

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Svetlana B. Milovanović

HEMOMETRIJSKI PRISTUP
U ISPITIVANJU MOKSONIDINA,
NJEGOVIH NEČISTOĆA
I POTENCIJALNIH DEGRADACIONIH
PROIZVODA PRIMENOM METODA
TEČNE HROMATOGRFIJE
I MASENE SPEKTROMETRIJE

doktorska disertacija

Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Svetlana B. Milovanović

CHEMOMETRIC APPROACH TO THE
INVESTIGATION OF MOXONIDINE,
ITS IMPURITIES AND POTENTIAL
DEGRADATION PRODUCTS
BY APPLYING THE METHODS
OF LIQUID CHROMATOGRAPHY
AND MASS SPECTROMETRY

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014.

KOMISIJA ZA OCENU I ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

MENTOR

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

ČLANOVI KOMISIJE

dr sc. Ljiljana Živanović, redovni profesor u penziji
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

dr sc. Biljana Otašević, docent
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Datum odbrane: _____

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u Nacionalnoj kontrolnoj laboratoriji Agencije za lekove i medicinska sredstva Srbije i na Katedri za Analitiku lekova Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Želela bih da izrazim zahvalnost i poštovanje svom mentoru prof. dr Miri Zečević na ukazanom poverenju, pruženom znanju, podršci i dragocenim usmerenjima tokom izrade i pisanja ove doktorske disertacije.

Zahvalnost upućujem prof. dr Ljiljani Živanović na podršci i stručnoj pomoći u izradi ove doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem doc. dr Biljani Otašević na neizmernoj pomoći, razumevanju i konstruktivnim savetima tokom eksperimentalnog rada i pisanja doktorske disertacije.

Želim da izrazim zahvalnost mojim kolegama iz Nacionalne kontrolne laboratorije Agencije za lekove i medicinska sredstva Srbije pored kojih sam mnogo naučila, i koji su mi pružili nesebičnu pomoć i podršku u eksperimentalnom radu.

Zahvaljujem kolegama sa Katedre za Analitiku lekova Farmaceutskog fakulteta na zalaganju, strpljenju i divnoj saradnji tokom mog eksperimentalnog rada.

Najtopliju podršku, ljubav i razumevanje tokom svih godina mog rada na ovoj doktorskoj disertaciji pružila mi je moja porodica, kojoj sa posebnom radošću upućujem neizmernu zahvalnost.

HEMOMETRIJSKI PRISTUP U ISPITIVANJU MOKSONIDINA, NJEGOVIH NEČISTOĆA I POTENCIJALNIH DEGRADACIONIH PROIZVODA PRIMENOM METODA TEČNE HROMATOGRAFIJE I MASENE SPEKTROMETRIJE

Rezime

Moksonidin spada u drugu generaciju antihipertenziva sa centralnim dejstvom, koji ispoljava visok afinitet vezivanja za I₁ subtip imidazolinskih receptora. Ovo je uslovljeno prostornom konformacijom molekule moksonidina kao i prisustvom hidrofilnije pirimidinske grupe, zbog čega neželjeni α_2 adrenergički efekti izostaju. Moksonidin se koristi u terapiji esencijalne hipertenzije.

Oficinalna monografija moksonidina u Evropskoj farmakopeji, kao i u Britanskoj farmakopeji, opisuje izokratsku metodu određivanja moksonidina tečnom hromatografijom, primenom jon-par reagensa kao komponente mobilne faze, i uključuje separaciju na povišenoj temperaturi, u trajanju od približno 23 minuta. Međutim, nisu poznati podaci koji se odnose na određivanje moksonidina u farmaceutskim doziranim oblicima, u prisustvu njegovih organskih nečistoća kao potencijalnih degradacionih proizvoda. Takođe, u skladu sa ICH smernicama, identifikacija i kvantifikacija obavezna je za sve nečistoće koje se mogu naći u farmaceutskim proizvodima u količini većoj od 0,10 %. Razvoj nove, brze i rutinski primenjive izokratske RP-HPLC metode značajno bi unapredio kvalitativnu i kvantitativnu analizu moksonidina u prisustvu njegovih nečistoća u aktivnoj farmaceutskoj supstanci i farmaceutskom doziranom obliku. Imajući u vidu veći broj faktora koji mogu uticati na hromatografsko ponašanje strukturno veoma sličnih komponenti, optimizacija hromatografske metode izvršena je primenom centralnog kompozicionog dizajna, kao vrste optimizacionog eksperimentalnog dizajna, dok je validacija predložene RP-HPLC metode izvršena u skladu sa ICH smernicama.

Procena stabilnosti aktivnih farmaceutskih supstanci i formulacija sprovođenjem studije forsirane degradacije podrazumeva njihovo izlaganje ekstremnim eksperimentalnim uslovima (oksidacije, fotolize, termolize, i hidrolize u kiseloj, baznoj i neutralnoj sredini). Uzorci dobijeni studijom forsirane degradacije moksonidina ispitani su primenom unapredene tehnike tečne hromatografije pod visokim pritiskom (UHPLC), kojom se postiže značajno poboljšanje efikasnosti, osetljivosti i selektivnosti metode.

Karakterizacija dobijenih degradacionih proizvoda kao i definisanje načina njihove fragmentacije, izvršeno je primenom tehnike tačne hromatografije spregnute sa masenom spektrometrijom (UHPLC-MS i UHPLC-MS/MS). Razvoj i optimizacija nove *stability-indicating* UHPLC metode izvršene su primenom frakcionog faktorskog dizajna, odnosno *Box-Behnken*-ovog dizajna. U slučaju postojanja više podjednako bitnih ciljeva za posmatrane odgovore sistema i faktore koji na njih utiču, neophodno je uključiti metodologiju multikriterijumskog odlučivanja. Izračunate *Derringer*-ove funkcije za svaki hromatografski cilj pojedinačno, kao i dobijena opšta *Derringer*-ova funkcija, omogućile su definisanje onih nivoa hromatografskih faktora koji daju najbolje performanse za farmaceutsku analizu. Nova, izokratska *stability-indicating* UHPLC metoda validirana je u skladu sa ICH smernicama. Obe predložene metode uspešno su primenjene za analizu moksonidina i njegovih nečistoća u komercijalno dostupnom farmaceutskom doziranom obliku (tablete).

Ključne reči

Moksonidin, Forsirana degradacija, Degradacioni proizvodi, *Stability-indicating* metoda, HPLC, UHPLC, Masena spektrometrija, Eksperimentalni dizajn, Validacija metode

Naučna oblast

Farmaceutske nauke

Uža naučna oblast

Analitika lekova

UDK broj: 615.225 [543.544.5 : 543. 51] (043.3)

615.225 : 615.11 (043.3)

CHEMOMETRIC APPROACH TO THE INVESTIGATION OF MOXONIDINE, ITS IMPURITIES AND POTENTIAL DEGRADATION PRODUCTS BY APPLYING THE METHODS OF LIQUID CHROMATOGRAPHY AND MASS SPECTROMETRY

Abstract

Moxonidine is a second-generation centrally acting antihypertensive drug that exhibits high binding affinity for I₁ imidazoline receptor subtype. This is caused by the spatial conformation of the moxonidine molecule as well as the presence of more hydrophilic pyrimidine ring, leading to the avoidance of α_2 adrenergic side effects. Moxonidine is used in the therapy of essential hypertension.

The officinal moxonidine monographs in the European Pharmacopoeia and British Pharmacopoeia, define an isocratic liquid chromatography method for determining moxonidine, including the ion-pair reagents as a component of the mobile phase, separation at an elevated temperature and a total run time of about 23 minutes. However, the data relating to the determination of moxonidine in pharmaceutical dosage forms, in the presence of its organic impurities as well as its potential degradation products, are not yet available. Also, according to the ICH guidelines, identification and quantification is required for all of the impurities that may be found in the drug product in an amount greater than 0.10 %. The development of new, rapid and routinely applicable isocratic RP-HPLC method would significantly improve the qualitative and quantitative analysis of moxonidine in the presence of its impurities in the active pharmaceutical substances and pharmaceutical dosage form. Taking into account the number of factors that can influence the chromatographic behavior of structural very similar components, the optimization of the chromatographic method was performed by using the central composite design as a kind of optimization experimental design. The validation of the proposed RP-HPLC methods was carried out in accordance with ICH guidelines.

The evaluation of stability of the active pharmaceutical substance and the pharmaceutical formulation by performing forced degradation studies involves their exposure to extreme experimental conditions (oxidation, photolysis, thermolysis and acid, neutral and base hydrolysis). The samples obtained from forced degradation studies of moxonidine were tested using the advanced technique of ultra high pressure

liquid chromatography (UHPLC), that achieves a significant improvement in efficiency, sensitivity and selectivity of the method.

The characterization of the obtained degradation products as well as defining the fragmentation pattern were performed by using ultra high pressure liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UHPLC-MS and UHPLC-MS/MS). Development and optimization of the new stability-indicating UHPLC method were performed using the fractional factorial design and Box-Behnken design. In the case of several equally valuable goals for the observed responses of the system and the factors that affect them, it is necessary to include the multicriteria decision making methodology. The calculated Derringer functions for each chromatographic goal, as well as calculated the overall desirability function, enabled the definition of those levels of the chromatographic factors which give the best performances for pharmaceutical analysis. The new, isocratic UHPLC stability-indicating method has been validated in accordance with ICH guidelines. The both proposed methods have been successfully applied to the analysis of moxonidine and its impurities in commercially available pharmaceutical dosage form (tablets).

Keywords

Moxonidine, Forced degradation, Degradation products, Stability-indicating method, HPLC, UHPLC, Mass spectrometry, Experimental design, Method validation

Scientific field

Pharmaceutical sciences

Scientific discipline

Drug analysis

UDC: 615.225 [543.544.5 : 543. 51] (043.3)

615.225 : 615.11 (043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 Osnovne karakteristike moksonidina	2
1.1.1 Farmakološke osobine	2
1.1.2 Farmakokinetika	3
1.1.3 Hemijske osobine od značaja za farmaceutsku analizu.....	4
1.1.4 Sinteza moksonidina i njegovih nečistoća.....	7
1.1.5 Nečistoće i degradacioni proizvodi moksonidina.....	9
1.1.6 Pregled literature vezane za analitiku moksonidina i srodnih supstanci ..	10
1.2 Nečistoće u aktivnim farmaceutskim supstancama i farmaceutskim doziranim oblicima	15
1.2.1 Poreklo nečistoća u aktivnoj farmaceutskoj supstanci i farmaceutskom doziranom obliku.....	15
1.2.2 Profil nečistoća	18
1.2.3 Nečistoće u ekscipijensima.....	18
1.3 Ispitivanje stabilnosti leka	19
1.3.1 Studije forsirane degradacije	20
1.3.1.1 Termolitička degradacija.....	22
1.3.1.2 Hidrolitička degradacija	23
1.3.1.3 Oksidacija.....	23
1.3.1.4 Fotoliza.....	24
1.3.2 Metode za ispitivanje stabilnosti	25
1.4 Metode farmaceutske analize	26
1.4.1 Tečna hromatografija pod visokim pritiskom	26
1.4.1.1 Hromatografski parametri	28

1.4.1.2	Fenomen širenja hromatografskog pika i Van Deemter-ova jednačina	30
1.4.2	Tečna hromatografija pod ultra visokim pritiskom	33
1.4.2.1	Osnovni principi	33
1.4.2.2	Prednosti i nedostaci UHPLC tehnike i njena primena.....	35
1.4.3	Masena spektrometrija.....	36
1.4.3.1	Osnovni principi	36
1.4.3.2	Maseni spektrometar	37
1.4.3.3	Jonizacija u masenom spektrometru	38
1.4.3.4	Maseni analizatori	40
1.4.4	Sprega tečne hromatografije pod ultra visokim pritiskom i masene spektrometrije (UHPLC-MS)	41
1.5	Hemometrija	42
1.5.1	Eksperimentalni dizajn	44
1.5.1.1	Screening dizajn	45
1.5.1.2	Optimizacioni dizajn	45
1.5.2	Metodologija multikriterijumskog odlučivanja	47
2.	CILJ RADA	49
3.	EKSPERIMENTALNI DEO	51
3.1	Analitička oprema, reagensi i standardne supstance	52
3.1.1	Tečni hromatograf sa UV detekcijom	52
3.1.2	Tečni hromatograf UHPLC sa masenim detektorom	52
3.1.3	Ostala oprema	52
3.1.4	Reagensi	53
3.1.5	Standardne supstance, farmaceutski dozirani oblik i komponente placeba..	54
3.1.6	Statistički programi	54

3.2	Priprema rastvora za optimizaciju RP-HPLC metode.....	54
3.2.1	Priprema osnovnih rastvora standardnih supstanci	54
3.2.2	Priprema rastvora mobilne faze za optimizaciju RP-HPLC metode	55
3.2.3	Priprema radnih rastvora standardnih supstanci za razvoj i optimizaciju metode	55
3.3	Priprema rastvora za validaciju RP-HPLC metode	56
3.3.1	Priprema rastvora mobilne faze za validaciju RP-HPLC metode	56
3.3.2	Priprema rastvora standarda za procenu linearnosti metode	56
3.3.3	Priprema rastvora standarda za procenu preciznosti metode.....	56
3.3.4	Priprema rastvora standarda za procenu tačnosti metode.....	56
3.3.5	Priprema rastvora standarda za procenu selektivnosti metode.....	57
3.3.6	Priprema rastvora mobilne faze za procenu robusnosti metode	57
3.3.7	Priprema rastvora za određivanje limita kvantifikacije i limita detekcije	57
3.4	Priprema rastvora uzorka <i>Moxogamma 0.4</i> [®] film tableta	57
3.5	Hromatografska analiza.....	58
3.6	Studija forsirane degradacije i razvoj RP-UHPLC metode za praćenje stabilnosti moksonidina	58
3.6.1	Priprema rastvora za studiju forsirane degradacije.....	58
3.6.1.1	Priprema rastvora stres agenasa	58
3.6.1.2	Priprema rastvora mobilne faze.....	59
3.6.1.3	Priprema uzoraka za izvođenje studije forsirane degradacije	59
3.6.2	Hromatografska analiza i sprega sa masenom spektrometrijom	60
3.6.3	Optimizacija <i>stability-indicating</i> UHPLC metode	61
3.6.3.1	Priprema osnovnih rastvora standardnih supstanci	61
3.6.3.2	Priprema radnih rastvora supstanci za razvoj i optimizaciju metode	61
3.6.3.3	Priprema rastvora mobilne faze.....	61
3.6.3.3.1	Priprema rastvora mobilne faze za screening eksperimente.....	61

3.6.3.3.2	Priprema rastvora mobilne faze za Box Brenhken optimizacioni dizajn	62
3.6.4	Validacija <i>stability-indicating</i> UHPLC-PDA metode	62
3.6.4.1	Priprema rastvora mobilne faze za validaciju <i>stability-indicating</i> UHPLC-PDA metode	62
3.6.4.2	Priprema rastvora standarda za procenu linearnosti metode	62
3.6.4.3	Priprema rastvora standarda za procenu selektivnosti metode	63
3.6.4.4	Priprema rastvora standarda za procenu preciznosti metode	63
3.6.4.5	Priprema rastvora standarda za procenu tačnosti metode	63
3.6.4.6	Priprema rastvora mobilne faze za procenu robusnosti metode	64
3.6.5	Priprema rastvora uzorka <i>Moxogamma 0.4</i> [®] film tableta	64
3.6.6	Hromatografska analiza	64
4.	REZULTATI I DISKUSIJA	65
4.1	Razvoj RP-HPLC metode za određivanje moksonidina i njegovih nečistoća	66
4.1.1	Preliminarna ispitivanja i izbor osetljive oblasti eksperimenta	66
4.1.2	Optimizacija RP-HPLC metode primenom centralnog kompozicionog dizajna	71
4.2	Validacija RP-HPLC metode	78
4.2.1	Ispitivanje linearnosti i opsega metode	78
4.2.2	Ispitivanje selektivnosti metode	80
4.2.3	Ispitivanje preciznosti metode	81
4.2.4	Ispitivanje tačnosti metode	82
4.2.5	Ispitivanje limita detekcije i limita kvantifikacije	83
4.2.6	Ispitivanje robusnosti metode	84
4.2.7	Ispitivanje pogodnosti sistema za kvalitativnu i kvantitativnu analizu moksonidina i njegovih nečistoća predloženom RP-HPLC metodom	84
4.2.8	Određivanje sadržaja <i>Moxogamma 0.4</i> [®] tableta	86

4.3	Studija forsirane degradacije moksonidina.....	87
4.3.1	Hidroliza u neutralnoj sredini i termalna degradacija	88
4.3.2	Hidroliza u kiseloj sredini	88
4.3.3	Hidroliza u baznoj sredini	89
4.3.4	Oksidativna degradacija	90
4.3.5	Fotodegradacija	90
4.3.6	Primena masene spektrometrije u identifikaciji nastalih degradacionih proizvoda	92
4.3.6.1	Fragmentacija moksonidina i njegovih degradacionih proizvoda.....	93
4.3.7	Predloženi put degradacije za moksonidin	96
4.4	Razvoj i optimizacija <i>stability-indicating</i> UHPLC metode za moksonidin ...	98
4.4.1	Preliminarna ispitivanja.....	98
4.4.2	Primena frakcionog faktorskog dizajna u <i>screening</i> fazi	99
4.4.3	Primena <i>Box Brehken</i> dizajna u optimizacionoj fazi.....	103
4.5	Validacija <i>stability-indicating</i> RP-UHPLC metode	114
4.5.1	Ispitivanje robusnosti metode.....	114
4.5.2	Ispitivanje linearnosti i opsega metode	115
4.5.3	Ispitivanje selektivnosti metode	117
4.5.4	Ispitivanje preciznosti metode.....	118
4.5.5	Ispitivanje tačnosti metode	119
4.5.6	Ispitivanje limita detekcije i limita kvantifikacije	120
4.5.7	Ispitivanje pogodnosti sistema za kvalitativnu i kvantitativnu analizu moksonidina i njegovih nečistoća predloženom UHPLC metodom	121
4.5.8	Određivanje sadržaja <i>Moxogamma 0.4</i> [®] tableta.....	122
5.	ZAKLJUČAK.....	124
	LITERATURA	128
	PRILOZI	

1. UVOD

1.1 OSNOVNE KARAKTERISTIKE MOKSONIDINA

1.1.1 Farmakološke osobine

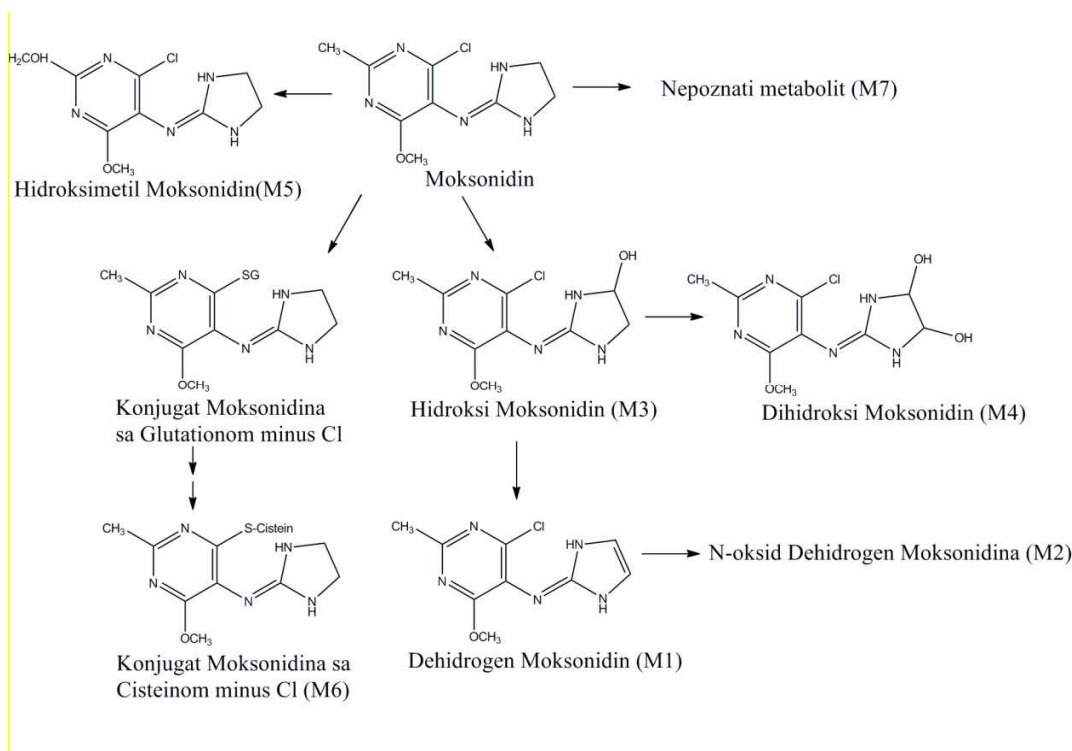
Moksonidin spada u drugu generaciju antihipertenziva sa centralnim dejstvom. Najznačajniji predstavnik prve generacije ovih lekova je klonidin za koga su istraživanja pokazala da je za postizanje centralnog antihipertenzivnog dejstva putem inhibicije simpatičkog nervnog sistema pored vezivanja za α_2 adrenergičke receptore, značajna interakcija sa imidazolidin-vezujućim mestom (IBS) u rostralnoj ventrolateralnoj meduli (RVLM) moždanog stabla. Ovo saznanje dovelo je do intenzivnog razvoja nove generacije imidazolinskih antihipertenziva koji svoje dejstvo predominantno ispoljavaju vezivanjem za I_1 - imidazolinski receptor.

