mass spectrometry for determination of glycopeptide antibiotics in plasma samples. *18<sup>th</sup> edition of EuroAnalysis, The European conference on analytical chemistry*, Bordeaux, France, 2015.
2. **Stajić, A.**, Tumpa A, Jančić-Stojanović, B., Medenica, M.: Development of a new and improved UPLC/MS/MS method for teicoplanin and vancomycin determination in human plasma samples. *10<sup>th</sup> Summer course for mass spectrometry in biotechnology and medicine*, Dubrovnik, Croatia, 2016.
3. **Stajić, A.**, Tumpa, A., Jančić-Stojanović, B., Medenica, M.: Chemometrically assisted optimization of sample preparation and UPLC/MS/MS conditions for glycopeptide antibiotics determination in plasma samples. *2<sup>nd</sup> Caparica Christmas conference on sample treatment*, Caparica, Portugal, 2016.
4. **Stajić A.**, Forsdahl G, Jančić-Stojanović B, Medenica M, AQbD – oriented MS and UPLC method development for glycopeptide antibacterials assessment in suitable pharmaceutical forms, *48<sup>th</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques*, Milan, Italy, 2019.



ВОЈНОМЕДИЦИНСКА АКАДЕМИЈА

СЕКТОР ЗА ЛЕЧЕЊЕ

26 APR 2017

Одлуку Етичког одбора,  
доставља, —

Чланови Етичког одбора ВМА, на својој седници од 11.04.2017. године, размотрили су захтев заступника начелника Клинике за нефрологију ВМА, пк проф. др Ђоке Максића, за оцену етичности поступака и процедура у докторском раду под називом: „Биоаналитика гликопептидних антибиотика масеном спектрометријом“. Кандидат је Ана Стајић, магистар фармације са Фармацеутског факултета у Београду, а налази се на академским докторским студијама на Фармацеутском факултету у Београду.

После детаљног упознавања са предметом, описом и значајем истраживања, циљевима, методологијом рада, очекиваним резултатима и др., закључено је да су испоштовани сви стручни и етички критеријуми, као и да планирана истраживања не одступају од принципа наведених у Хелсиншкој декларацији и њеним накнадним ревизијама. С тим у вези магистар фармације Ана Стајић, њен ментор проф. др сц. пхарм Биљана Стојановић са Фармацеутског факултета у Београду и коментор пк проф. др Ђоко Максић из Клинике за нефрологију ВМА, дужни су да спроведу све планиране активности и да припреме и уредно воде сва документа (протокол истраживања, писану информацију за испитанике, образац писаног пристанка испитаника, тест листу итд.), предвиђена опште прихваћеним стручним и етичким нормативима.

Етички одбор ће спроводити континуирани надзор поштовања протокола, методологије рада и етичности у вези реализације одобрене докторске тезе и има право да трајно или привремено стави ван снаге своју претходно издату сагласност.

Под наведеним условима **ДАЈЕ СЕ САГЛАСНОСТ** за извођење планираних истраживања у ВМА.

Присутни чланови Етичког одбора ВМА: пк проф. др Небојша Јовић, проф. др Викторија Драгојевић-Симић, пк проф. др Ранко Раичевић, проф. др Звонко Магић, пк мр Невен Вавић, пуковник у пензији др Стеван Сикимић, Даница Летонаи, судија Врховног суда Србије у пензији и Драган Бујошевић – новинар.

Етички одбор ВМА је организован и функционише у складу са смерницама *ICH GCP* и важећом законском регулативом.

Прилог: списак чланова Етичког одбора ВМА

нч

ПРЕДСЕДНИК ЕТИЧКОГ ОДБОРА  
пк проф. др Небојша Јовић

**ОВЕРАВА:**  
**НАЧЕЛНИК СЕКТОРА ЗА ЛЕЧЕЊЕ**  
пк проф. др Зоран Шегрт



Умножено у 4 примерка и достављено:

- мр фарм. Ана Стајић, Фармацеутски факултет, Београд: два примерка
- проф. др сц. пхарм Биљана Стојановић, Фармацеутски факултет, Београд: један примерак
- пк проф. др Ђоко Максић, Клиника за нефрологију ВМА: један примерак
- Етичком одбору: један примерак





ВОЈНОМЕДИЦИНСКА АКАДЕМИЈА  
СЕКТОР ЗА ЛЕЧЕЊЕ  
ЕТИЧКИ ОДБОР  
Црногравска 17, Београд  
011-2663-329

13 APR 2016

Чланови Етичког одбора Војномедицинске академије, именовани на основу одлуке Колегијума начелника ВМА (акт заменика начелника ВМА, Пов. бр. 4494-1, од 01.04.2016. године) су:

1. пуковник проф. др Небојша Јовић, максилофацијални хирург, Декан Медицинског факултета ВМА – председник,
2. вс проф. др Викторија Драгојевић-Симић, клинички фармаколог, Центар за клиничку фармакологију – заменик председника,
3. пуковник др Невен Вавић, нефролог, Центар за трансплантацију солидних органа – секретар,
4. пуковник проф. др Ранко Раичевић, неуролог, Клиника за неурологију – члан,
5. вс проф. др Звонко Магић, патофизиолог, Институт за медицинска истраживања – члан,
6. вс проф. др Лидија Кандолф-Секуловић, дерматолог, Клиника за кожне и полне болести – члан,
7. пуковник у пензији, др Стеван Сикимић, пнеумофтизиолог – члан,
8. вс дипл. правник Драган Никачевић, правник, Одсек за правне послове – члан,
9. Даница Лећонац, правник - судија Врховног суда Србије у пензији – члан,
10. Драган Бујошевић, новинар; генерални директор РТС – члан,
11. проф. др Чедомир Чупић, Факултет политичких наука – члан.

Ажурирано:  
01.04.2016.



## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Ана Стајић

Број индекса 21/14

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Ретенционо и јонизационо понашање одабраних гликопептидних антибиотика за њихову аналитичку и биоаналитичку студију UHPLC-MS/MS методом са хеометријским приступом

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

Потпис аутора

*Ана Стајић*

У Београду, 14.06.2023.године



## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ана Стајић

Број индекса 21/14

Студијски програм Аналитика лекова

Наслов рада Ретенционо и јонизационо понашање одабраних

гликопептидних антибиотика за њихову аналитичку и

биоаналитичку студију УНPLC-MS/MS методом са

хеометријским приступом

Ментор Проф.др Мира Зечевић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива 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 аутора

*Ана Стајић*

У Београду, 14.06.2023.година

## Изјава о коришћењу

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

Ретенционо и јонизационо понашање одабраних гликопептидних антибиотика за њихову аналитичку и биоаналитичку студију UHPLC-MS/MS методом са хеометријским приступом

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.  
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

У Београду, 14.06.2023.године

Потпис аутора

*Ана Станковић*

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.