Moksonidin, kao strukturni analog klonidina, razvijen je supstitucijom fenil grupe pirimidinskim prstenom, dok je imidazolidinska struktura, kao uslov za farmakološko dejstvo zadržana. Ispoljava visok afinitet vezivanja za I_1 subtip imidazolinskih receptora (čak 33 puta veći nego za α_2 adrenergičke receptore), koji je najviše zastupljen u RVLM, ali se može naći i u perifernim tkivima (nadbubrežne žlezde, bubrezi, jetra, trombociti). Smatra se da prostorna konformacija molekule moksonidina kao i prisustvo hidrofilnije pirimidinske strukture u odnosu na fenil grupu klonidina značajno doprinosi njegovom većem afinitetu vezivanja za imidazolinski receptor, a samim tim i povoljnijem farmakološkom profilu [1,2].

Moksonidin se koristi u terapiji esencijalne hipertenzije. Međutim, kao agonista I_1 - imidazolinskih receptora pored primarnog antihipertenzivnog dejstva, ispoljava pozitivan uticaj i na metaboličke poremećaje kao što su hiperlipidemija, rezistencija na insulin, poremećaj tolerancije glukoze i hiperinsulinemija. Postoje dokazi da njegova samostalna primena kao antihipertenziva kod pacijenata sa metaboličkim sindromom, ili u kombinaciji sa antihipertenzivima drugog mehanizma delovanja dovodi do značajnog terapijskog benefita. Njegova prednost u odnosu na antihipertenzive starije generacije (npr. klonidin) ogleda se u boljem profilu neželjenih reakcija, uzimajući u obzir njihovu učestalost i ozbiljnost, tako da su tipična neželjena dejstva ovih lekova (sedacija, pospanost, suvoća usta) primenom moksonidina svedena na minimum. Ovo se objašnjava njegovim visoko-selektivnim vezivanjem za I_1 - imidazolinski receptor, zbog čega navedeni α_2 adrenergički efekti izostaju [3-9].

1.1.2 Farmakokinetika

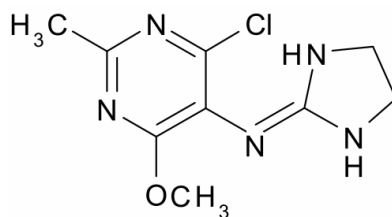
Moksonidin se nakon *per os* primene brzo resorbuje i postiže maksimalnu koncentraciju u plazmi za 0,5 do 3 sata. Bubrežna ekskrecija predstavlja glavni put eliminacije intaktnog leka, kao i njegovih metabolita. Oko 50 % do 75 % *per os* primenjenog moksonidina se eliminiše u nepromenjenom obliku. Moksonidin ima relativno kratko poluvreme eliminacije, koje iznosi oko 2-3 sata, ali uprkos tome, stabilan antihipertenzivni efekat održava se tokom 24 sata, zbog čega se dozira jednom dnevno. Ovakav režim doziranja doprinosi postizanju dobre komplijanse. Moksonidin se vezuje za proteine plazme oko 7 %. Kako je neizmenjen moksonidin najzastupljeniji u biološkim matriksima, to ukazuje na činjenicu da metabolizam generalno ima skroman uticaj na klirens moksonidina kod ljudi. Na slici 1 je prikazan predloženi metabolički put moksonidina. Glavni metabolit pronađen u urinu i plazmi je dehidrogenizovani moksonidin (M1), dok su takođe detektovana tri metabolita koji su specifično prisutni samo u humanoj populaciji, putativni N-oksid (M2) dehidrogenizovanog moksonidina, dihidroksi moksonidin (M4), kao i nepoznati metabolit (M7). Za metabolite M1, M4, hidroksi moksonidin (M3) i konjugat sa cisteinom, bez atoma hlora (M6) nije dokazana farmakološka aktivnost, dok aktivnost metabolita M2 i M7 nije testirana. Hidroksimetil moksonidin (M5) je pokazao antihipertenzivnu aktivnost sa bradikardijalnim efektom kod svesnih, netretiranih hipertenzivnih pacova, ali je njegovo dejstvo slabije i kraće u odnosu na nepromenjeni lek. Kako su ispitivanja pokazala da se samo 1 % od ukupne doze izluči u vidu hidroksimetilmoksonidina, time se objašnjava činjenica da je za farmakološki efekat dominantno odgovoran nepromenjeni lek [7,10-12].



Slika 1. Predloženi metabolički put moksonidina [11]

1.1.3 Hemijske osobine od značaja za farmaceutsku analizu

Aktivna farmaceutska supstanca moksonidin, 4-hloro-*N*-(imidazolidin-2-iliden)-6-metoksi-2-metilpirimidin-5-amin, oficinalna je po Evropskoj farmakopeji [13] i Britanskoj farmakopeji [14]. Hemijska struktura moksonidina predstavljena je na slici 2.



Slika 2. Hemijska struktura moksonidina

Molekulska formula: $C_9H_{12}ClN_5O$

Relativna molekulska masa: 241,7

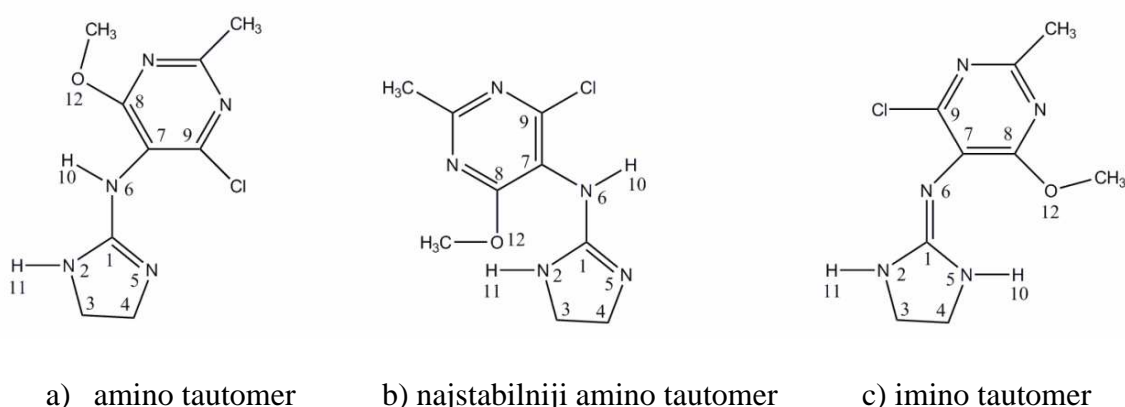
Moksonidin je izgledom beo ili skoro beo prašak.

Veoma slabo je rastvorljiv u vodi, umereno je rastvorljiv u metanolu, slabo je rastvorljiv u metilen-hloridu, dok je u acetonitrilu veoma slabo rastvorljiv [13,14].

Moksonidin ne poseduje asimetrični centar, i nije optički aktivan.

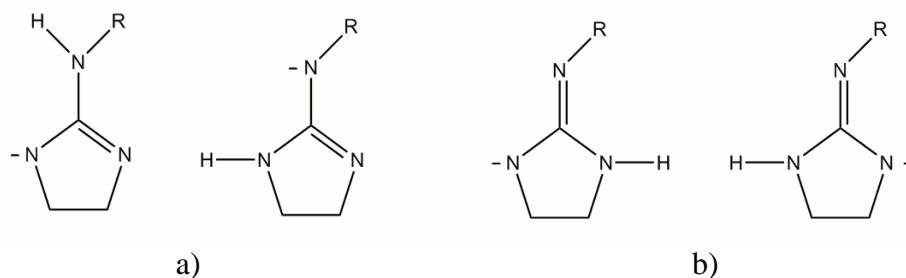
Osnovu hemijske strukture moksonidina čini 2,4,6-supstituisani pirimidinski prsten i imidazolinski prsten koji su međusobno povezani preko iminskog azota. Ovakva struktura pogoduje pojavi amino-imino tautomerije. Ispitivanja molekulske strukture moksonidina ukazuju na podatak da je moksonidin najstabilniji kao imino tautomer (slika 3c). Prostorna konformacija moksonidina zavisi od vrednosti ugla koji gradi segment C1-N6-C7-C8 molekule (slika 3), a koji se prema dostupnim podacima može kretati u intervalu od 45° do 110°. To ukazuje na činjenicu da je najstabilnija konformacija moksonidina neplanarna, pri čemu pirimidinski i imidazolinski prsten zauzimaju energetske najpogodniju prostornu poziciju. Ova konformacija je dodatno stabilizovana intramolekulskim vodoničnim vezama između N-H grupe imidazolinskog prstena i atoma kiseonika iz metoksi grupe pirimidinskog prstena.

Moksonidin pored N-H grupa koje pokazuju kisel karakter, sadrži atome azota kao bazne centre, pa otuda podleže intramolekularnom protonovanju/deprotonovanju, na čemu se zasnivaju njegove kiselo-bazne karakteristike. Međutim, iako poseduje dva potencijalna centra protonovanja (pirimidinski i imidazolinski prsten), istraživanja su pokazala da je energetske najpogodnije primarno mesto protonovanja molekule moksonidina imidazolinski prsten. Različiti literaturni podaci dobijeni eksperimentalno ili kalkulacijom ukazuju da se vrednost pK_a za moksonidin kreće u rasponu od 6,47-7,84 zbog čega mu se pripisuju slabo kisele osobine [1,15].

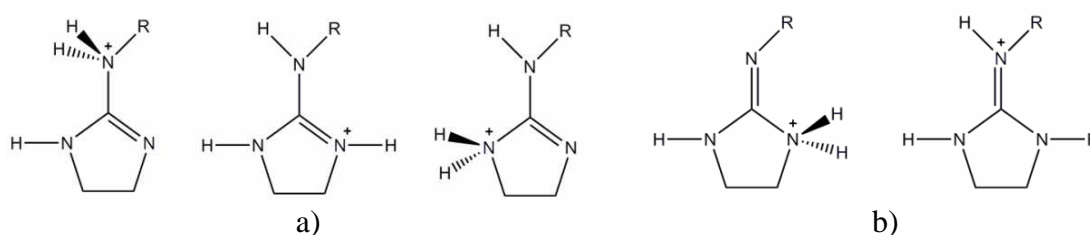


Slika 3. Tautomerni oblici molekule moksonidina [2]

Procesi protonovanja i deprotonovanja koji se dominantno odvijaju na imidazolinskom prstenu predstavljeni su, prema tautomernim oblicima na slikama 4 i 5:



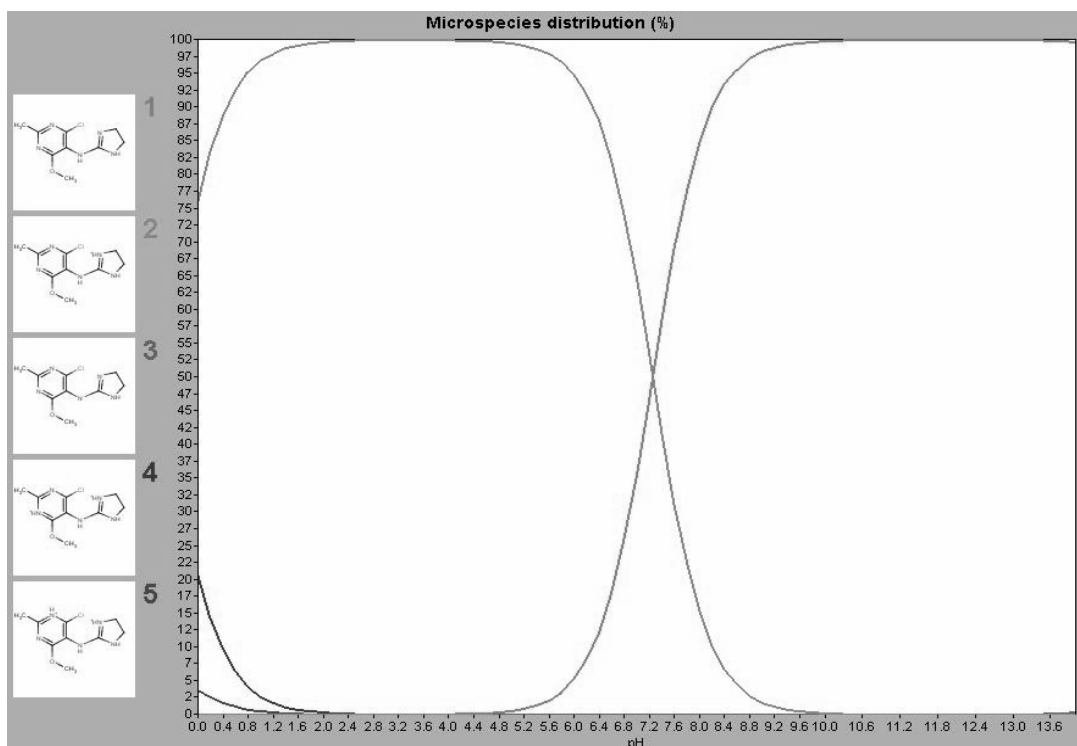
Slika 4. Deprotonovanje amino tautomera (a) i imino tautomera (b) molekule moksonidina [2]



Slika 5. Protonovanje amino tautomera (a) i imino tautomera (b) molekule moksonidina [2]

Lipofilan karakter moksonidina, potvrđen je izračunavanjem vrednosti njegovog particionog koeficijenta $\log P = 1,31$ (CLOGP) [1].

Istraživanja su pokazala da je pri pH vrednosti rastvora od oko 7,4 približno 50 % moksonidina zastupljeno u neutralnom molekulskom obliku [1] (slika 6, broj 1), a 50 % u jonizovanom obliku (slika 6, broj 3). Udeo molekulskog oblika moksonidina se postepeno povećava u rastvorima čija je pH vrednost > 5 , dok je njegova jonizovana forma sa protonovanim atomom azota u imidazolovom prstenu (slika 6, brojevi 2 i 4) dominantno zastupljena u rastvorima sa pH vrednošću $< 2,4$. U veoma kiseljoj sredini kada je pH vrednost rastvora manja od 1,2 prisutna je višeprotonovana forma, uključujući atome azota u imidazolinskom i pirimidinskom prstenu (slika 6, broj 5). Poznavanje navedenih osobina moksonidina, uzimajući u obzir i njegov lipofilan karakter, veoma je važno za hromatografsko ispitivanje moksonidina.



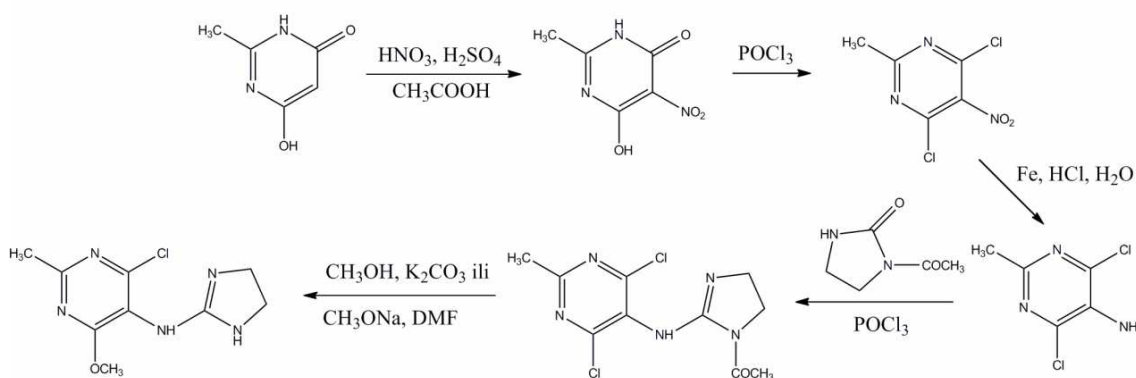
Slika 6. Zastupljenost jonizovanih oblika molekule moksonidina u zavisnosti od pH vrednosti rastvora

1.1.4 Sinteza moksonidina i njegovih nečistoća

Put sinteze moksonidina šematski je predstavljen na slici 7. Nitrovanjem dihidroksimetilpirimidina, dobija se intermedijer kod koga se u narednom koraku hidroksilne grupe supstituišu hlorom, a zatim se prethodno uvedena nitro grupa redukuje do amino grupe čime je sintetisan dihaloroaminometilpirimidin, kao ključni intermedijer. Kuplovanjem ključnog intermedijera sa acetilimidazolidinonom, nastaje prekursor u sintezi moksonidina i njegovih nečistoća, N-(1-acetil-4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)-4,6-dihloro-2-metilpirimidin-5-amin. Nukleofilnom supstitucijom atoma hlora na poziciji C-6 metoksi grupom nastaje moksonidin.

U zavisnosti od primenjenih reakcionih uslova, sintetisani moksonidin će biti onečišćen srodnim supstancama koje Evropska farmakopeja navodi kao nečistoće A, B, C i D. U slučaju dodavanja natrijum-metoksida, u različitim rastvaračima (npr. metanol, DMF) i pri visokoj temperaturi reakcija je bila brza, ali je finalni proizvod (moksonidin) bio u velikom stepenu onečišćen nečistoćom B. Pri nižoj temperaturi dolazi samo do deacetilacije prekursora čime u većem stepenu nastaje nečistoća A, dok produženje reakcionog vremena pogoduje stvaranju nečistoće B. Međutim, u slučaju kada je

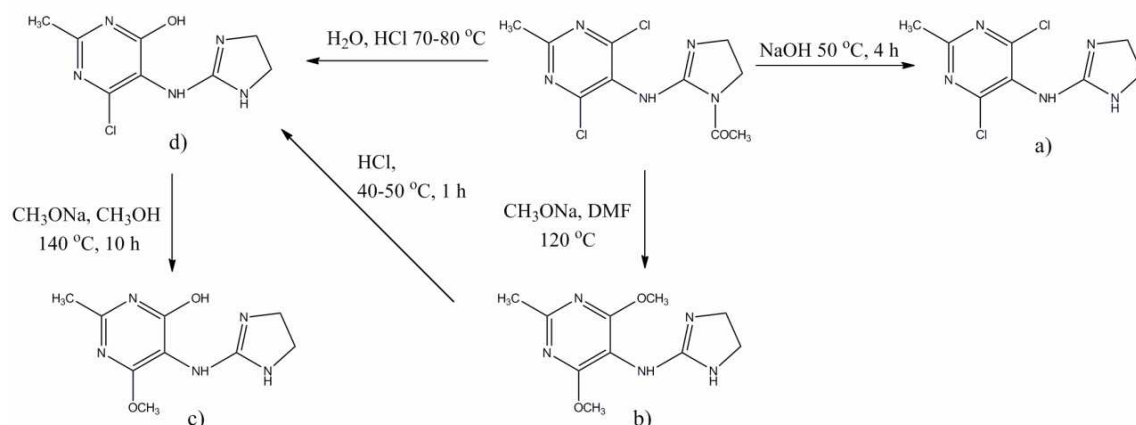
metoksilacija vršena dodavanjem metanola u prisustvu slabije baze (npr. karbonata), supstitucija je bila dovoljno brza uz daleko niži stepen onečišćenja finalnog proizvoda [16].



Slika 7. Šema sinteze moksonidina

Sinteza [^{14}C] trostruko obeleženog moksonidina u svrhu sprovođenja farmakokinetičkih studija i ispitivanja metaboličkog puta moksonidina kod ljudi sprovedena je korišćenjem [1- ^{14}C]-acetamidinhidroklorida i dietil-[1,3- $^{14}\text{C}_2$]-malonata kao polaznih komponenti pri čemu je formiran [2,4,6- $^{14}\text{C}_3$]-4,6-dihidroksi-2-metilpirimidin, kao prekursor iz koga će se gotovo istim putem sinteze koji je prethodno opisan dobiti [$^{14}\text{C}_3$] obeleženi moksonidin [17].

Opisan je takođe i nezavisni put sinteze svih nečistoća moksonidina koje opisuju Evropska farmakopeja (slika 8).



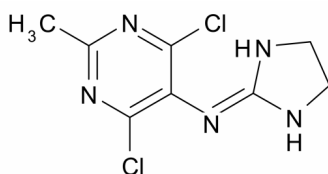
Slika 8. Šema sinteze nečistoća A (a), B (b), C (c) i D (d).

Reakcijom prekursora (N-(1-acetil-4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)-4,6-dihloro-2-metilpirimidin-5-amin) sa natrijum-hidroksidom na temperaturi od 50 °C tokom 4 sata, dolazi do sinteze nečistoće A, dok je nečistoća B sintetisana tretiranjem prekursora u istom vremenskom intervalu sa natrijum-metoksidom (u DMF), na temperaturi od 120 °C. Nečistoća D je sintetisana zagrevanjem prekursora u kiseloj sredini (razblažena hlorovodonična kiselina), dok je nečistoća C dobijena iz nečistoće D zagrevanjem u autoklavu na 140 °C, 10 sati, u prisustvu smeše natrijum-metoksida i metanola. Dodatno, nečistoća D se može dobiti iz nečistoće B, cepanjem etarskih veza na povišenoj temperaturi, u kiseloj sredini [16].

1.1.5 Nečistoće i degradacioni proizvodi moksonidina

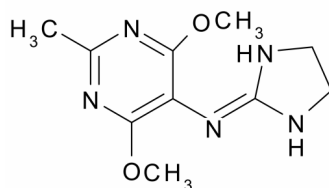
U monografiji Evropske farmakopeje i Britanske farmakopeje [13,14] za moksonidin, opisane su četiri srodne supstance, tj. organske nečistoće moksonidina poznate hemijske strukture. Navedene nečistoće su sintetskog porekla, jer mogu nastati procesom sinteze moksonidina, u zavisnosti od postignutih reakcionih uslova [16].

Nečistoća A ili 6-hloromoksonidin je specificirana srodna supstanca u monografiji Evropske i Britanske farmakopeje, što znači da su za njen sadržaj definisani kriterijumi prihvatljivosti. Hemijska struktura je predstavljena na slici 9, a hemijski naziv je 4,6-dihloro-*N*-(imidazolidin-2-iliden)-2-metilpirimidin-5-amin.



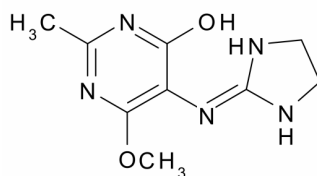
Slika 9. Hemijska struktura nečistoće A

Nečistoća B ili 4-metoksimoksonidin je takođe specificirana srodna supstanca u monografiji Evropske i Britanske farmakopeje. Hemijska struktura je predstavljena na slici 10. Hemijski naziv je *N*-(imidazolidin-2-iliden)-4,6-dimetoksi-2-metilpirimidin-5-amin.



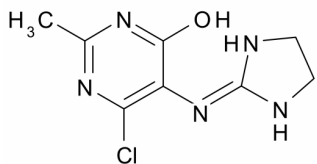
Slika 10. Hemijska struktura nečistoće B

Nečistoća C ili 4-hidroksimoksonidin je srodna supstanca koja nije specificirana u monografiji Evropske i Britanske farmakopeje, već se za nju (isključujući nečistoće A i B) kao kriterijum navodi "bilo koja nečistoća" (eng. *any other impurity*). To znači da nečistoća C mora biti u granicama opšteg kriterijuma prihvatljivosti za sadržaj nečistoća, te nije pojedinačno specificirana. Hemijska struktura je predstavljena na slici 11, a hemijski naziv je 5-[(imidazolidin-2-iliden)amino]-6-metoksi-2-metilpirimidin-4-ol.



Slika 11. Hemijska struktura nečistoće C

Nečistoća D ili 6-desmetilmoksonidin je srodna supstanca koja takođe nije specificirana u monografiji Evropske i Britanske farmakopeje. Hemijska struktura je predstavljena na slici 12, a njen hemijski naziv je 6-hloro-5-[(imidazolidin-2-iliden)amino]-2-metilpirimidin-4-ol.



Slika 12. Hemijska struktura nečistoće D

1.1.6 Pregled literature vezane za analitiku moksonidina i srodnih supstanci

Oficinalna metoda po Evropskoj farmakopeji za ispitivanje moksonidina i njegovih srodnih supstanci je tečna hromatografija. Definisani uslovi uključuju C₈

stacionarnu fazu (250 mm x 4 mm, 5 μm) i mobilnu fazu sastava acetonitril - rastvor natrijum-pentansulfonata (3,48 g L⁻¹) pH 3,5 podešen sa sumpornom kiselinom (136:1000, v/v). Temperatura kolone je 40 °C, protok 1,2 mL min⁻¹, detekcija na 230 nm, dok je predviđena zapremina injektovanja 20 μL [13,14].

Tehnika gasne hromatografije sa masenom detekcijom primenjena je za ispitivanje moksonidina u humanoj plazmi. Pomoću ove metode uspešno je detektovan moksonidin u plazmi do nivoa 40 pg mL⁻¹. Kao stacionarna faza je korišćena kapilarna kolona dužine 60 m i unutrašnjeg prečnika 0,25 mm pakovana DB-5 silikom. Mobilnu fazu je predstavljao gas helijum pri pritisku od 2 bara. Temperatura je menjana u toku analitičkog postupka i kretala se od 250 °C u prvom minutu, posle čega je povećavana za po 10 °C po minuti sve do postizanja 290 °C, što je zatim održavano tokom naredna 3 minuta. U masenom spektrometru je vršena jonizacija analita u negativnom modu primenom energije elektrona od 40 eV, emisionom strujom od 200 μA i temperaturom izvora od 150 °C. Kao reagens gas za fragmentaciju molekulskih jona analita korišćen je metan pod pritiskom od 0,01 mTorr [18].

Za identifikaciju i kvantifikaciju moksonidina iz humane plazme razvijena je i metoda tečne hromatografije sa masenom detekcijom. Uzorci plazme su nakon dodavanja klonidin-hidrohlorida kao internog standarda i natrijum-hidrogen karbonata, prečišćavani tehnikom tečno-tečne ekstrakcije korišćenjem etil-acetata. Nakon centrifugiranja i postupka evaporacije organskog rastvarača, uzorak je rekonstituisan odgovarajućom količinom mobilne faze. Hromatografsko razdvajanje je postignuto na *Lichrospher* ODS koloni (250 mm x 4,6 mm, 5 μm), sa mobilnom fazom sastava acetatni pufer (10 mmol L⁻¹ rastvor amonijum-acetata) i metanol (20:80, v/v), pri temperaturi kolone od 25 °C i protoku od 1 mL min⁻¹. Prilikom detekcije, primenjena je tehnika elektrosprej jonizacije u pozitivnom modu. U jonskom izvoru je kao gas za raspršivanje korišćen azot pri protoku od 10 L min⁻¹, pritisku 40 psi i pri temperaturi od 350 °C [19].

U postupku sinteze moksonidina i njegovih nečistoća opisana je HPLC metoda sa UV detekcijom na 225 nm i gradijentnim eluiranjem mobilne faze sastava acetonitril i voda, dok je pH vrednost podešavana dodatkom fosforne kiseline. Karakterizacija jedinjenja je izvršena primenom DEP-CI-MS-MS (*direct exposure probe-chemical ionisation-tandem mass spectrometry*) tehnike sa kvadrupol jon trap masenim

analizatorom, uz korišćenje metana kao reagens gasa. NMR analize su izvršene u operativnom opsegu 300 MHz (^1H) i 75 MHz (^{13}C). Jedinjenje je prethodno rastvoreno u DMSO- d_6 , dok je merenje izvršeno na 300 K [16].

U postupku sinteze [^{14}C] trostruko obeleženog moksonidina u svrhu sprovođenja farmakokinetičkih studija, primenjena je HPLC metoda radi ispitivanja čistoće dobijenog radio-obeleženog finalnog proizvoda. Hromatografsko razdvajanje je vršeno na Nucleosil- C_8 koloni (250 mm x 4,6 mm), uz korišćenje mobilne faze koja se sastojala iz smeše acetonitrila i 0,02 M rastvora natrijum-pentansulfonata pH vrednosti 3,5 koja je podešena fosfornom kiselinom. Jedinjenja su identifikovana komparacijom rezultata dobijenih TLC i/ili HPLC metodama sa analognim ne-obeleženim izotopomerom [17].

Metabolizam moksonidina je prvi put ispitivan kod *Fisher 344* pacova nakon jednokratnog intravenskog ili oralnog doziranja ^{14}C radioobeleženog moksonidina, kada je više od 15 metabolita identifikovano u različitim biološkim matriksima (urin, plazma, žuč). Metaboliti su identifikovani primenom HPLC metode sa radiohemijskom detekcijom, zatim tečne hromatografije sa masenom detekcijom (LC-MS) i tandemske masene spektrometrije (LC-MS/MS). Određivanje koncentracije moksonidina u uzorcima plazme izvršeno je metodom gasne hromatografije sa masenom detekcijom (GC-MS). Nakon pripreme, uzorak je analiziran u *Hewlett-Packard 5890A* sa 10 M DB-17 kapilarnom kolonom interfejsovanom sa *Finnigan TSQ-45* masenim spektrometrom. Analiza je izvršena u odabranom modu, korišćenjem negativne jon metan hemijske jonizacije. Određivanje metabolita iz urina izvršeno je RP-HPLC metodom, primenom gradijentnog eluiranja u cilju razdvajanja moksonidina i njegovih metabolita. U metodi je korišćena C_{18} *Supelcosil LC-ABZ* kolona (250 mm x 4,6 mm, 5 μm) i *Ramona-92* radiohemijski detektor, dok se mobilna faza sastojala od smeše acetatnog pufera, rastvor A (50 mM amonijum-acetat, pH 5,0) i acetonitrila (rastvor B). Gradijentno eluiranje je započinjalo rastvorom A 100 %, koje se u prvih 20 min menjalo do odnosa A/B 95:5 i pri ovom odnosu zadržano u vremenskom intervalu od 20. do 35. minuta. Protok mobilne faze je bio podešen na 1 mL min^{-1} . Za izvođenje LC-MS i LC-MS/MS analize u cilju karakterizacije metabolita, kao rastvor A korišćen je rastvor 25 mM amonijum-acetata pH 5,0, dok je gradijentni program neznatno izmenjen kako bi se optimizirala separacija iz svakog matriksa. Ova promena je uključivala održavanje A/B 95:5 od 20. do 25. minuta, a zatim promenu na 100 % A od 25. do 26. minuta. Protok

od 1 mL min⁻¹ je bio razdvojen tako da je 250 µL bilo usmereno ka elektrosprej izvoru, dok je 750 µL bilo usmereno ka Ramona 5-LS radiohemijskom detektoru. Uzorci su analizirani u *Finnigan* TSQ 700 masenom spektrometru, elektrosprej jonizacijom u pozitivnom modu, pri naponu od +4500 V i temperaturi kapilare od 270 °C. MS/MS analiza je izvršena pri kolizionoj energiji od -30 eV i pritisku kolizionog gasa argona od 1,5 mTorr [20]. Ova metoda kasnije je iskorišćena u svrhu ispitivanja metabolizma moksonidina i identifikacije metabolita kod pacova, miševa, psa i čoveka [12].

Takođe, u odvojenom ispitivanju metaboličkog profila moksinidina kod čoveka, sprovedenog nakon oralne primene [¹⁴C₃] obeleženog moksonidina, gore opisana metoda je nakon manje modifikacije uspešno primenjena. Naime, prilikom ispitivanja metabolita iz humanog urina, modifikovano je gradijentno eluiranje, tako što je nakon početnih uslova gradijenta od A 100 %, do 12. minuta postignuto A/B 98:2, da bi se od 12,1 do 20. minuta postiglo A/B 97:3, zatim od 20,1 do 40. minuta A/B 96:4 i na kraju do 40,1 minuta gradijent opet vratio na početnih 100 % A. LC-MS/MS analiza takođe je modifikovana u delu gradijentnog eluiranja. Kao rastvor B korišćen je 25 mM amonijum-acetat pH 5,0 dok je gradijentno eluiranje započinjalo sa 100 % A prva dva minuta, nakon čega je do 22. minuta postignut sastav A/B 96:4, koji je održavan do 26. minuta, a zatim vraćen na početnih 100 % A do 27. minuta. Modifikovani uslovi masene spektrometrije obuhvatili su napon od +5000 V i temperaturu kapilare od 250 °C. U istom istraživanju, opisano je određivanje koncentracije moksinidina iz humane plazme i urina. Naime, uzorci plazme i urina su nakon postupka čvrsto-tečne ekstrakcije, eluiranja, uparavanja i rekonstitucije sa 100 mM rastvorom amonijum-acetata injektovani u HPLC-MS/MS sistem, uz primenu hemijske jonizacije pod atmosferskim pritiskom (APCI) [11].

Kad je u pitanju ispitivanje stabilnosti moksonidina, pregledom literature je pronađena samo jedna metoda, i to *stability-indicating* HPTLC metoda za određivanje moksonidina iz tableta.

Određivanje moksonidina i mogućih degradacionih proizvoda nakon izlaganja pripremljenih uzoraka uticaju kisele, bazne i neutralne hidrolize, oksidativnih sredstava, svetlosti i toplote, vršeno je na silika gel 60F254 HPTLC pločama, uz korišćenje mobilne faze sastava metanol, toluen i trietilamin (4:6:0,1, v/v/v). Densitometrijska kvantifikacija je vršena na 266 nm [21].

Ispitivanje molekulske strukture, tautomerizacije i geometrijske izomerije moksonidina vršeno je primenom molekuskog modeliranja, *two-layered* ONIOM (B3LYP 6-311+G(d,p): AM1) metode [2].

Takođe, teorijske studije hemijske strukture, *pKa* vrednosti, lipofilnosti, rastvorljivosti, apsorpcije i polarnosti supstituisanih imidazolina i oksazolina, obuhvatile su i ispitivanje navedenih svojstava moksonidina, primenom nekoliko metoda i kompjuterskih programa (Becke3LYP/6-31+G(d,p) i BP86/TZ2P metoda, SPARC programa itd.) [1].

U okviru ispitivanja separacije 15 gvanidin/imidazolin derivata metodom kapilarne elektroforeze (30 mM fosfatni pufer, pH 1,5 kao *background* elektrolit, koji sadrži 15 mM β -ciklodekstrina (BCD)), ispitivan je i moksonidin. Kapilarna elektroforeza izvedena je pomoću neobložene fuzionisane kapilare (31 cm x 50 μ m, efektivne dužine 23,5 cm) pri temperaturi od 25 °C i naponu od 9 kV. Detekcija je izvršena na 200 nm. Zatim je sprovedeno QSRR ispitivanje kako bi se ustanovila korelacija između migracionog ponašanja tokom elektroforeze i strukturnih, geometrijskih, fizičko-hemijskih, elektronskih osobina optimiziranih liganda i dobijenih BCD kompleksa. Za izračunavanje njihovih molekulskih parametara primenjeni su *ChemPro*, *Marvin 4.0.5 ChemAxon* i *CS Gaussian 98 [B3LYP/6-31G+(d,p) i HF/3-21G(d) basis sets]* programi [22].

Moksonidin je takođe ispitivan u okviru studije 83 strukturno različita jedinjenja primenom tzv. CART (*classification and regression tree*) statističke metode u kontekstu još jedne hromatografske QSRR studije [23].

Imajući u vidu značaj podataka o lipofilnosti/hidrofilnosti supstanci u farmakokinetičkim studijama, određeni broj ispitivanja sproveden je za predstavnike različitih farmakoloških grupa jedinjenja, u okviru kojih je ispitivan i moksonidin. Ispitivanje *n*-oktanol-voda particionog koeficijenta (*logP*) i *pKa* vrednosti vršeno je primenom RP-HPLC pH-gradijentne metode [15]. Takođe, *logP* vrednost je poslužila kao ključni parametar u QSAR studijama, primenom multiple linearne regresije, a čiji je *data set* uključio i molekul moksonidina [24].

1.2 NEČISTOĆE U AKTIVNIM FARMACEUTSKIM SUPSTANCAMA I FARMACEUTSKIM DOZIRANIM OBLICIMA

Prema definiciji datoj u ICH smernicama [25,26] nečistoće predstavljaju bilo koju stranu komponentu prisutnu u novoj aktivnoj farmaceutskoj supstanci ili farmaceutskom doziranom obliku koja ne predstavlja hemijski entitet definisan kao nova aktivna farmaceutska supstanca ili ekscipijens u farmaceutskom doziranom obliku.

Nečistoće u aktivnoj farmaceutskoj supstanci klasifikuju se u sledeće kategorije [25]:

- *Organske nečistoće* (mogu nastati tokom procesa proizvodnje i/ili skladištenja farmaceutske supstance, mogu biti poznate ili nepoznate strukture, isparljive ili neisparljive, a uključuju polazni materijal ili intermedijere, sporedne proizvode, degradacione proizvode, reagense, ligande i katalizatore);
- *Neorganske nečistoće* (mogu nastati tokom procesa proizvodnje, a uključuju reagense, ligande i katalizatore, teške metale, neorganske soli, kao i ostali materijal korišćen tokom procesa proizvodnje (npr. filteri, aktivni ugalj));
- *Rezidualni rastvarači* (mogu biti organskog ili neorganskog porekla, koriste se tokom procesa proizvodnje i obično ih je teško potpuno ukloniti. Podeljeni su u tri klase, prema riziku koji nose po zdravlje ljudi (klasa I, II i III)).

1.2.1 Poreklo nečistoća u aktivnoj farmaceutskoj supstanci i farmaceutskom doziranom obliku

Prisustvo nečistoća u aktivnoj farmaceutskoj supstanci i farmaceutskom doziranom obliku uslovljeno je nizom faktora, a u nastavku su dati samo neki od najčešćih primera koji se odnose na poreklo nečistoća [27]:

- *nečistoće prisutne usled kristalizacije aktivne farmaceutske supstance*: ova vrsta nečistoća se može očekivati kod aktivnih farmaceutskih supstanci koje pokazuju polimorfizam (sposobnost da jedna supstanca postoji u više različitih kristalnih oblika, što takođe može uključiti amorfne oblike i solvatirane ili hidratirane oblike, poznate kao pseudopolimorfi) [28]. Kako polimorfni oblici mogu imati različite fizičke i hemijske osobine i samim tim uticati na brzinu rastvaranja, stabilnost i bioraspoloživost leka, praćenje ove vrste nečistoća je od naročitog značaja u modernoj farmaceutskoj industriji.

- *nečistoće koje potiču od stereohemijskih osobina aktivne farmaceutske supstance*: optički aktivna farmaceutska supstanca može sadržati enantiomerne nečistoće, tj. neželjeni optički izomer koji se smatra hiralnim nečistoćom leka. Broj potencijalno prisutnih hiralnih nečistoća raste sa brojem asimetričnih atoma ugljenika prisutnih u molekuli optički aktivne supstance. Za određeni broj optički aktivnih farmaceutskih supstanci je dokazan bolji farmakološki profil, povećan terapijski indeks, kao i povoljniji profil neželjenih reakcija, ukoliko lek sadrži samo jedan njen aktivni enantiomer. Primer ovakvih aktivnih farmaceutskih supstanci su levofloksacin (*S*-ofloksacin) i esomeprazol (*S*-omeprazol). Stoga je u proizvodnji ovakvih farmaceutskih supstanci veoma bitna kontrola stereoizomera, koji se tretiraju na isti način kao druge potencijalno prisutne organske nečistoće.
- *rezidualni rastvarači* mogu biti organskog ili neorganskog porekla, koriste se tokom procesa sinteze aktivne farmaceutske supstance ili proizvodnje farmaceutskog doziranog oblika, zbog čega se mogu naći kako u farmaceutskoj supstanci, tako i u gotovom doziranom obliku.
- *nečistoće u procesu sinteze aktivne farmaceutske supstance* mogu poticati od polaznog materijala, intermedijernih supstanci i/ili to mogu biti sporedni proizvodi.
- *nečistoće koje nastaju usled mogućih interakcija sa komponentama formulacije*: ova vrsta nečistoća označena je kao degradacioni proizvodi, a mogućnost njihovog nastajanja zavisi od vrste doziranog oblika (čvrsti, tečni...), prirode aktivne farmaceutske supstance i komponenata formulacije. Takođe, njihovo nastajanje može biti katalizovano uslovima sredine tokom procesa proizvodnje doziranog oblika (npr. temperatura, vlaga i svetlost mogu da ugroze stabilnost i umanje farmakološku aktivnost nekih aktivnih farmaceutskih supstanci u doziranim oblicima, kao što su vitamini, antibiotici itd.). Tečni dozirani oblici su podložniji degradaciji i mikrobiološkoj kontaminaciji, pa u njihovom slučaju pH vrednost, kompatibilnost anjona i katjona, interakcije sa ekscipijensima i primarnim pakovnim materijalom predstavljaju važne parametre praćenja stabilnosti gotovog proizvoda; kod čvrstih doziranih oblika prisustvo ekscipijenasa i vlage uzrokuje topohemijske i nukleofilne reakcije. I pored sprovođenja validnih studija stabilnosti u toku preformulacionih ispitivanja, u dosadašnjoj praksi je bilo primera povlačenja leka sa tržišta zbog neadekvatnog doziranog oblika, koji nije bio dovoljno stabilan.

- *nečistoće koje potiču od primenjene metode tokom proizvodnje farmaceutskog doziranog oblika*: ova vrsta nečistoća nastaje pri neodgovarajućem proizvodnom procesu, ili ukoliko tokom proizvodnje optimizovani uslovi (vrednost pritiska, temperature) nisu ispunjeni, npr. završna sterilizacija metodom autoklaviranja kod nekih farmaceutskih supstanci može podstaći intramolekularne ciklične reakcije i tako uzrokovati pojavu nečistoća.
- *nečistoće koje nastaju tokom perioda čuvanja i transporta gotovog farmaceutskog doziranog oblika*: za definisanje ove vrste nečistoća najvažnije je sprovođenje studija stabilnosti.
- *nečistoće koje nastaju usled međusobnih interakcija više aktivnih farmaceutskih supstanci u jednom doziranom obliku*: ova vrsta nečistoća je naročito karakteristična za multivitaminske preparate (npr. prisustvo nikotinamida u formulaciji vitamina iz B grupe uzrokuje značajnu degradaciju tiamina u injekcijama vitamina B kompleksa [29]).
- *nečistoće koje nastaju usled degradacije uslovljene prisustvom reaktivnih funkcionalnih grupa*: estri i amidi podležu hidrolizi; fenoli, konjugovani dieni, heterociklični aromatični prstenovi, nitrozo jedinjenja, nitriti i aldehidi su podložni oksidaciji, dok dekarboksilaciji podležu jedinjenja sa karboksilnom grupom.

Smernice ICH [25,26] jasno definišu prag za prijavljivanje, identifikaciju i kvantifikaciju nečistoća u aktivnoj farmaceutskoj supstanci, odnosno doziranom obliku, na osnovu vrednosti maksimalne dnevne doze. To znači da su nečistoće u aktivnoj farmaceutskoj supstanci iznad praga za prijavljivanje (0,05 %) neidentifikovane nečistoće (nepoznate hemijske strukture, a mogu se definisati kvalitativnim analitičkim parametrima kao što je relativno retenciono vreme) i uključene su u ukupne nečistoće, dok nečistoće iznad praga za identifikaciju (0,1 %) moraju biti identifikovane i uključene su u specifikaciju. Nečistoće iznad praga za kvalifikaciju (0,15 %) moraju imati ispitanu i potvrđenu biološku bezbednost za specificirani nivo.

Nečistoće se obično toksikološki kvalifikuju kada lek treba prvi put da dobije dozvolu za stavljanje u promet, ali i prilikom izmene proizvodnog procesa, kada se pored već postojećih, može očekivati pojava novih nečistoća. Prisustvo nečistoća može se svesti na minimum kontrolom reakcionih uslova tokom procesa sinteze, izborom

visoko kvalitetnog polaznog materijala i reagenasa, kao i uvođenjem dodatnog koraka intermedijernog ili finalnog prečišćavanja [30].

1.2.2 Profil nečistoća

Profil nečistoća predstavlja prikaz identifikovanih i neidentifikovanih nečistoća prisutnih u aktivnoj farmaceutskoj supstanci ili farmaceutskom doziranom obliku. Ispitivanje profila nečistoća predstavlja jednu od najznačajnijih, ali i najzahtevnijih oblasti savremene farmaceutske analize, koja je u fokusu kako farmaceutske industrije, tako i regulatornih tela, jer pruža sledeće prednosti [31]:

- poznavanje hemijske strukture nečistoća u procesu razvoja novog leka, ili prilikom uvođenja novog tehnološkog postupka u proizvodnji postojećeg leka, može da pomogne u definisanju reakcionih uslova pri kojima će se formiranje nečistoća svesti na minimum;
- na osnovu poznavanja hemijske strukture, nečistoća se može sintetisati i time pružiti dodatnu potvrdu svoje strukture, prethodno definisane spektroskopskim metodama;
- sintetisani materijal može poslužiti kao standard nečistoće tokom razvoja selektivne metode za kvantitativno ispitivanje date nečistoće;
- u slučaju glavnih nečistoća, sintetisani ili izolovani materijal se može podvrgnuti toksikološkom ispitivanju, što će pružiti značajne podatke o bezbednosnom profilu leka;
- u slučaju regulatornih tela, profil nečistoća predstavlja značajan pokazatelj kvaliteta i postojanosti proizvodnog procesa *bulk*-a.

Profil nečistoća jedne aktivne farmaceutske supstance dobijene različitim sintetskim putevima može se razlikovati kako u kvalitativnom, tako i u kvantitativnom smislu. U praksi se ovo može zapaziti u slučaju različitih proizvođača jedne aktivne farmaceutske supstance [30].

1.2.3 Nečistoće u ekscipijensima

Većina važećih farmakopeja sadrži monografije oko 200 supstanci koje se koriste kao ekscipijensi. Najčešće korišćeni ekscipijensi u farmaceutskoj industriji su šećeri (laktoza, monohidrat; saharoza), biopolimeri tipa ugljenih hidrata kao što su škrob, mikrokristalna celuloza, derivati celuloze, polimeri tipa polietilenglikola (makrogoli), polivinilpirolidon (povidon), različita ulja biljnog porekla, stearinska

kiselina i magnezijum-stearat, neorganska jedinjenja kao što su kalcijum-fosfat, titan-dioksid. Kako su ekscipijensi u farmaceutskom doziranom obliku u najvećem broju slučajeva kvantitativno znatno više zastupljeni od same aktivne farmaceutske supstance, ispitivanje njihove čistoće i kompatibilnosti je od naročitog značaja [32].

Prilikom ispitivanja kompatibilnosti, dva najvažnija parametra su sposobnost ekscipijensa da apsorbuje vodu pri varijabilnim uslovima vlažnosti, kao i pH vrednost same formulacije farmaceutskog doziranog oblika. Takođe, neophodno je poznavanje sledećih karakteristika [33,34]:

- poznate inkompatibilije datog ekscipijensa sa aktivnom farmaceutskom supstancom ili drugim ekscipijensima (npr. maksimalno redukovanje celuloze kao ekscipijensa u lekovima koji sadrže primarnu i sekundarnu amino grupu);
- potencijalno postojanje efekta stabilizacije datog ekscipijensa (najpoznatiji ekscipijensi sa ovim efektom su ciklodekstrini, koji formirajući hidrofobne šupljine „obavijaju“ molekule aktivne farmaceutske supstance i tako ih štite od degradacije tipa hidrolize, oksidacije ili fotodegradacije);
- potencijalno prisustvo reaktivnih nečistoća u datom ekscipijensu (prisustvo peroksida u polietilenglikolu, povidonu ili kros-povidonu može prouzrokovati degradaciju oksidabilnih aktivnih farmaceutskih supstanci);
- mehaničke osobine datog ekscipijensa (naročito važno kod čvrstih doziranih oblika, u inicijalnoj fazi ispitivanja kompatibilnosti).

1.3 ISPITIVANJE STABILNOSTI LEKA

Osnovni cilj ispitivanja stabilnosti je dobijanje saznanja o uticaju različitih spoljnjih faktora na kvalitet aktivne farmaceutske supstance i farmaceutskog doziranog oblika, u određenom vremenskom periodu.

Pored ispitivanja efikasnosti i bezbednosti koje se obavlja kroz različite faze razvoja leka, od izuzetnog značaja je istovremeno praćenje njegove stabilnosti, koje se odvija na sledeći način [35]:

- *faza I*: ispitivanje stabilnosti u ovoj fazi je kratkotrajno, a odnosi se na definisanje relativne stabilnosti aktivne farmaceutske supstance i njenog puta degradacije, selekciju najadekvatnijeg hemijskog oblika (npr. vrsta soli, estra), ispitivanje kompatibilnosti ekscipijensa i razvoj jednostavnog doziranog oblika za kliničku primenu;

- *faza II*: ova faza podrazumeva razvoj formulacije doziranog oblika i uključuje višestruki *screening* formulacija i pakovnog materijala, koji se izvodi kako kroz probne kratkoročne studije stabilnosti (maksimalnog trajanja do 6 meseci), tako i kroz dugoročne studije (2-3 godine) radi odabira najadekvatnije formulacije;
- *faza III*: ova faza započinje sa definisanim farmaceutskim doziranim oblikom i sadržajem aktivne farmaceutske supstance. Ispitivanje stabilnosti u ovoj fazi obavlja se prema regulatornim smernicama, kako bi se definisali rok trajanja i uslovi čuvanja, u zavisnosti od klimatske zone tržišta za koje je lek namenjen;
- *faza IV*: ova faza se odnosi na period nakon dobijanja dozvole za stavljanje leka u promet, a ispitivanja se vrše radi potvrde da dati gotov proizvod i dalje ispunjava kriterijume definisane odobrenim uslovima čuvanja. Ispitivanje stabilnosti pod ubrzanim uslovima starenja zahteva se u ovoj fazi u slučaju razvoja nove formulacije datog leka, uvođenja nove jačine ili novog pakovanja leka.

Studije stabilnosti se dele na redovne i stres studije ili studije forsirane degradacije.

Redovne studije stabilnosti se vrše prema već utvrđenom protokolu ispitivanja stabilnosti, sa ciljem da se ustanovi ili potvrdi period retestiranja aktivne farmaceutske supstance ili rok upotrebe farmaceutskog doziranog oblika. Prema učestalosti sprovođenja dele se na ubrzane, intermedijerne i dugoročne studije stabilnosti.

Studije forsirane degradacije prema ICH smernici treba sprovoditi samo u određenim fazama razvoja leka, međutim konkretna uputstva vezana za izvođenje istih nisu propisana. Studije forsirane degradacije sprovode se za aktivnu farmaceutsku supstancu, ali i za farmaceutski dozirani oblik [36].

1.3.1 Studije forsirane degradacije

Osnovna svrha izvođenja studija forsirane degradacije je [36,37]:

- brza selekcija i eliminacioni *screening* aktivne farmaceutske supstance i farmaceutskog doziranog oblika u relativno kratkom vremenskom periodu, što može uštedeti resurse za izvođenje redovnih studija stabilnosti koje su dugotrajnije i skuplje;
- određivanje hemijske stabilnosti aktivne farmaceutske supstance u farmaceutskom doziranom obliku;

- utvrđivanje degradacionog puta i degradacionih mehanizama (kao što su hidroliza, oksidacija, termoliza ili fotoliza) aktivne farmaceutske supstance i farmaceutskog doziranog oblika;
- definisanje hemijske strukture degradacionih proizvoda;
- razvoj i validacija metode koja se koristi za praćenje stabilnosti farmaceutskog proizvoda (eng. *stability-indicating method*);
- razvoj stabilne formulacije farmaceutskog doziranog oblika;
- odabir najadekvatnijih uslova sredine i tehnološkog postupka tokom proizvodnog procesa;
- identifikacija uslova pod kojima bi se mogla vršiti dodatna kontrola tokom proizvodnog procesa i perioda čuvanja;
- dobijanje degradacionog profila što sličnijeg onom koji će se pratiti kroz redovne studije stabilnosti;
- ispitivanja kompatibilnosti, odnosno mogućih interakcija u farmaceutskom doziranom obliku između više aktivnih farmaceutskih supstanci, ili između aktivne farmaceutske supstance i ekscipijenasa;
- sticanje naučno opravdanih dokaza za adekvatan odabir primarnog i sekundarnog pakovanja gotovog proizvoda;
- uzorci dobijeni forsiranom degradacijom pružaju mogućnost razlikovanja dobijenih degradacionih proizvoda od sintetskih nečistoća, ili onih nastalih interakcijom više aktivnih farmaceutskih supstanci u formulaciji, ili aktivne farmaceutske supstance i ekscipijenasa.

Studije forsirane degradacije pod odgovarajućim eksperimentalnim uslovima treba da rezultiraju stepenom degradacije aktivne farmaceutske supstance od 5 % do 20 %. Međutim, do navedenog stepena degradacije ne mora nužno doći pod ispitivanim eksperimentalnim uslovima, što ukazuje da je aktivna farmaceutska supstanca stabilna prema ispitivanom stres-agensu. U ovom slučaju ne preporučuje se primena ekstremnih eksperimentalnih uslova, jer se može očekivati generisanje sekundarnih i tercijarnih degradacionih proizvoda, što dodatno otežava interpretaciju rezultata. Odabir eksperimentalnih uslova, njihov intenzitet i trajanje zavisi od hemijske strukture i osobina aktivne farmaceutske supstance. Stresirani uzorci se porede sa nestresiranim

(kontrolnim) uzorcima, kao i sa odgovarajućim blanko uzorcima. Ispitivanje se obično izvodi na jednoj seriji proizvoda [38-40].

Prema opisanim protokolima iz prakse dostupnim u literaturi [41], preporučeno je da se studije forsirane degradacije aktivne farmaceutske supstance izvode ispitivanjem uticaja povišene temperature, vlage, svetlosti, oksidacije kao i hidrolitičke stabilnosti, dok je za ispitivanje farmaceutskog doziranog oblika ključno ispitivanje uticaja povišene temperature, vlage, svetlosti i oksidacije. U slučaju ispitivanja farmaceutskog doziranog oblika odgovarajući blanko uzorak je placebo, na osnovu koga se može utvrditi kompatibilnost ekscipijenasa prisutnih u farmaceutskom doziranom obliku.

Studije forsirane degradacije dakle obuhvataju ispitivanje prema četiri osnovna degradaciona mehanizma: termoliza, hidroliza, oksidacija i fotoliza.

1.3.1.1 Termolitička degradacija

Ova vrsta degradacije odvija se pod uticajem povišene temperature, a obuhvata sledeće hemijske reakcije mehanizme: hidroliza/dehidratacija, izomerizacija/epimerizacija, dekarboksilacija, preuređivanje i neke tipove reakcija polimerizacije. Uticaj temperature na degradaciju aktivne farmaceutske supstance može se utvrditi Arenijusovom jednačinom (1):

$$K=Ae^{-Ea/RT} \quad (1)$$

gde je K specifična brzina reakcije, A je faktor frekvencije, R je univerzalna gasna konstanta, T temperatura izražena u kelvinima, dok je Ea vrednost energije aktivacije. Arenijusova kinetika može pomoći kod utvrđivanja odgovarajuće temperature i dužine trajanja studija termolitičke degradacije. Iako je na osnovu literaturnih podataka prosečna vrednost Ea za većinu aktivnih farmaceutskih supstanci $19,8 \text{ kcal mol}^{-1}$, preporuka je da se kao pretpostavljena vrednost uzima Ea od 15 kcal mol^{-1} , jer empirijski proizilazi da ova vrednost Ea pri svakom porastu temperature od $10 \text{ }^\circ\text{C}$ dovodi do dvostrukog porasta brzine reakcije. Kako ispitivanje uticaja povišene temperature tokom studija forsirane degradacije treba vršiti u inkrementima od $10 \text{ }^\circ\text{C}$ iznad temperaturnih vrednosti na kojima se izvode ubrzane studije stabilnosti (tj. $50 \text{ }^\circ\text{C}$, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ itd.), jasno je da ova preporučena vrednost Ea pruža kontrolisani uvid u brzinu i stepen degradacije na određenoj temperaturi. Međutim, odstupanje od Arenijusove

kinetike može se očekivati već na temperaturama iznad 70 °C - 80 °C, što naročito treba imati u vidu prilikom planiranja eksperimentalnog dizajna. Studije forsirane degradacije pod uticajem povišene temperature i vlage, obično se izvode pri početnim uslovima od 70 °C i 75 % relativne vlažnosti [33,36,38].

1.3.1.2 Hidrolitička degradacija

Ispitivanje hidrolitičke degradacije treba vršiti u širokom opsegu pH vrednosti (tj. u kiselim, baznim i neutralnim uslovima sredine). Za kiselu hidrolizu se preporučuje primena 0,1-1,0 mol L⁻¹ HCl ili H₂SO₄, a za baznu hidrolizu 0,1-1,0 mol L⁻¹ NaOH, KOH ili LiOH. Ispitivanje se vrši u rastvoru, a ukoliko je aktivna farmaceutska supstanca delimično rastvorljiva ili nerastvorljiva, preporučuje se primena korastvarača ili suspenzija aktivne farmaceutske supstance. Najpogodniji korastvarač je acetonitril, dok metanol treba koristiti uz oprez zbog potencijalne reaktivnosti sa elektrofilnim grupama ili intermedijerima degradacije, naročito u kiseloj sredini. Brzina i stepen hidrolitičke degradacije zavise od više faktora, kao što su dielektrična konstanta, polarnost rastvarača, jonska jačina i vrednost površinske energije (kod suspenzije). Ukoliko se potrebni stepen degradacije ne postigne povećanjem koncentracije kiseline/baze ili produženim izlaganjem, ona se može ubrzati povećanjem temperature do najviše 70 °C, jer u suprotnom isparavanje vode i odstupanje od Arenijusove kinetike mogu ugroziti interpretaciju dobijenih rezultata [33,36,38].

1.3.1.3 Oksidacija

Oksidativna degradacija aktivne farmaceutske supstance se zasniva na mehanizmu transfera elektrona koji vodi stvaranju reaktivnih anjona i katjona. Amini, sulfidi i fenoli su naročito podložni ovoj vrsti degradacije, pri čemu nastaju N-oksidi, hidroksilamini, sulfoksidi i sulfoni. Funkcionalne grupe sa nestabilnim atomom ugljenika (benzil, alil, tercijarni atom ugljenika ili onaj u α - poziciji u odnosu na heteroatom) podložne su stvaranju peroksida, hidroksida ili ketona.

U studijama forsirane degradacije najčešće se koristi vodonik-peroksid kao oksidativni agens, mada se mogu koristiti i inicijatori oslobađanja radikala (npr. azobisisobutironitril), joni metala ili kiseonik. Svetlost može indukovati proces fotooksidacije, mehanizmom slobodnih radikala. Odabir vrste oksidacionog agensa, njegove koncentracije i reakcionih uslova zavisi od osobina aktivne farmaceutske

supstance. Preporučuje se ispitivanje primenom 0,3 % (0,02 % - 3 %, ukoliko je neophodno) vodonik-peroksida, pri neutralnom pH i sobnoj temperaturi u trajanju od 7 dana, ili do postignutih 5 % - 20 % degradacije. Ne preporučuje se ispitivanje sa vodonik-peroksidom pri temperaturi iznad 30 °C, jer bi to dovelo do cepanja relativno slabe O-O veze i stvaranja hidroksil-radikala koji su znatno jači oksidativni agensi [33,36,38,42].

1.3.1.4 Fotoliza

Studije fotostabilnosti treba izvoditi u skladu sa ICH Q1B smernicom prema kojoj je za redovne studije stabilnosti uzorak potrebno izlagati svetlosti ukupnog zračenja ne manjeg od 1,2 miliona luks časova i integrisanoj bliskoj ultraljubičastoj energiji ne manjoj od 200 Wh m⁻² [43]. Za izvođenje studija forsirane degradacije zračenje treba da bude najmanje dva puta veće od zračenja predloženog ICH smernicom. U slučaju ispitivanja rastvora, preporučuje se primena acetonitrila kao korastvarača, jer metanol može uzrokovati stvaranje nepoželjnih degradacionih produkata usled nagomilavanja metoksi radikala dobijenih u uslovima stresa [38].

U fotoreaktivna jedinjenja spadaju jedinjenja sa karbonilnom funkcionalnom grupom (npr. aldehidi, ketoni), N-oksidi, alkeni, aril-hloridi, sulfidi, nitro-jedinjenja (aromatična i heterociklična), polieni i jedinjenja sa slabim C-H i O-H vezama [33].

U idealnim uslovima, umanjenje sadržaja ispitivane aktivne farmaceutske supstance pri degradaciji, u odnosu na vrednost pre izlaganja stresu, trebalo bi da u potpunosti kvantitativno korelira sa porastom sadržaja degradacionih proizvoda. ICH smernica navedenu korelaciju definiše se kao ravnoteža mase (eng. *mass balance*) navodeći da se ova vrednost može dobiti izračunavanjem zbira sadržaja aktivne farmaceutske supstance i nastalih proizvoda degradacije, kako bi se videlo koliko je ta vrednost blizu 100 % od početne vrednosti sadržaja aktivne supstance u uzorku pre izlaganja stres uslovima, i na taj način procenila greška metode [33,43].

Međutim, u praksi je poznato dosta primera kada je teško utvrditi ravnotežu mase usled [44]:

- prekomernog stvaranja degradacionih proizvoda kroz složene degradacione mehanizme i interakcije sa ekscipijensima;
- nepotpune detekcije, usled gubitka UV hromofora;

- gubitka aktivne farmaceutске supstance ili nastalih degradacionih proizvoda isparavanjem;
- grešaka ili varijabilnosti u određivanju sadržaja aktivne farmaceutске supstance;
- različitih apsorpcionih karakteristika ispitivane supstance i nastalih degradacionih proizvoda;
- loše rastvorljivosti ispitivane supstance;
- problema u eluiranju ispitivanih supstanci sa kolone.

1.3.2 Metode za ispitivanje stabilnosti

Metoda koja se koristi za praćenje stabilnosti farmaceutskog proizvoda (eng. *stability-indicating method*) omogućava precizno kvantifikovanje aktivne farmaceutске supstance u prisustvu degradacionih proizvoda, sintetskih nečistoća, ekscipijena ili drugih potencijalnih nečistoća, kao i kvantifikaciju samih degradacionih proizvoda [38]. Proaktivni pristup u razvoju *stability-indicating* metode uključuje kao prvi korak izvođenje studija forsirane degradacije. Generisani stres uzorci se zatim koriste u postupku razvoja metode. Poznavanje fizičko-hemijskih osobina ispitivanih supstanci (kao što su rastvorljivost, apsorpcione karakteristike, pK_a vrednost, $\log P$ vrednost) veoma je važno za odabir adekvatne analitičke metode i potrebnih reagenasa. Budući da je najzastupljenija tehnika u razvoju *stability-indicating* metode tačna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC), preliminarna ispitivanja bi u tom slučaju uključila praćenje retencionog vremena aktivne farmaceutске supstance i relativnih retencionih vremena degradacionih proizvoda, dok ukupno vreme trajanja hromatografske analize, naročito u inicijalnoj fazi mora biti 2,5 puta duže od retencionog vremena hromatografskog pika aktivne farmaceutске supstance. Time se obezbeđuje praćenje potencijalno prisutnih pikova onih degradacionih produkata koji se znatno kasnije eluiraju. Tokom optimizacije metode mogu se, po potrebi, vršiti male promene gradijenta, sastava mobilne faze, pH vrednosti, brzine protoka, temperature, dužine ili vrste stacionarne faze, kako bi se omogućilo razdvajanje bliskih pikova ili rešio problem koeluiranja. Odabrani hromatografski uslovi treba da obezbede osetljivost i specifičnost metode, zadovoljavajuću rezoluciju, a uključuju i praćenje ravnoteže mase i čistoće svakog eluiranog pika (tzv. *peak purity* faktora) [38,44,57].

Razvijena i optimizovana *stability-indicating* metoda se zatim validira u skladu sa preporukama datim ICH smernicom [45] kako bi se potvrdila njena linearnost, tačnost, preciznost, osetljivost, specifičnost i robusnost.

1.4 METODE FARMACEUTSKE ANALIZE

U modernoj analitici lekova primenjuje se veliki broj metoda u svrhu kontrole kvaliteta farmaceutskih proizvoda. U zavisnosti od toga da li se metoda zasniva na separacionom mehanizmu ili emisiji/apsorpciji zračenja u određenoj spektralnoj oblasti, mogu se podeliti u dve osnovne grupe: separacione i spektroskopske.

U spektroskopske metode spadaju: UV-VIS spektrofotometrija, spektroskopija u infracrvenoj oblasti spektra (IR), Ramanska spektroskopija, nuklearna magnetna rezonantna spektroskopija (NMR), atomska apsorpciona spektrometrija (AAS) i masena spektrometrija (MS).

Među separacionim metodama koje imaju široku primenu u analitici lekova, izdvajaju se tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC), tečna hromatografija pod ultra visokim pritiskom (UHPLC), gasna hromatografija (GC), fluidna hromatografija pri superkritičnim uslovima (SFC), tankoslojna hromatografija (TLC), visoko-efikasna hromatografija na tankom sloju (HPTLC) i kapilarna elektroforeza (CE).

Međutim, pored navedenih metoda, u savremenoj analitici lekova sve više se primenjuju tzv. hibridne tehnike, koje najčešće podrazumevaju spregu separacione i spektroskopske metode, čime se postiže detaljna strukturalna analiza ispitivanih jedinjenja. Ovo je od naročitog značaja prilikom ispitivanja stabilnosti lekova, definisanja degradacionog profila, kao i u analitici složenih analita sa veoma niskim sadržajem ispitivanih supstanci (npr. ispitivanje biološkog materijala). U tu svrhu najčešće se primenjuje sprega tečne hromatografije sa masenom spektrometrijom (LC-MS ili LC-MS/MS), dok se precizna strukturalna analiza može postići primenom NMR spektroskopije spregnute sa tečnom hromatografijom (LC-NMR) [38].

1.4.1 Tečna hromatografija pod visokim pritiskom

Tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC) spada u podeonu hromatografiju, a razdvajanje se postiže na dodirnoj površini tečne stacionarne i mobilne faze.

Ukoliko je stacionarna faza polarna, a mobilna faza nepolarna u pitanju je HPLC tehnika normalnih faza (NP-HPLC) i pogodna je za razdvajanje polarnih supstanci. Međutim, imajući u vidu da je najveći broj aktivnih farmaceutskih supstanci male polarnosti, u farmaceutskim ispitivanjima daleko veću primenu ima HPLC tehnika reverznih faza (RP-HPLC), gde je stacionarna faza nepolarna ili manje polarna, dok je mobilna faza polarna. U zavisnosti od hemijske strukture ispitivanih komponenti, retencija na stacionarnoj fazi opada sledećim redosledom: alifatična jedinjenja > indukovani dipoli (npr. CCl_4) > permanentni dipoli (npr. CHCl_3) > slabe *Lewis*-ove baze (etri, aldehidi, ketoni) > jake *Lewis*-ove baze (amini) > slabe *Lewis*-ove kiseline (alkoholi, fenoli) > jake *Lewis*-ove kiseline (karboksilne kiseline) [46,47]. Međutim, retencija ne zavisi samo od hemijskih osobina ispitivanog analita, već i od izbora stacionarne faze i sastava mobilne faze, kao i primenjenog tipa eluiranja.

Najčešće korišćene stacionarne faze su na bazi silika gela, dok su modernije stacionarne faze hibridne strukture, te poseduju veću otpornost i bolje performanse. U zavisnosti od dužine ugljovodoničnih lanaca vezanih na površini silike najzastupljenije su C_6 , C_8 , C_{18} stacionarne faze pri čemu bolje retencione osobine u analitici nepolarnih jedinjenja imaju one sa dužim ugljovodoničnim nizom. Dužina HPLC kolona varira od 30 mm do 300 mm, pri čemu je trajanje analize proporcionalno dužini kolone (kraća kolona, kraći analitički *run*), dok se bolja rezolucija postiže korišćenjem dužih kolona. Kod modernijih HPLC kolona veličina čestica se kreće u rasponu od 5 μm do 3 μm , dok je unutrašnji prečnik najčešće 4,6 mm.

Mobilna faza u RP-HPLC analizi je polarna i obično predstavlja smešu organskog rastvarača i vode ili odgovarajućeg pufera. Od organskih rastvarača najzastupljeniji su acetonitril i metanol, dok se kao puferi izdvajaju fosfatni i acetatni. Udeo organskog rastvarača, koncentracija pufera, pH vrednost vodene faze, samo su neke od karakteristika mobilne faze koje značajno utiču na hromatografsko ponašanje analita, te se upravo njihovim variranjem često dolazi do optimalnih hromatografskih uslova.

U hromatografskoj tehnici postoje dva osnovna tipa eluiranja, izokratsko i gradijentno. Kod izokratskog eluiranja sastav mobilne faze se ne menja u toku analize, dok gradijentno eluiranje podrazumeva promenu sastava mobilne faze prema unapred

definisanom programu gradijenta, te se najčešće primenjuje za razdvajanje analita sa većim brojem jedinjenja različite polarnosti.

Osnovni delovi HPLC uređaja su: injektor, kolona, termostat za kolonu, detektor, pumpa, rezervoar sa mobilnom fazom, degaser i sistem za obradu podataka [46,48].

1.4.1.1 Hromatografski parametri

Tri fundamentalna faktora HPLC analize od kojih zavisi separacija (razdvajanje) ispitivanih komponenti su retencija, selektivnost i efikasnost.

Retencija se karakteriše sa više parametara od kojih su najvažniji:

- retenciono vreme (t_r) – vreme koje protekne od unošenja uzorka u hromatografsku kolonu do pojave maksimuma pika na hromatogramu. Na osnovu retencionog vremena vrši se kvalitativna analiza, odnosno identifikacija pika ispitivane komponente, a njegova vrednost najpre zavisi od brzine protoka mobilne faze i dužine kolone;
- faktor kapaciteta ili retencioni faktor (k') predstavlja meru zadržavanja komponente u hromatografskoj koloni, a njegova vrednost se kreće od 0,5 do 20. Poželjno je da k' bude u rasponu 1-10, dok vrednosti $k' > 20$ nisu prihvatljive jer ukazuju na loše eluiranje i izraženu interakciju ispitivane komponente sa stacionarnom fazom, što rezultira dugim trajanjem analize.

Ostali parametri retencije su redukovano retenciono vreme (t_r'), retenciono vreme mobilne faze (t_o), relativno retenciono vreme (RRt) i retenciona zapremina (V_r).

Selektivnost predstavlja meru razdvojenosti dve komponente, a izražava se preko faktora selektivnosti (α). Faktor selektivnosti zavisi od prirode stacionarne faze (C_8 , C_{18} , cijano, fenil), kao i od sastava mobilne faze. Ukoliko je $\alpha = 1$, znači da ispitivane komponente imaju isto retenciono vreme i da separacija nije postignuta, dok vrednost $\alpha \gg 1$ ukazuje na zadovoljavajuću separaciju.

Efikasnost kolone je mera sposobnosti kolone da stvaranjem pikova manje širine obezbedi bolje razdvajanje. Karakteriše se brojem teorijskih platoa (N), visinom ekvivalentnom teorijskom platou (H) i redukovanom visinom (h). Vrednost N je proporcionalna dužini kolone (L), pa se veća efikasnost i bolje razdvajanje može očekivati sa povećanjem dužine kolone. Obrnuto, što je vrednost H niža, broj teorijskih platoa je veći, pa je samim tim i efikasnost kolone veća.

Faktor razdvajanja ili faktor rezolucije (R) zavisi kako od termodinamičkih faktora (retencija i selektivnost), tako i od kinetičkih faktora (širina pika i efikasnost kolone). Razdvajanje na baznoj liniji je postignuto ukoliko je $R > 1,5$ [13,46-49].

Veza između svih navedenih faktora i faktora rezolucije predstavljena je sledećom jednačinom:

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{k}{k+1} \right) \left(\frac{\alpha-1}{\alpha} \right) \quad (2)$$

pri čemu se članovi jednačine redom odnose na efikasnost, retenciju i selektivnost. Detaljnijim uvidom može se zaključiti da član koji se odnosi na selektivnost pokazuje najveći uticaj na vrednost rezolucije. Ukoliko se sagledava jedan kritičan par, hromatografski pikovi će imati veoma bliske vrednosti k' , dok je vrednost α u tom slučaju obično 1,01-1,50. Otuda izrazito male promene vrednosti α , zbog direktne proporcionalnosti razlici $(\alpha-1)$ rezultuju značajnim uticajem na rezoluciju. Povećanjem dužine kolone, npr. za faktor 2, povećava se vrednost N , ali zbog direktne proporcionalnosti rezolucije kvadratnom korenu ovog parametra, njena promena će iznositi oko 40 %. Kad je u pitanju uticaj k' , evidentno je da se samo pri njegovim visokim vrednostima (npr. $k' = 10$) može očekivati da će ovaj član jednačine iznositi približno 1, dok niže vrednosti k' pokazuju slab uticaj na promenu rezolucije [48,49].

Asimetrija pika ili faktor simetrije pika (As) je parametar kojim se definiše kvalitet kolone, ali i odabranih hromatografskih uslova. Idealno simetričan hromatografski pik ili tzv. Gausov pik ima vrednost $As = 1$, ali se njegove optimalne vrednosti kreću u intervalu od 1,0 do 1,2. Zahtev Američke farmakopeje za vrednost ovog parametra (< 2 %) se odnosi na preračun odgovarajuće širine pika na 5 % njegove visine. Generalno, ukoliko je As nešto veća od 1 može se očekivati pojava razvlačenja silaznog dela pika (eng. *tailing*), što ukazuje na to da je kolona prezasićena uzorkom. Suprotno, ukoliko je $As < 1$, dolazi do razvlačenja uzlaznog dela pika (eng. *fronting*) i to je znak da postoji izražena interakcija između ispitivane komponente i stacionarne faze. Pojava *tailing*-a otežava integraciju dobijenih pikova i dodatno redukuje broj teorijskih platoa, što posledično ugrožava rezoluciju ispitivanih komponenti [46-48].

1.4.1.2 Fenomen širenja hromatografskog pika i Van Deemter-ova jednačina

Fenomen širenja hromatografskog pika (eng. *band broadening*) predstavlja jedan od najvećih izazova u savremenoj hromatografskoj analizi, jer se najčešće dovodi u vezu sa vrstom i veličinom čestica stacionarne faze i kvalitetom pakovanja istih u hromatografskoj koloni. O tome svedoči i fulminantan razvoj hemije površine stacionarnih faza kojim se nastoji da se ovaj fenomen svede na minimum, kako bi se dobile kolone što boljih performansi, odnosno što veće vrednosti N , i što manje vrednosti H .

Generalno, niže vrednosti H se postižu primenom nižih protoka mobilne faze, manje viskoznih mobilnih faza, viših temperatura, korišćenjem kolona koje su pakovane česticama manjih dimenzija, kao i sa analitima manjih molekula [48].

Faktori koji dovode do fenomena širenja hromatografskog pika su [46]:

- *eddy* difuzija, javlja se kao posledica toga što iste molekule ispitivane komponente imaju različitu dinamiku kretanja između čestica stacionarne faze, tj. neke molekule usled “vrtložnog” kretanja putuju duže, dok neke imaju kraći put i brže se eluiraju;
- različita distribucija protoka mobilne faze, tako da je protok uvek brži u onim segmentima koji su udaljeniji od same čestice stacionarne faze. Ova pojava, kao i *eddy* difuzija mogu se redukovati korišćenjem kolona sa manjim i što uniformnijim česticama;
- longitudinalna difuzija molekula ispitivanih komponenti u mobilnoj fazi (tj. tendencija molekula ka spontanoj difuziji) - ovaj efekat slabi pri visokim brzinama protoka mobilne faze;
- otpor molekula ispitivane komponente transferu mase između mobilne faze, stacionarne faze, i tzv. stagnirajuće mobilne faze. Zavisi od difuzionog koeficijenta molekula u stacionarnoj fazi kao i od debljine i poroznosti filma kojim su obložene čestice stacionarne faze.

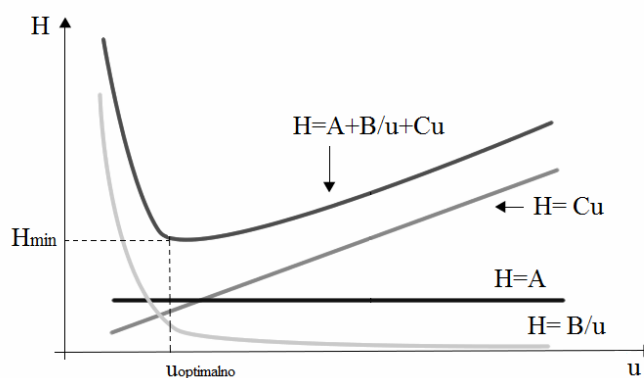
Zavisnost vrednosti H u funkciji protoka mobilne faze (u), i prethodno navedenih faktora izražava se *Van Deemter*-ovom jednačinom:

$$H = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D}{u} + \left(\frac{\omega d_p^2}{D} \right) u \quad (3)$$

gde d_p predstavlja dijametar čestice stacionarne faze, D je difuzioni koeficijent, dok su λ , γ i ω odgovarajuće konstante. Međutim, *Van Deemter*-ova jednačina se najčešće predstavlja u sledećem skraćenom obliku:

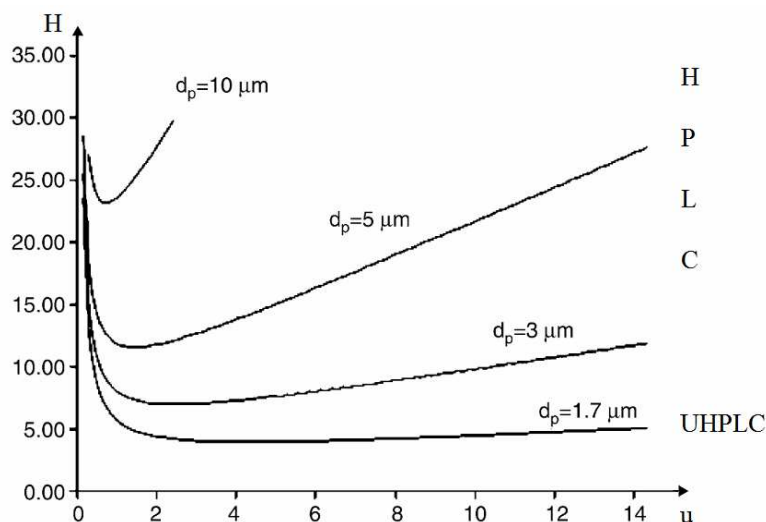
$$H = A + B/u + Cu \quad (4)$$

gde su A , B i C konstante koje se redom odnose na faktor *eddy* difuzije, longitudinalne difuzije i otpor transferu mase. Konstanta B je od značaja u gasnoj hromatografiji, dok je u tečnoj hromatografiji vrednost H direktno zavisna od konstanti A i C . Iz navedene jednačine može se zaključiti da će se manja vrednost H , a samim tim i veća efikasnost kolone postići smanjenjem veličine čestica stacionarne faze i povećanjem difuzionog koeficijenta, čime se smanjuje i vrednost koeficijenta A i C . Grafički prikaz *Van Deemter*-ove krive ($H=f(u)$) predstavljen je na slici 13.



Slika 13. Grafički prikaz *Van Deemter*-ove krive

Jasno se uočava da se smanjenjem veličine čestica postiže veća efikasnost kolone. Međutim, u slučaju čestica veličine $> 5 \mu\text{m}$ sa povećanjem protoka mobilne faze vrednost H ima tendenciju porasta, dok se u slučaju manjih čestica ($< 2 \mu\text{m}$) dobija ne samo značajno niža vrednost H_{min} , već se vrednost ovog parametra održava konstantnom u širokom opsegu protoka mobilne faze (slika 14).



Slika 14. Grafički prikaz *Van Deemter*-ove krive u zavisnosti od veličine čestica stacionarne faze

Kako bi se podaci za kolone sa različitom veličinom čestica lakše poredili, mogu se koristiti redukovani parametri $h \equiv H/d_p$, $v \equiv ud_p/D$, pri čemu se dobija redukovani oblik *Van Deemter*-ove jednačine:

$$h = 2\lambda + \frac{2\gamma}{v} + \omega v \quad (5)$$

Na osnovu dosadašnjih istraživanja, H_{min} ima generalno manju vrednost sa smanjenjem veličine čestica, dok se za h_{min} u slučaju čestica manjih od 2 μm pokazalo da ima neočekivano veću vrednost. Pošto navedeno može ukazivati na činjenicu da primena stacionarnih faza sa malim česticama nema uvek isključivu prednost, brojna istraživanja na polju rasvetljavanja ovog fenomena još uvek su u toku [50-55].

Sa druge strane, u literaturi su dostupni zanimljivi komparativni podaci o unapređenju hromatografskih performansi u zavisnosti od veličine čestica stacionarne faze. Tako je, primera radi, efikasnost tri puta veća primenom čestica od 1,7 μm u odnosu na čestice veličine 5 μm, i dva puta veća u poređenju sa česticama od 3,5 μm. Rezolucija je 70 % veća nego kod stacionarnih faza sa česticama od 5 μm, i 40 % veća nego sa česticama od 3,5 μm. Dužina kolone sa česticama 1,7 μm može biti redukovana za faktor 3 u odnosu na kolone sa 5 μm, dok brzina protoka može biti tri puta veća, a da se pri tome zadrži efikasnost. To znači da bi razdvajanje moglo biti devet puta brže, uz istu vrednost rezolucije. Time se objašnjava izrazito skraćenje analitičkog postupka kod

UHPLC metoda. Osetljivost je takođe veća jer se fenomen širenja hromatografskog pika značajno smanjuje primenom kolona sa redukovanom veličinom čestica [53,56].

1.4.2 Tečna hromatografija pod ultra visokim pritiskom

1.4.2.1 Osnovni principi

Tečna hromatografija pod ultra visokim pritiskom (eng. *ultra high pressure liquid chromatography*, UHPLC) predstavlja novi pravac u razvoju tečne hromatografije, koji se zasniva na primeni stacionarnih faza veoma malih čestica, i znatno višeg radnog pritiska u odnosu na konvencionalnu HPLC tehniku.

Tokom niza godina glavni cilj brojnih istraživanja HPLC tehnike je bio kako skratiti trajanje analize i postići veću efikasnost. Istraživanja su uključila korišćenje kraćih kolona, bržih protoka mobilne faze i viših temperatura sa ciljem postizanja nižeg viskoziteta mobilne faze i povećanja stepena difuzije ispitivanih molekula. Međutim, ovakva rešenja su bila neuspešna, jer su uslovlila pojavu problema visokog pritiska u koloni.

Razvoj UHPLC tehnike zasniva se na principima *Van Deemter*-ove jednačine i intenzivnim ispitivanjima na polju stacionarnih faza malih čestica. Kako je efikasnost kolone obrnuto proporcionalna veličini čestica stacionarne faze, može se očekivati da se smanjenjem istih postiže veća efikasnost kolone, veća rezolucija i smanjenje retencionog vremena. To je uslovlilo razvoj novih stacionarnih faza sa česticama prečnika ispod 2 μm . Međutim, pored veličine čestica stacionarne faze, razvoju UHPLC tehnike doprinelo je i unapređenje njihove geometrije, strukture i načina pakovanja, što je definisano odgovarajućim konstantama *Van Deemter*-ove jednačine (jednačina broj 3). Sa ciljem uvođenja visokog pritiska radi postizanja veće brzine eluiranja, najpre je u HPLC tehnici uvedena kapilarna kolona sa neporoznim ODS-modifikovanim česticama veličine 1,0-1,5 μm . Međutim, kretanje mobilne faze pod znatno većim pritiskom kroz ovu vrstu kolona dovelo je do pojačanog zagrevanja i značajnog porasta temperature mobilne faze. Frikciono zagrevanje i slaba disipacija generisane toplote uslovlile su izraženi aksijalni i radijalni temperaturni gradijent. Ovaj problem je donekle bio prevaziđen smanjenjem unutrašnjeg prečnika kolone. Međutim, iako je postignuta zadovoljavajuća efikasnost i osetljivost, primena malih neporoznih čestica veličine 1,5 μm imala je određene nedostatke, kao što su nizak kapacitet punjenja i

nezadovoljavajuća retencija zbog smanjenja dodirne površine. Ovo je uslovalo razvoj novih potpuno poroznih čestica koje su znatno otpornije na visok pritisak. Međutim, kao i u slučaju HPLC kolona, ovaj tip čestica utiče na pojavu velikog otpora i time generisanja toplote, dok je difuzioni put znatno duži, pa se H vrednost značajno povećava. Konačno, razvojem čestica $< 2 \mu\text{m}$ sa čvrstim jezgrom (eng. *shell core*), značajno je redukovano difuzioni put (površinski porozni omotač iznosi oko $0,35 \mu\text{m} - 0,50 \mu\text{m}$), čime je postignuta visoka efikasnost kolone, značajno suženje hromatografskih pikova i smanjenje otpora, uz mogućnost povećanja protoka mobilne faze u širokom opsegu vrednosti (slika 14) [50,57-65].

Međutim, uvođenje malih čestica samo po sebi ne bi dovelo do značajnog uticaja na razvoj nove tehnike (UHPLC) da hromatografski sistem nije sagledavan u celini. Primena znatno većeg pritiska od onog u konvencionalnoj HPLC tehnici iziskuje pojačanu otpornost svih operativnih delova uređaja pri veoma visokom pritisku, kao i održavanje adekvatne kontrole pritiska u sistemu. To je postignuto unapređenjem rada najpre pumpi i injektora, jer se maksimalna reproduktivnost i kontinuitet njihove funkcije očekuje pri velikim brzinama uzorkovanja veoma malih zapremina uzoraka (ispod $5 \mu\text{L}$). U zavisnosti od odabira detektora, osetljivost UHPLC tehnike je oko 2-3 puta veća od HPLC tehnike. Detektori u UHPLC tehnici moraju omogućiti precizno i kontinuirano registrovanje signala pri ekstremno kratkim ciklusima (često manjim od 1 minuta), kako bi se postigla pouzdana definicija izrazito uskih hromatografskih pikova, zbog čega disperzija mora biti svedena na minimum. U suprotnom, i najmanje zakašnjenje u registrovanju signala značajno može ugroziti tačnost merenja, efikasnost i rezoluciju. Obično se koriste PDA (*photodiode array*), TUV (*tunable UV*), kao i maseni detektor. Kolone su znatno manjeg unutrašnjeg prečnika ($1,0 \text{ mm} - 2,1 \text{ mm}$) u odnosu na HPLC kolone, da bi se između ostalog usled visokog pritiska predupredio fenomen frikcionog zagrevanja, dok im se dužina uobičajeno kreće od $50 \text{ mm} - 100 \text{ mm}$. Razvojem hemije hibridnih stacionarnih faza dobijene su mehanički izuzetno otporne kolone visoke efikasnosti, koje sadrže etilsiloksan/silika hibridne strukture (BEH), danas široko primenjivane u ovoj tehnici. Da bi se povećale performanse i unapredio evidentan potencijal UHPLC tehnike, javila se potreba za konstrukcijom uređaja koji će navedene zahteve ispuniti. Prvi komercijalno dostupan instrumentalni sistem specijalno konstruisan za rad pri vrlo visokom pritisku (do 1000 bara) pojavio se 2004. godine,

pod nazivom Acquity UPLC™ sistem, proizvođača *Waters Corporation*. Termin UPLC™ (eng. *ultra performance liquid chromatography*), je zaštićeni naziv ove kompanije, ali je u svakodnevnoj upotrebi prihvaćen u širem smislu kao termin za novu kategoriju separacione tehnike koja je zadržala principe HPLC tehnike, ali sa značajnim unapređenjem performansi, prevashodno osetljivosti, rezolucije i brzine [50,57,58,66,67].

1.4.2.2 Prednosti i nedostaci UHPLC tehnike i njena primena

Kao jedna od najsavremenijih tehnika tačne hromatografije, UHPLC u odnosu na konvencionalnu HPLC tehniku ima sledeće prednosti [50,53,56-58]:

- značajno skraćanje vremena analize;
- značajno poboljšanje efikasnosti, osetljivosti i selektivnosti metode;
- postizanje visoke rezolucije i efikasnosti pri širokom opsegu protoka mobilne faze, kao i primenom kraćih kolona;
- mogućnost unapređenja postojećih HPLC metoda, transferom na UHPLC metodu;
- veća operativnost i smanjenje troškova zbog uštede vremena, manje zapremine analiziranih uzorka i manje potrošnje rastvarača i mobilne faze (tzv. *greening* strana UHPLC tehnike) [68].

Sa druge strane, sagledavajući potencijalne nedostatke, važno je istaći ograničeno trajanje UHPLC kolona zbog primene visokog pritiska i slabih regenerativnih svojstava čestica stacionarne faze ispod 2 µm, kao i relativno oskudnu raznovrsnost ovog tipa stacionarnih faza. Takođe, veća cena uređaja, rezervnih delova i kolona, moguća pojava diskoordinacije u funkciji detektora i sistema za sabiranje podataka u odnosu na brzinu analitičkog ciklusa (što se direktno odražava na oštrinu pika), posedovanje samo binarnog sistema pumpi, predstavlja neke od zapaženih nedostataka modernih UHPLC uređaja. Imajući u vidu intenzivna istraživanja na polju unapređenja tehničkih performansi, a naročito razvoja hemije ovog tipa stacionarnih faza, može se očekivati da će navedeni nedostaci biti uspešno prevaziđeni [53,56,57].

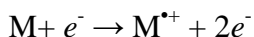
Ova tehnika danas nalazi najveću primenu u analitici lekova (uključujući biljne i tradicionalne lekove), analitici proteina (karakterizacija proteina, monitoring ćelijskih kultura, ispitivanje hrane), identifikaciji i analizi metabolita, u ADME *screening*-u, farmakokinetičkim, toksikološkim i studijama bioekvivalencije, disolucionim testovima, studijama forsirane degradacije i mnogim drugim oblastima.

1.4.3 Masena spektrometrija

1.4.3.1 Osnovni principi

Identifikacija jedinjenja masenom spektrometrijom (MS) se zasniva na jonizaciji molekula uzorka u uslovima visokog vakuuma u cilju dobijanja jona i njihovog međusobnog razdvajanja i detektovanja prema vrednosti m/z (eng. *mass to charge ratio*), koja predstavlja odnos mase i naelektrisanja. Dvodimenzionalni grafički prikaz dobijenih rezultata predstavlja maseni spektar. Na x -osi predstavljene su vrednosti m/z , dok se intenzitet signala, odnosno broj jona (eng. *relative abundance*) očitava na y -osi. Maseni spektar se najčešće sastoji od molekulskih jona, fragmentnih, preuređenih i metastabilnih jona, predstavljenih u vidu serije pikova. Najizraženiji je pik onog jona koji ima najveći intenzitet, a samim tim i najveću stabilnost, zbog čega se naziva i osnovni pik masenog spektra. To je najčešće pik fragmentnog jona, dok je pik molekulskog jona, iako manje izražen (mada može biti i osnovni), najznačajniji za identifikaciju jer je njegova molekulska masa ekvivalentna molekulskoj masi ispitivanog jedinjenja. Međutim, prilikom interpretacije dobijenih masenih spektara, treba imati u vidu zastupljenost izotopa određenih hemijskih elemenata (izotopi sadrže isti broj protona, ali različiti broj neutrona u atomskom jezgru, zbog čega su im atomske mase različite). U analitici organskih jedinjenja najznačajniji izotopi su ^{13}C , ^2H , ^{17}O , ^{15}N , kao i ^{37}Cl i ^{81}Br . U slučaju ugljenika, primera radi, uzima se u obzir sadržaj njegovog izotopa ^{13}C od 1,1 % (odnos $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ je 0,0111). Takođe, u tumačenju masenih spektara može biti od koristi i tzv. pravilo azota, prema kome organsko jedinjenje sa molekulskom masom parnog broja sadrži paran broj azota, dok jedinjenja sa neparnom molekulskom masom sadrže neparan broj atoma azota. Ovo pravilo proizilazi iz činjenice da je atomska masa azota paran, a valenca neparan broj [69-71]. Iako se identifikacija ispitivanog jedinjenja vrši na osnovu dobijenog molekulskog jona u masenom spektru, on ne pruža nikakve informacije o strukturi, što je naročito važno kod ispitivanja nepoznatih jedinjenja. Ova vrsta informacija dobija se interpretacijom masenog spektra nakon fragmentacije jona.

Na primeru elektronske jonizacije, reakcija nastajanja pozitivno naelektrisanog molekulskog jona, tačnije radikal katjona (M^{*+}) od neutralnog molekula (M) može se predstaviti na sledeći način:

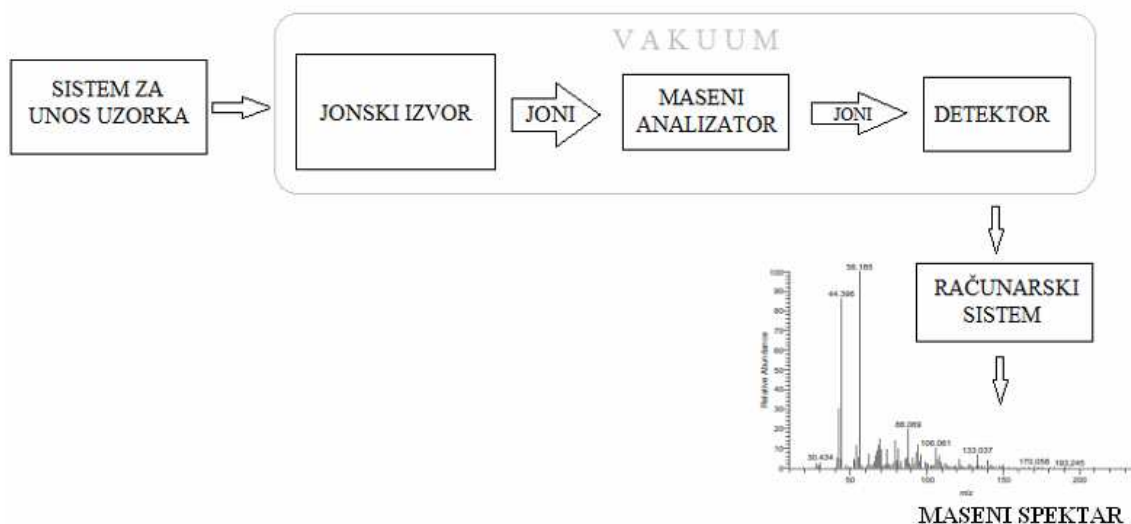


Nakon jonizacije, molekularni jon zadržava višak energije jonizacije. Ukoliko je ova energija veća od energije dovoljne za raskidanje hemijske veze, doći će do fragmentacije molekularnog jona. Proces fragmentacije se obično odvija direktnim raskidanjem hemijske veze i tada je to veoma brz proces, ili intramolekulskim premeštanjem, odnosno preuređivanjem (eng. *rearrangement*), što je relativno sporiji proces. Reakcijom direktnog raskidanja hemijske veze dobijaju se dva fragmenta, dok je preuređivanje znatno kompleksnija reakcija jer podrazumeva ne samo raskidanje hemijskih veza, već i izgradnju novih. Ove reakcije su u odnosu na direktno raskidanje veze termodinamički favorizovane, ali su kinetički veoma zahtevne, jer se moraju odvijati prema sinhronizovanom mehanizmu. Na put fragmentacije, kao i vrstu dobijenih fragmentnih jona utiče više faktora, kao što su: vrsta i jačina hemijskih veza datog jedinjenja, prisustvo funkcionalnih grupa, stabilnost dobijenih fragmentnih jona, unutrašnja energija dobijenih fragmentnih jona i vreme koje protekne od formiranja do detekcije fragmentnog jona. Dobijeni fragmenti obično ukazuju na zastupljenost funkcionalnih grupa, kao i na njihovu poziciju u osnovnoj strukturi, što je veoma važno za definisanje jedinjenja nepoznate strukture [71,72].

1.4.3.2 Maseni spektrometar

Osnovni delovi masenog spektrometra su: sistem za unos uzorka, jonski izvor, maseni analizator, jonski detektor i računarski sistem za prikupljanje podataka. Kako bi se obezbedio nesmetani prenos jona od jonskog izvora do masenog detektora, najveći deo masenog spektrometra funkcioniše u uslovima visokog vakuuma, odnosno pri veoma niskom pritisku, od 10^{-4} - 10^{-7} Pa (slika 15). Uslovi visokog vakuuma dobijaju se zahvaljujući sistemu specijalnih pumpi kojima je uređaj opremljen. Prilikom kretanja jona, neophodno je sprečiti njihovu koliziju sa molekulima, radikalima ili drugim jonima. Bliska rastojanja između jona istog naelektrisanja mogu usloviti skretanje u njihovim putanjama, dok će kontakt između jona suprotnog naelektrisanja rezultirati neutralizacijom. U idealnom slučaju transfer jona do detektora iznosi 100 %. Međutim, u realnom sistemu, joni se kreću u vidu snopa koji pokazuje tendenciju divergiranja, čime se joni rasipaju i gube svoju putanju, a posledica toga je netačna interpretacija

rezultata. U cilju obezbeđivanja efikasne transmisije jona unutar masenog spektrometra, primenjuje se odgovarajuća jonska optika [73,74].



Slika 15. Šematski prikaz masenog spektrometra

Osnovne funkcije masenog spektrometra su sledeće [69,70,73]:

- produkcija jona iz neutralnog uzorka, pomoću jonizatora;
- odvajanje dobijenih jona prema njihovoj m/z vrednosti u masenom analizatoru;
- moguća fragmentacija dobijenih jona i analiza dobijenih fragmenata u sekundarnom analizatoru;
- detekcija jona prispelih u zadnji analizator i merenje njihovog intenziteta pomoću detektora koji prevodi jone u električni signal;
- prenos signala od detektora do kompjutera.

1.4.3.3 Jonizacija u masenom spektrometru

Izbor jonizacione tehnike zavisi od fizičko-hemijskih osobina uzorka, kao i od vrste informacije koja se analizom želi dobiti. Najčešće se primenjuju sledeće jonizacione tehnike [69,70,74]:

- elektronska jonizacija (eng. *electron ionization*, EI) je nespecifična jonizaciona tehnika koja se zasniva na bombardovanju neutralnih molekula analita (M) uvedenih u gasovitom stanju elektronima (energije 70 eV), što rezultira stvaranju molekulskih jona, odnosno katjonskih radikala (M^+). Zbog viška apsorbovane energije usled interakcije sa elektronima, molekulski joni se mogu dalje fragmentisati, pri čemu se dobijaju joni

manje mase (fragmentni joni). Fragmentacijom se dobijaju jedinstvene strukturne informacije, zbog čega dobijeni maseni spektar predstavlja *fingerprint* ispitivanog jedinjenja. EI je pogodna za analizu većine nepolarnih i isparljivih organskih jedinjenja;

- hemijska jonizacija (eng. *chemical ionization*, CI) spada u tehnike tzv. meke jonizacije (eng. *soft ionization*), jer daje stabilnije molekulske jone, malog viška energije zbog čega je fragmentacija svedena na minimum. Zasniva se na jonizaciji reagujućeg gasa (metan, izobutan, amonijak) pri čemu nastaju molekulske jone koji dalje jonizuju neutralne molekule analita;

- bombardovanje brzim atomima (eng. *fast atom bombardment*, FAB) zasniva se na bombardovanju molekula analita rastvorenih u matriksu (sastoji se od slabo isparljivih rastvarača kao što su glicerol, tioglicerol, trietanolamin) snopom neutralnih atoma ili jonskim snopom. Snop neutralnih atoma se dobija jonizacijom najčešće argona ili ksenona, koji se zatim neutrališu protokom kroz kolizionu ćeliju. Jonski snop se dobija jonizacijom molekula cezijuma, i pokazuje veću osetljivost u analitici jedinjenja velikih molekulskih masa;

- matriksom potpomognuta laser desorpciona jonizacija (eng. *matrix-assisted laser desorption/ionization*, MALDI) zasniva se na rastvaranju molekula analita u matriksu, pri čemu se dobijena smeša pre analize mora prevesti u čvrsto stanje. Laserski snop dovodi do rapidnog zagrevanja matriksa, akumulacije energije i raspršivanja jona analita i matriksa koji se zatim u gasovitoj fazi, pod dejstvom elektrostatičkog polja usmeravaju ka analizatoru. MALDI je tehnika izbora u analitici sintetičkih polimera i biopolimera, molekulske mase veće od 100000 Da;

- hemijska jonizacija pod atmosferskim pritiskom (eng. *atmospheric-pressure chemical ionization*, APCI) - analit se uvodi u obliku rastvora, a zatim se pomoću raspršivača prevodi u fini mlaz (aerosol), dok se uparavanje rastvarača postiže prolaskom kroz zagrejanu kvarcnu tubu. Pražnjenjem korone najpre dolazi do jonizacije azota iz jonskog izvora, a daljim nizom uzajamnih reakcija i do stvaranja molekulskih jona analita;

- elektrosprej jonizacija (eng. *electrospray ionization*, ESP) predstavlja široko primenjivanu tehniku jonizacije pod atmosferskim pritiskom. Uzorak rastvoren u isparljivom polarnom rastvaraču uvodi se u usku kapilaru na čijem kraju je generisano jako električno polje (10^6 Vm^{-1}), koje dovodi do nagomilavanja naelektrisanja na

površini tečnosti (na kraju kapilare) i oslobađanja visokonaelektrisanih kapljica. Koaksijalno kretanje gasa omogućava raspršivanje kapljica, koje zatim prolaze kroz struju zagrejanog inertnog gasa (najčešće azota) radi isparavanja molekula rastvarača. Time se kapljice smanjuju, a gustina naelektrisanja na njihovoj površini se povećava. Kada elektrostatičko polje na njihovoj površini postane dovoljno jako, dolazi do desorpcije jona sa površine. ESI je tehnika izbora za analizu polarnih jedinjenja (naročito onih sa višestrukim naelektrisanjem), termolabilnih i jedinjenja velikih molekulskih masa, te nalazi naročitu primenu u biohemijskim i medicinskim ispitivanjima.

Ukoliko se jonizacija vrši pod atmosferskim pritiskom, neophodan je odgovarajući interfejs koji treba da omogući kontrolisano propuštanje jona u vakuumski deo masenog spektrometra.

1.4.3.4 Maseni analizatori

Analizator je deo masenog spektrometra u kome se vrši raspodela dobijenih jona prema njihovom m/z odnosu. Pet osnovnih parametara kojima se mere performanse jednog masenog analizatora su opseg masa, brzina analize, tačnost mase, transmisija i rezolucija. Svi maseni analizatori imaju statičko ili dinamičko električno i magnetno polje, ili kombinaciju oba, pa se u zavisnosti od toga razdvajanje jona postiže na različite načine, što je detaljnije opisano u nastavku [70,74]:

- magnetni analizator (magnetni sektor) vrši razdvajanje jona na osnovu zakrivljenosti njihovih putanja pod dejstvom magnetnog polja. Zakrivljenost putanje zavisi od mase jona i jačine magnetnog polja, dok se primenom elektrostatičkog filtera redukuje distribucija kinetičke energije između jona čime se poboljšava rezolucija i preciznost merenja;
- kvadrupolni maseni analizatori imaju najširu primenu u rutinskim ispitivanjima, a sastoje se od četiri paralelne cevi (elektrode) cirkularnog ili hiperboličnog oblika na poprečnom preseku. Na osnovu stabilnosti jonskih putanja u oscilatornom električnom polju postiže se razdvajanje jona prema njihovom m/z odnosu;
- jonski trap je maseni analizator kod koga se primenom oscilatornog električnog polja “hvataju” (zarobljavaju) joni. U uslovima radiofrekventnog polja, “zarobljavanje” jona se vrši u dve ili tri dimenzije, pa se prema tome jon trap analizatori dele na 2D ili 3D

analizatore. Promenom napona elektrode dolazi do destabilizacije putanje jona određene mase, usled čega se oni “izbacuju” ka detektoru;

- *time-of-flight* maseni analizator (ToF) vrši razdvajanje jona prema vremenu koje je potrebno da joni pređu tzv. region preleta, kojim dolaze do detektora. Nakon inicijalnog ubrzavanja jona primenom električnog polja, joni ulaze u region preleta (eng. *flight tube*) brzinom koju su stekli tokom akceleracije. Kako svi joni imaju istu kinetičku energiju, to će vreme preleta koje zavisi od dužine putanje i brzine njihovog kretanja zapravo biti direktno proporcionalno m/z odnosu.

1.4.4 Sprega tečne hromatografije pod ultra visokim pritiskom i masene spektrometrije (UHPLC-MS)

Osnovne prednosti primene UHPLC-MS tehnike su poboljšana osetljivost i rezolucija, redukcija matriks efekata, mogućnost analize velikog broja uzoraka, kao i primena male zapremine uzorka (što je naročito važno kod ispitivanja biološkog materijala). Međutim, njenim razvojem uočeni su određeni nedostaci koji su usloveli intenzivna istraživanja na polju unapređenja ove složene tehnike.

Kako se u UHPLC analizi dobijaju veoma uski hromatografski pikovi (1 s), to može biti otežavajući faktor u interpretaciji MS rezultata, naročito u kvantitativnoj analizi. Zato MS uređaj mora imati adekvatnu brzinu registrovanja signala prilagođenu brzim analitičkim ciklusima.

Utvrđeno je takođe da uticaj MS na hromatografsko razdvajanje značajno zavisi od unutrašnjeg prečnika kolone. Upotreba UHPLC kolona koje su manjeg unutrašnjeg prečnika u odnosu na HPLC kolone može da uslovi pojavu širenja hromatografskog pika koja nije u vezi sa karakteristikama kolone (eng. *extra-column band broadening*), što je naročito specifično za MS uređaje starije generacije, usled čega efikasnost može biti umanjena i do 90 %. Kod MS uređaja novije generacije, korišćenjem kolona unutrašnjeg prečnika 2,1 mm efikasnost ostaje zadovoljavajuća.

Takođe, značajno brži protok mobilne faze u odnosu na HPLC tehniku, može drastično ugroziti osetljivost UHPLC-ESI-MS metode. Kako bi se ovaj problem predupredio i dodatno povećao nivo kompatibilnosti UHPLC-MS sistema, proizvođači istih su pribegli brojnim tehničkim rešenjima (zasnivaju se na uvođenju izvora sa nebulizirajućim ili zagrejanim gasom da bi se pospešilo uparavanje mobilne faze), mada su ista privilegija samo novijih MS uređaja na tržištu. U slučaju primene MS uređaja

starije generacije takođe su razvijena određena poboljšanja, koja se zasnivaju na strategiji “podele” protoka (eng. *flow splitting*), kako bi se očuvala osetljivost merenja. Budući da izbor tehnike jonizacije zavisi i od molekulske mase jedinjenja, APCI se može primeniti pri uobičajenom protoku. Iako savremeni MS uređaji mogu imati multimodalni jonizacioni izvor, koji omogućava simultano dobijanje podataka kako u ESI, tako i u APCI modu, sprega ovakvih uređaja i UHPLC nije preporučljiva, naročito za izvođenje kvantitativne analize.

Postupak pripreme uzorka u UHPLC-MS analizi je veoma važan imajući u vidu da su dimenzije fritra u ulaznom i izlaznom delu UHPLC kolona desetostruko manje u poređenju sa HPLC kolonama (~ 0,2 µm) zbog čega lako može doći do začepljenja i kvarova prilikom analiza bioloških matriksa. U tom slučaju, preporučuje se primena predkolona ili *in-line* filtera.

Izbor MS uređaja zavisi od vrste analize. Danas su najviše u primeni TOF/MS ili QqTOF/MS. Za tzv. *untarget* analize (određivanje jedinjenja nepoznate strukture iz kompleksnih matriksa) tehnika izbora je sprega UHPLC sa QqTOF/MS ili Orbitrap, uz primenu dužih kolona (150 mm) i produženog trajanja analize (30 minuta). U ove analize spada ispitivanje metaboloma (kolekcija jedinjenja molekulske mase < 1000 g mol⁻¹, kao što su metabolički intermedijeri, sekundarni metaboliti i ostale signalne molekule), kao i ispitivanje metabolizma lekova.

Za tzv. *target* analize (određivanje limitiranog broja poznatih jedinjenja u uzorku) najčešće se primenjuje sprega UHPLC sa QqQ ili TOF/MS, uz korišćenje kraćih kolona (50 mm) i trajanje analize do 3 minuta. Ovde spadaju bioanalitička, biofarmaceutika ispitivanja i *screening* multikomponentnih matriksa. Primena UHPLC/MS tehnike je od nedavno proširena na ispitivanja polarnih jedinjenja i biofarmaceutika [75-77].

1.5 HEMOMETRIJA

Hemometrijski pristup u ispitivanju određenog sistema podrazumeva primenu matematičkih i statističkih metoda radi dizajniranja ili odabira optimalnih mernih procedura i eksperimenata, kao i radi sprovođenja analize dobijenih podataka u cilju sticanja maksimalnog obima informacija o ispitivanom sistemu [78]. U modernoj analitici lekova hemometrija zauzima značajno mesto u planiranju i izvođenju

eksperimenata kako u fazi razvoja, optimizacije i validacije metode, tako i u unapređenju postojećih analitičkih metoda. Eksperimentalni dizajn zauzima značajno mesto i u ispitivanju i predviđanju stabilnosti lekova i razvoju *stability-indicating* metoda.

Osnovni cilj primene eksperimentalnog dizajna je da se na osnovu podataka dobijenih izvođenjem minimalnog broja unapred definisanih eksperimenata stekne što više informacija o ponašanju ispitivanog sistema. Bazira se na simultanom ispitivanju svih uticajnih faktora kroz set planiranih eksperimenata, nakon čega se povezivanje i interpretacija dobijenih eksperimentalnih podataka vrši pomoću odgovarajućih matematičkih modela [79]. Iako je poznat veliki broj različitih vrsta, dizajni se međusobno mogu razlikovati u zavisnosti od: izvedenog matematičkog modela (linearni ili kvadratni, sa ili bez interakcija), nivoa ispitivanih faktora (pun faktorski dizajn, frakcioni faktorski dizajn) i svrhe ispitivanja (*screening*, optimizacioni dizajn) [80]. Za razliku od klasičnog pristupa (eng. *one-at-time-approach*) u kome se vrši optimizacija jednog po jednog faktora, dok se ostali održavaju na konstantnom nivou, eksperimentalni dizajn se zasniva na multifaktorskom pristupu, kada se simultanom promenom ispitivanih faktora stiže uvid o uticaju faktorskih interakcija na posmatrani sistem [81].

Kako se odgovor sistema uvek posmatra u funkciji ispitivanih faktora, jednačina koja ovu vezu uspostavlja u okviru definisane eksperimentalne oblasti data je u vidu polinomne funkcije $y = f(x)b + \varepsilon$, gde je y posmatrani odgovor sistema (zavisno promenljiva), x ispitivani faktor (nezavisno promenljiva), b koeficijent modela kojim se procenjuje direktan uticaj glavnih faktora, dok je ε slučajna eksperimentalna greška.

Najjednostavniji model kojim se opisuje direktan uticaj glavnih ispitivanih faktora na posmatrani odgovor predstavlja linearni model (polinom prvog reda):

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + \dots + b_ix_i + \varepsilon \quad (6)$$

gde je i ukupan broj ispitivanih faktora, dok je b_0 odsečak (srednja vrednost odgovora sistema).

Matematički model kojim se opisuje uticaj interakcija na posmatrani odgovor sistema naziva se interakcioni model i predstavlja se polinomom drugog reda:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + \dots + b_ix_i + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + \dots + b_{(i-1)i}x_{i-1}x_i + \varepsilon \quad (7)$$

pri čemu su interakcije opisane sledećim članovima polinoma $b_{12}x_1x_2, \dots, b_{(i-1)i}x_{i-1}x_i$.

Najsloženiji matematički model kojim se pored uticaja interakcija mogu sagledati nelinearne veze između ispitivanih faktora i odgovora sistema naziva se kvadratni model i predstavljen je sledećim polinomom:

$$y=b_0+b_1x_1+b_2x_2+\dots+b_ix_i+b_{12}x_1x_2+b_{13}x_1x_3+\dots+b_{(i-1)i}x_{i-1}x_i+b_{11}x_1^2+b_{22}x_2^2+\dots+b_{ii}x_i^2+\varepsilon \quad (8)$$

pri čemu su $b_{11}x_1^2 \dots b_{ii}x_i^2$ kvadratni članovi.

Koeficijenti modela se mogu odrediti klasičnim matematičkim proračunom, ili pomoću dizajn matrice, a dobijena vrednost direktno ukazuje na intenzitet uticaja faktora koji dati koeficijent opisuje ili na uticaj faktorskih interakcija. Što je vrednost koeficijenta veća, veći je i navedeni uticaj, dok se + ili – predznak odnosi samo na smer tog uticaja na ispitivani odgovor sistema. Međutim, da bi se značajnost dobijenih koeficijenata modela statistički procenila, najčešće se primenjuje Studentov *t*-test, *F*-test ili grafik verovatnoće normalne raspodele. Za ispravnu statističku obradu podataka važno je randomizirano izvođenje eksperimenata, jer se na taj način nepredvidivi uticaji faktora na odgovor sistema mogu svesti na minimum. Takođe ponavljanjem eksperimenata, najčešće u centralnoj tački određenog dizajna, omogućava se procena eksperimentalne greške kao i procena statističke značajnosti razlike između eksperimentalnih vrednosti i onih dobijenih predviđenim matematičkim modelom. Ipak, ukoliko u eksperimentalnim merenjima nije bilo ponovljenih eksperimenata, procena značajnosti koeficijenata može se izvršiti i preko grafika verovatnoće normalne raspodele. Konačno, procena adekvatnosti uklapanja datog matematičkog modela u eksperimentalno dobijene podatke vrši se primenom analize varijanse (*ANOVA*) [80,82-84].

1.5.1 Eksperimentalni dizajn

U zavisnosti od svrhe ispitivanja kao i njegove faze, eksperimentalni dizajn možemo podeliti na *screening* ili faktorski dizajn, i optimizacioni ili dizajn površine odgovora (eng. *response surface design*). Uzimajući u obzir da ispitivani faktori po prirodi mogu biti veoma raznorodni i različitih mernih jedinica, njihovi nivoi se u eksperimentalnom dizajnu obično kodiraju kao niži, srednji i viši (-1, 0, +1), čime se postiže lakša uporedivost i interpretacija rezultata [81,85].

1.5.1.1 Screening dizajn

U preliminarnim ispitivanjima vrši se odabir faktora koji potencijalno mogu imati značajan uticaj na posmatrani odgovor sistema, kao i osetljivi opseg njihovih vrednosti. Zatim se definisani faktori ispituju primenom *screening* dizajna, od kojih su najpoznatiji pun faktorski, frakcioni faktorski i *Plackett–Burman*-ov dizajn. U pitanju su tzv. faktorski dizajni koji omogućavaju ispitivanje velikog broja faktora na dva nivoa (višem i nižem) izvođenjem relativno malog broja eksperimenata, osim u slučaju punog faktorskog dizajna kada ovaj broj značajno raste sa porastom broja faktora. Opisani su linearnim ili interakcionim matematičkim modelom, te se njima može sagledati glavni uticaj ispitivanih faktora, kao i postojanje interakcija [81,86].

Ukoliko se ispituje manji broj faktora (npr. 2 - 4), najpogodnije je primenjivati pun faktorski dizajn, jer se za k broj ispitivanih faktora na dva nivoa izvodi 2^k eksperimenata, čime su sve kombinacije ispitivanih faktora pokrivena. Međutim, sa brojem faktora značajno raste i broj eksperimenata (npr. za 5 faktora potrebno je izvršiti $2^5 = 32$ eksperimenata), te se za ispitivanje većeg broja faktora u *screening* fazi preporučuje primena frakcionog faktorskog dizajna ili *Plackett–Burman*-ovog dizajna. Kod frakcionog (ili nepotpunog) faktorskog dizajna, za k broj faktora koji se ispituju na dva nivoa potrebno je izvršiti 2^{k-p} eksperimenata, gde p predstavlja stepen frakcionisanja punog faktorskog dizajna. Frakcioni faktorski dizajn podrazumeva izvođenje $1/2, 1/4, 1/8, \dots, 1/2^p$ eksperimenata od broja koji bi se izvodio u punom faktorskom dizajnu, što znači da se izvođenjem ograničenog broja eksperimenata pokriva maksimalni eksperimentalni opseg. Nedostatak faktorskog dizajna je taj što za faktore koji predstavljaju kontinuirane varijable, posmatrani uticaj zavisi od definisane vrednosti nižeg i višeg nivoa. Ukoliko su izabrane vrednosti nivoa suviše blizu, uticaj ispitivanog faktora se može pokazati manje značajnim, uprkos činjenici da u okviru celog opsega faktorskih nivoa njegov uticaj može biti značajan [79,81,85,87].

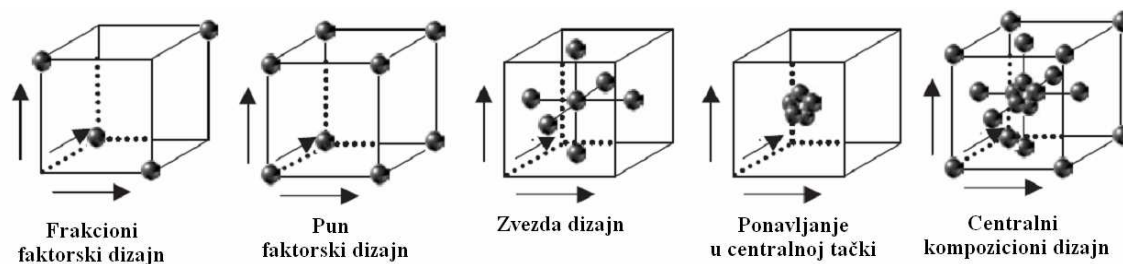
1.5.1.2 Optimizacioni dizajn

Nakon odabira faktora koji najznačajnije utiču na ispitivani odgovor, njihov uticaj se detaljnije ispituje na većem broju nivoa primenom optimizacionog dizajna, u cilju iznalaženja najoptimalnijih vrednosti faktora u zadatom eksperimentalnom opsegu. Kako se ova vrsta dizajna zasniva na metodologiji površine odgovora (eng. *response surface methodology*), poznat je i kao dizajn površine odgovora. Opisan je kvadratnim

matematičkim modelom, te se vizuelna interpretacija postiže konstruisanjem dvodimenzionalnih ili trodimenzionalnih dijagrama u zavisnosti od broja faktora koji se ispituje. Zakrivljenost površine kod trodimenzionalnih dijagrama (kada se ispituje uticaj dva faktora, dok se treći drži na konstantnoj vrednosti) omogućava određivanje najoptimalnijih vrednosti faktora koje se uvek kreću u oblasti gde data površina dostiže svoj maksimum. U zavisnosti od primenjivosti u tzv. asimetričnom domenu, ova vrsta dizajna se može podeliti na simetrični i asimetrični dizajn. U simetrične dizajne, koji pokrivaju samo simetrični region ispitivanog eksperimentalnog domena spadaju pun faktorski dizajn na 3 nivoa, centralni kompozicioni dizajn, *Box–Behnken*-ov dizajn i *Doehlert*-ov dizajn, dok je od asimetričnih najpoznatiji *D-optimal* dizajn [81].

Centralni kompozicioni dizajn je jedan od najčešće primenjivanih optimizacionih dizajna, a dobija se kombinovanjem punog ili frakcionog faktorskog dizajna sa tzv. zvezda dizajnom, uz ponavljanje eksperimenata u centralnoj tački. Konstrukcija centralnog kompozicionog dizajna sa tri ispitivana faktora je predstavljena na slici 16. Ukoliko se koristi pun faktorski dizajn, izvodiće se ukupno $2^k + 2k + c$ eksperimenata, dok će se primenom frakcionog faktorskog dizajna izvoditi $2^{k-p} + 2k + c$ eksperimenata. Član $2k$ se odnosi na zvezda dizajn, koga čine aksijalne tačke, a gradi se variranjem jednog faktora od $-\alpha$ do $+\alpha$, dok se svi ostali faktori drže na konstantnom nivou.

Vrednost α kod ovog dizajna se kreće između 1 i \sqrt{k} . Ukoliko se ispituje 3 faktora, a vrednost α iznosi 1, dobija se centralni kompozicioni dizajn čije se aksijalne tačke nalaze na sredini stranica kocke (kao kubnog eksperimentalnog prostora faktorskog dizajna), orijentisane ka centru (eng. *face centered composite design*). Kod ove vrste dizajna faktori se ispituju na tri nivoa (-1, 0, +1). Međutim, za vrednost $\alpha \neq 1$, broj ispitivanih nivoa se povećava za dva, uzimajući u obzir vrednosti $-\alpha$ i $+\alpha$. U ovom slučaju, aksijalne tačke se nalaze izvan nivoa kvadratnog (za 2 ispitivana faktora), odnosno kubnog (3 ispitivana faktora) eksperimentalnog prostora, te je u izvođenju eksperimenata veća mogućnost pojave eksperimentalne greške [82,83,88].



Slika 16. Konstrukcija centralnog kompozicionog dizajna sa tri ispitivana faktora [89]

Box–Behnken-ov dizajn predstavlja još jedan 3^k optimizacioni dizajn koji se smatra dobrom alternativom centralnog kompozicionog dizajna. Podrazumeva ispitivanje faktora na tri ili više nivoa, uz izvođenje ukupno $2k(k-1)+c$ eksperimenata. Njegova osnovna prednost u odnosu na centralni kompozicioni dizajn ogleda se u manjem broju potrebnih eksperimenata, mogućnosti ispitivanja na većem broju faktorskih nivoa (> 3), kao i u izostavljanju ekstremnih vrednosti faktora (kubne tačke faktorskog dizajna). Zato je veoma pogodan u slučaju kada je eksperimentalno izvođenje u ekstremnim tačkama gotovo nemoguće ili veoma zahtevno. Njegova primena može se razmotriti i u situacijama kada je poznato da se optimum odgovora nalazi u sredini definisanog eksperimentalnog opsega. *Box–Behnken*-ov dizajn poslednjih godina sve više nalazi primenu u hromatografskoj analizi, tokom faze optimizacije metode [80,82,83].

1.5.2 Metodologija multikriterijumskog odlučivanja

U hromatografiji je poznato da veliki broj faktora utiče na hromatografsko ponašanje ispitivanih supstanci. Unapređenje hromatografskih performansi jednog sistema može uključiti najpre postizanje zadovoljavajuće rezolucije, kraćeg trajanja analize, bolje simetrije hromatografskih pikova, manjeg utroška organskog rastvarača ili minimizaciju sadržaja agresivnih reagenasa u mobilnoj fazi, ukoliko je dodavanje istih neophodno. Različita priroda ovih faktora, i heterogenost njihovih mernih jedinica i osega značajno otežava njihovo istovremeno optimizovanje zadovoljavanjem postavljenih ciljeva za svaki faktor pojedinačno. Primenom *Derringer*-ove metode multikriterijumskog odlučivanja omogućena je transformacija dobijenih odgovora sistema u nedimenzionisane tzv. pojedinačne funkcije poželjnih odgovora (d).

Da bi se izračunala pojedinačna funkcija poželjnih odgovora, primenjuju se odgovarajuće jednačine jednostrane ili dvostrane transformacije odgovora sistema. Jednostrana transformacija se koristi u sistemima u kojima se za posmatrani odgovor očekuje postizanje maksimalne ili minimalne vrednosti, što podrazumeva pažljiv odabir navedenih limita od strane iskusnog analitičara. Dvostrana transformacija se primenjuje ukoliko je cilj postizanje određene vrednosti odgovora koji se najčešće već nalazi unutar postavljenih limita. Pojedinačna funkcija poželjnih odgovora može imati vrednost u rasponu od $d=0$ (vrednost odgovora potpuno neprihvatljiva) do $d=1$ (vrednost odgovora savršeno zadovoljena). Tumačenje nivoa poželjnosti na osnovu dobijenih vrednosti funkcije d vrši se pomoću *Harrington*-ove tabele, u kojoj je za svaki redom definisani opseg funkcije d dat odgovarajući opis.

Opšta *Derringer*-ova funkcija poželjnih odgovora (D) izračunava se kao težinska geometrijska sredina pojedinačnih funkcija poželjnih odgovora (d), za svaki posmatrani odgovor sistema. Otuda proizilazi da je $D=1$ ukoliko je za svaku pojedinačnu funkciju poželjnih odgovora postignuta maksimalna vrednost ($d=1$), dok je $D=0$ ukoliko je za makar jedan posmatrani odgovor pojedinačna funkcija potpuno neprihvatljiva ($d=0$). Vrednost opšte funkcije poželjnih odgovora raste kako sa pojedinačnim, tako i sa parcijalnim ili ukupnim porastom vrednosti pojedinačnih funkcija, što na globalnom nivou znači približavanje maksimalnom zadovoljenju svih postavljenih ciljeva [90-95].

2. CILJ RADA

1. Razvoj i optimizacija RP-HPLC metode sa UV detekcijom za određivanje moksonidina i njegovih nečistoća označenih prema Evropskoj farmakopeji kao nečistoća A, B, C i D, primenom eksperimentalnog dizajna.
2. Validacija u cilju rutinske primene predložene RP-HPLC metode za određivanje sadržaja moksonidina i njegovih nečistoća u komercijalno dostupnim farmaceutskim doziranim oblicima.
3. Ispitivanje primarne hemijske stabilnosti moksonidina - aktivne farmaceutske supstance moksonidina i farmaceutskog doziranog oblika sprovođenjem studija forsirane degradacije i identifikacija novonastalih degradacionih proizvoda, primenom UHPLC-MS i UHPLC-MS/MS metoda, kao i definisanje puteva degradacije moksonidina.
4. Razvoj odgovarajuće *stability-indicating* UHPLC-PDA metode i primena eksperimentalnog dizajna u optimizaciji *stability-indicating* metode.
5. Validacija predložene *stability-indicating* UHPLC-PDA metode u cilju potvrde njene primenljivosti u rutinskoj analizi.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1 ANALITIČKA OPREMA, REAGENSI I STANDARDNE SUPSTANCE

3.1.1 Tečni hromatograf sa UV detekcijom

Tečni hromatograf: Agilent 1100 Series (*Agilent Technologies Deutschland GmbH*, Nemačka)

Binarna pumpa: Agilent 1100 Series

Degaser: Agilent 1100 Series

Autosampler: Agilent 1100 Series

Termostat za kolonu: Agilent 1100 Series

Detektor: varijabilni UV/VIS detektor, Agilent 1100 Series

Integracija: Agilent *ChemStation* softver

Kolona: *Symmetryshield*, C₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), *Waters*, SAD

3.1.2 Tečni hromatograf UHPLC sa masenim detektorom

Tečni hromatograf *Accela* UHPLC (*Thermo Fisher Scientific*, SAD)

Kvaternerna pumpa: *Thermo Fisher Electron Corporation*

Degazer: *Thermo Fisher Electron Corporation*

Termostatirani autosampler: *Thermo Fisher Electron Corporation*

Termostat za kolonu: *Thermo Fisher Electron Corporation*

Detektori: *photo diode array* UV/VIS spektrofotometrijski detektor (*Thermo Fisher Electron Corporation*)

Integracija: *Xcalibur 2.0* software, *Thermo Fisher Electron Corporation*

Kolona: *Hypersil Gold aq*, C₁₈ (100 mm x 2,1 mm, 1,9 µm), *Thermo Fisher Scientific*, SAD

Maseni spektrometar *TSQ Quantum Access max triple stage quadrupole* (*Thermo Fisher Scientific*, SAD)

3.1.3 Ostala oprema

Analitičke vage

Mettler, tip XP-205 TDR KL (I) (*Mettler-Toledo AG*, Švajcarska);

Sartorius (*Werke GmbH*, Nemačka).

pH-metri

pH-metar sa kombinovanom staklenom elektrodom: Metrohm tip 780 (*Metrohm*, Švajcarska);

pH-metar sa kombinovanom pH elektrodom: PHM 220 (*Radiometer*, Danska).

Sistem za prečišćavanje vode:

EasyPure RF (*Barnstead*, SAD);

System Simplicity 185 (*Millipore*, SAD).

Ultrazvučno kupatilo:

Tip USK (*EI Niš*, Srbija);

Fungilab, Španija.

Sistem za filtriranje mobilne faze:

Millipore Nylon Membrane, 0,45 μm (*Millipore*, SAD);

Whatman 47 mm Glass/mesh membranski nosač i membranski filteri veličine pora od 0,45 μm (*Alltech Associates*, Belgija).

Sistem za filtriranje uzoraka:

Millex Syringe Driven Filter Unit, Nylon Membrane, 0,45 μm (*Millipore*, SAD);

Econofilter membrane od regenerisane celuloze sa polipropilenom veličine pora 0,45 μm i dijametra 25 mm za filtriranje uzoraka (*Agilent technologies*, SAD).

Centrifuga

Centrifuga *Sigma 2-16* (*SIGMA Laborzentrifugen GmbH*, Nemačka)

Centrifuga *Hettich EBA 8S* (*Andreas Hettich GmbH & Co.KG*, Nemačka)

3.1.4 Reagensi

Metanol - gradient grade (*Merck*, Nemačka)

Metanol - gradient grade (*Lab Scan*, Irska)

Acetonitril - gradient grade (*Merck*, Nemačka)

Voda, HPLC grade

Kalijum-dihidrogenfosfat (*JT Baker*, Holandija)

Orto-fosforna kiselina 85 % p.a. (*Merck*, Nemačka)

Amonijum-acetat p.a. (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Nemačka)

Glacijalna sirćetna kiselina (*Zorka Pharma*, Srbija)

Natrijum-hidroksid (*Centrohem*, Srbija)

Hlorovodonična kiselina 36 % (*Centrohem*, Srbija)

Vodonik-peroksid (*Zorka Pharma*, Srbija)

3.1.5 Standardne supstance, farmaceutski dozirani oblik i komponente placebo

Moksonidin, radni standard (*Chemagis Ltd*, Izrael)

Nečistoća A, radni standard (*Chemagis Ltd*, Izrael)

Nečistoća B, radni standard (*Chemagis Ltd*, Izrael)

Nečistoća C, radni standard (*Chemagis Ltd*, Izrael)

Nečistoća D, radni standard (*Chemagis Ltd*, Izrael)

Moxogamma 0.4[®], film tablete (*Artesan Pharma GmbH & Co. KG*, Nemačka), jedna film tableta sadrži 0,4 mg moksonidina.

Laktoza, monohidrat (*Zorka Pharma*, Srbija)

Magnezijum-stearat (*Merck*, Nemačka)

Povidon K-25 (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Nemačka)

Krospovidon (*B.M.P. Bulk Medicines & Pharmaceuticals GmbH*, Nemačka)

3.1.6 Statistički programi

Design-Expert 7.0.0 (*StatEase*, SAD)

Statistica 5.0 (*StatSoft*, SAD)

Statistica 8.0 (*StatSoft*, SAD)

Excel 2003, u okviru paketa Microsoft Office 2003 (*Microsoft*, SAD)

Excel 2007, u okviru paketa Microsoft Office 2007 (*Microsoft*, SAD)

3.2 PRIPREMA RASTVORA ZA OPTIMIZACIJU RP-HPLC METODE

3.2.1 Priprema osnovnih rastvora standardnih supstanci

Osnovni rastvori moksonidina i nečistoća A, B, C i D pripremljeni su pojedinačno, rastvaranjem u smeši metanola i vode (15:85, v/v) (u daljem tekstu, osnovni rastvarač).

Odmeriti tačno 25 mg standardne supstance moksonidina i preneti u odmerni sud od 25 mL. Do polovine zapremine odmernog suda dodati osnovni rastvarač, tretirati na ultrasoničnom kupatilu 10 minuta, i dopuniti do oznake osnovnim rastvaračem.

Dobijeni osnovni rastvor moksonidina (u daljem tekstu, rastvor *a*) je koncentracije 1 mg mL⁻¹.

Za pripremu osnovnih rastvora nečistoća A, B, C, D potrebno je odmeriti tačno 5 mg standardne supstance svake nečistoće i preneti u odmerni sud od 10 mL. Do polovine zapremine odmernog suda dodati osnovni rastvarač, tretirati na ultrasoničnom kupatilu 10 minuta, i dopuniti do oznake osnovnim rastvaračem. Dobijeni osnovni rastvori nečistoća A, B, C i D (u daljem tekstu, rastvor *b*) su koncentracije 0,5 mg mL⁻¹. Za pripremu sekundarnog razblaženja rastvora *b* nečistoća A, B, C i D (u daljem tekstu, rastvor *c*) potrebno je od rastvora *b* svake nečistoće, otpipetirati 1 mL u odmerni sud od 50 mL, i dopuniti do oznake osnovnim rastvaračem. Dobijeni rastvor *c* svake nečistoće je koncentracije 0,01 mg mL⁻¹.

3.2.2 Priprema rastvora mobilne faze za optimizaciju RP-HPLC metode

Mobilne faze korišćene tokom optimizacije RP-HPLC metode pripremljene su prema planu eksperimenata u centralnom kompozicionom dizajnu (*face centered cube* dizajn) u kome je, osim komponenata mobilne faze (udeo metanola i pH vrednost) ispitivan i uticaj temperature. Vrednosti koje su ispitivani faktori imali na izabranim nivoima date su u tabeli 1, dok je plan eksperimenata za centralni kompozicioni dizajn predstavljen u tabeli 2.

Vodenu komponentu mobilne faze predstavlja 0,05 mol L⁻¹ fosfatni pufer. Za pripremu pufera potrebno je tačno odmeriti 6,80 g kalijum-dihidrogenfosfata i rastvoriti u 1 litru vode, a zatim pH vrednost podesiti dodavanjem *orto*-fosforne kiseline. Sadržaj mobilne faze je menjan prema planu eksperimenata datom u tabeli 2. Pripremljene mobilne faze su pre upotrebe profiltrirane kroz membranski filter (0,45 µm).

3.2.3 Priprema radnih rastvora standardnih supstanci za razvoj i optimizaciju metode

Otpipetirati 1 mL rastvora *a*, 1 mL rastvora *c* nečistoća C i D i 0,5 mL rastvora *c* nečistoća A i B u odmerni sud od 10 mL. Nakon toga odmerni sud dopuniti do oznake mobilnom fazom. Dobijeni radni rastvor standardnih supstanci je koncentracije moksonidina 0,1 mg mL⁻¹, nečistoća C i D 1,0 µg mL⁻¹ i nečistoća A i B 0,5 µg mL⁻¹.

3.3 PRIPREMA RASTVORA ZA VALIDACIJU RP-HPLC METODE

3.3.1 Priprema rastvora mobilne faze za validaciju RP-HPLC metode

Vodenu komponentu mobilne faze predstavlja $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ fosfatni pufer. Za pripremu pufera potrebno je tačno odmeriti 6,80 g kalijum-dihidrogenfosfata i rastvoriti u 1 litru vode, a zatim dodavanjem *orto*-fosforne kiseline podesiti pH vrednost pufera na 3,5. Dobijeni pufer pomešati sa metanolom u zapreminskom odnosu 85:15. Pripremljenu mobilnu fazu pre upotrebe profiltrirati kroz membranski filter ($0,45 \mu\text{m}$).

3.3.2 Priprema rastvora standarda za procenu linearnosti metode

Otpipetirati redom 0,5 mL; 0,7 mL; 0,8 mL; 0,9 mL; 1,0 mL; 1,1 mL; 1,2 mL; 1,3 mL i 1,5 mL rastvora *a* u odmerne sudove od 10 mL. Za nečistoće A i B potrebno je otpipetirati redom 0,05 mL; 0,1 mL; 0,2 mL; 0,3 mL; 0,4 mL; 0,5 mL; 0,6 mL; 0,7 mL i 0,8 mL rastvora *c*, dok je za nečistoće C i D potrebno otpipetirati redom 0,1 mL; 0,2 mL; 0,4 mL; 0,6 mL; 0,8 mL; 1,0 mL; 1,2 mL; 1,4 mL i 1,6 mL rastvora *c*. Odmerni sudovi se zatim dopune mobilnom fazom do oznake. Dobijeni rastvori za ispitivanje linearnosti metode sadrže moksonidin u koncentracijama 0,05; 0,07; 0,08; 0,09; 0,10; 0,11; 0,12; 0,13 i 0,15 mg mL^{-1} , zatim nečistoće A i B u koncentracijama 0,05; 0,10; 0,20; 0,30; 0,40; 0,50; 0,60; 0,70 i 0,80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i nečistoće C i D u koncentracijama 0,10; 0,20; 0,40; 0,60; 0,80; 1,00; 1,20; 1,40 i 1,60 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Na svakom koncentracionom nivou rastvor je injektovan tri puta u hromatografski sistem.

3.3.3 Priprema rastvora standarda za procenu preciznosti metode

Ponovljivost i srednja preciznost metode procenjene su određivanjem moksonidina i nečistoća A, B, C i D iz standardnih rastvora koji su sadržali sledeće koncentracije: moksonidin $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$, nečistoće C i D $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ i nečistoće A i B $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Pripremljeno je po šest ovakvih rastvora, na način koji je opisan u poglavlju 3.2.3.

3.3.4 Priprema rastvora standarda za procenu tačnosti metode

Otpipetirati odgovarajuće zapremine rastvora *a* (0,8; 1,0; 1,2 mL), odnosno odgovarajuće zapremine rastvora *c* nečistoća A i B (0,1; 0,5; 0,7 mL) i nečistoća C i D (0,2; 1,0; 1,4 mL). U svaki odmerni sud (od 10 mL) dodati 256 mg placebo (što odgovara odnosu komponenti u tabletama), odmerne sudove do polovine zapremine dopuniti mobilnom fazom, tretirati na ultrasoničnom kupatilu 10 minuta, i dopuniti

mobilnom fazom do oznake. Dobijeni sadržaj centrifugirati (14 minuta, na 4000 obrtaja u minuti), supernatant zatim odvojiti i filtrirati kroz membranski filter (0,45 μm).

Dobijeni rastvori za ispitivanje tačnosti metode sadrže moksonidin u koncentracijama 0,08; 0,10 i 0,12 mg mL^{-1} , zatim nečistoće A i B u koncentracijama 0,10; 0,50 i 0,70 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i nečistoće C i D 0,20; 1,00 i 1,40 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Za svaki koncentracioni nivo pripremljena su tri uzorka koji su injektovani jedanput u hromatografski sistem.

3.3.5 Priprema rastvora standarda za procenu selektivnosti metode

Za procenu selektivnosti metode korišćeni su: radni rastvor standardnih supstanci, rastvor uzorka i rastvor placeba. Radni rastvor standardnih supstanci pripremljen je na način opisan u poglavlju 3.2.3, dok je rastvor uzorka pripremljen na način opisan u poglavlju 3.4.

Za pripremu rastvora placeba potrebno je odmeriti 256 mg placeba i kvantitativno preneti u odmerni sud od 10 mL, a zatim do polovine zapremine dopuniti mobilnom fazom. Odmerni sud tretirati na ultrasoničnom kupatilu 10 minuta, i dopuniti mobilnom fazom do oznake. Dobijeni sadržaj centrifugirati (14 minuta, na 4000 obrtaja u minuti), supernatant zatim odvojiti i filtrirati kroz membranski filter (0,45 μm).

3.3.6 Priprema rastvora mobilne faze za procenu robusnosti metode

Procena robusnosti metode izvršena je prema planu eksperimenata za *face centered cube* dizajn za faktore koji najviše mogu uticati na ishod analitičke metode, a kao odgovori praćeni su faktori kapaciteta svih ispitivanih komponenti, kao i rezolucija između kritičnih parova. Mobilne faze pripremljene su prema planu eksperimenata datom u tabeli 2, za nivoe ispitivanih faktora koji su navedeni u tabeli 1.

3.3.7 Priprema rastvora za određivanje limita kvantifikacije i limita detekcije

Radni rastvori za određivanje limita kvantifikacije i limita detekcije pripremljeni su u mobilnoj fazi u sledećim koncentracijama: 0,01 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0,02 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0,04 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0,06 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0,10 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0,14 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za moksonidin i 0,01 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0,03 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0,04 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0,07 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0,10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za nečistoće A, B, C i D.

3.4 PRIPREMA RASTVORA UZORKA *MOXOGAMMA 0.4*[®] FILM TABLETA

Ispitivani farmaceutski dozirani oblik su *Moxogamma 0.4*[®], film tablete. Jedna film tableta sadrži 0,4 mg moksonidina. Izmeriti 20 film tableta i izračunati prosečnu

masu jedne tablete. Sa tableta ukloniti film, zatim sprášiti u tarioniku, i dobro homogenizovati. Odmeriti onu količinu tabletne mase koja sadrži 1 mg moksonidina i kvantitativno preneti u odmerni sud od 10 mL. Zatim dodati mobilnu fazu do polovine zapremine odmernog suda, i tretirati na ultrasoničnom kupatilu 10 minuta. Nakon toga odmerni sud dopuniti do oznake mobilnom fazom. Dobijeni sadržaj centrifugirati (14 minuta na 4000 obrtaja u minuti), odvojiti supernatant i filtrirati kroz membranski filter (0,45 μm). Očekivana koncentracija moksonidina u pripremljenom rastvoru uzorka je 0,1 mg mL⁻¹.

3.5 HROMATOGRAFSKA ANALIZA

Hromatografska analiza sa izokratskim eluiranjem izvedena je pod sledećim hromatografskim uslovima:

Kolona: *Symmetryshield*, C₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 μm), *Waters*, SAD

Mobilna faza: metanol - rastvor kalijum-dihidrogenfosfata (0,05 mol L⁻¹) pH 3,5 podešen sa *orto*-fosfornom kiselinom (15:85, v/v)

Temperatura: 25 °C

Talaska dužina: 255 nm

Protok: 1 mL min⁻¹

Volumen injektovanja: 20 μL

HPLC sistem, podešen prema navedenim hromatografskim uslovima, ispiran je mobilnom fazom do postizanja stabilne bazne linije. Podešenost sistema proverena je ponovljenim injektovanjem rastvora standarda do postizanja ujednačenosti površina hromatografskih pikova ispitivanih supstanci, za tri uzastopna injektovanja.

3.6 STUDIJA FORSIRANE DEGRADACIJE I RAZVOJ RP-UHPLC METODE ZA PRAĆENJE STABILNOSTI MOKSONIDINA

3.6.1 Priprema rastvora za studiju forsirane degradacije

3.6.1.1 Priprema rastvora stres agenasa

Kao stres agensi korišćeni u ispitivanju stabilnosti moksonidina u uslovima hidrolize u kiseloj i baznoj sredini korišćeni su rastvori hlorovodonične kiseline 0,05 mol L⁻¹; 0,1 mol L⁻¹ i 0,5 mol L⁻¹) i natrijum hidroksida (1,0 mol L⁻¹; 1,5 mol L⁻¹ i 2,0 mol L⁻¹). Za izvođenje oksidativnog stresa korišćeni su rastvori vodonik-peroksida 3 % (v/v) i 10 % (v/v).

3.6.1.2 Priprema rastvora mobilne faze

Izmeriti 770,8 mg amonijum-acetata i rastvoriti u 1 litru vode (10 mmol L^{-1}), a zatim podesiti pH vrednost pufera na 3,5 dodavanjem glacijalne sirćetne kiseline. Pripremljenu mobilnu fazu pre upotrebe profiltrirati kroz membranski filter ($0,45 \mu\text{m}$).

3.6.1.3 Priprema uzoraka za izvođenje studije forsirane degradacije

Osnovni rastvor moksonidina korišćen u studiji forsirane degradacije pripremljen je prema istom postupkom opisanom u poglavlju 3.2.1.

Rastvori za ispitivanje stabilnosti moksonidina u uslovima kisele, bazne i neutralne hidrolize dobijeni su mešanjem 1 mL rastvora *a* sa 1 mL:

- $0,05 \text{ mol L}^{-1}$; $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ i $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ rastvora hlorovodonične kiseline
- $1,0 \text{ mol L}^{-1}$; $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ i $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ rastvora natrijum hidroksida
- osnovnog rastvora

Nakon odgovarajućeg vremenskog perioda (videti poglavlje 4.3) rastvori podvrgnuti kiseloj i baznoj hidrolizi su neutralisani. Hidrolitička otpornost moksonidina u neutralnoj sredini ispitana je na sobnoj temperaturi, kao i na povišenoj temperaturi ($70 \text{ }^\circ\text{C}$). Ispitivani rastvori su dalje razblaženi mobilnom fazom do postizanja koncentracije moksonidina $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ (računato na nedegradiranu supstancu).

Rastvori za ispitivanje stabilnosti moksonidina u uslovima oksidativnog stresa dobijeni su mešanjem 1 mL rastvora *a* sa 1 mL rastvora vodonik-peroksida 3 % (*v/v*) i 10 % (*v/v*). Nakon odgovarajućeg vremenskog perioda (videti poglavlje 4.3) rastvori su razblaženi mobilnom fazom do postizanja koncentracije moksonidina $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ (računato na nedegradiranu supstancu).

Ispitivanje stabilnosti moksonidina u uslovima termalne degradacije i fotodegradacije izvedeno je na uzorcima aktivne farmaceutske supstance i farmaceutskog doziranog oblika (*Moxogamma 0.4*[®], film tablete) u čvrstom stanju i u rastvoru. Uzorci za ispitivanje fotodegradacije izloženi su uticaju direktne sunčeve svetlosti, dok su uzorci za ispitivanje termalne degradacije podvrgnuti zagrevanju, na temperaturi od $70 \text{ }^\circ\text{C}$.

Nakon odgovarajućeg vremenskog perioda (videti poglavlje 4.3) pripremljen je rastvor aktivne farmaceutske supstance u smeši mobilne faze i metanola (95:5, *v/v*), koncentracije $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ moksonidina. Za pripremu rastvora uzorka odmerena je količina sprašene tabletno mase koja odgovara sadržaju nedegradirane aktivne supstance

od 1 mg. Uzorku je dodat isti rastvarač kao u slučaju rastvora aktivne farmaceutske supstance, a zatim je tretiran na način opisan u poglavlju 3.4 Dobijen je rastvor koncentracije $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ moksonidina (računato na nedegradiranu supstancu).

Ispitivanje stabilnosti u uslovima termalne degradacije i fotodegradacije aktivne farmaceutske supstance i farmaceutskog doziranog oblika u rastvoru izvedeno je odmeravanjem 1 mL osnovnog rastvora moksonidina, odnosno odmeravanjem pripremljenog rastvora uzorka tableta. Nakon izlaganja propisanim uslovima eksperimenta, razblaživanje mobilnom fazom je izvršeno do postizanja koncentracije moksonidina $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ (računato na nedegradiranu supstancu).

Tokom pripreme uzoraka za studiju forsirane degradacije, paralelno su pripremljeni i kontrolni uzorci. Slepna proba je pripremljena i stresirana na isti način kao ispitivani uzorci. Obrnuto, kontrolni uzorci u vremenu nula (eng. *zero time*) su bili pripremljeni na identičan način kao i stresirani uzorci, ali su u odnosu na iste odmah neutralisani i analizirani. Još jedan kontrolni uzorak bio je rastvor supstance bez prisustva stres agensa. U slučaju ispitivanja farmaceutskog doziranog oblika, uporedo je analiziran i placebo rastvor.

3.6.2 Hromatografska analiza i sprega sa masenom spektrometrijom

UHPLC-PDA analiza

Hromatografska analiza sa izokratskim eluiranjem izvedena je pod sledećim hromatografskim uslovima:

Kolona: *Hypersil Gold aq*, C_{18} (100 mm x 2,1 mm, 1,9 μm), *Thermo Fisher Scientific*, SAD.

Mobilna faza: rastvor amonijum-acetata (10 mmol L^{-1}) pH 3,5 podešen sa glacijalnom sirćetnom kiselinom

Temperatura: 55 °C

Talasna dužina: 255 nm

Protok: $450 \mu\text{L min}^{-1}$

Volumen injektovanja: 3 μL

UHPLC-MS analiza

Kolona: *Hypersil Gold aq*, C₁₈ (100 mm x 2,1 mm, 1,9 μm), *Thermo Fisher Scientific*, SAD.

Mobilna faza: metanol - amonijum-acetatni pufer (10 mmol L⁻¹) pH 3,5 podešen sa glacijalnom sirćetnom kiselinom (6:94, v/v)

Temperatura: 55 °C

PDA detektor: 200 nm – 360 nm

Uslovi u jonskom izvoru: elektrosprej jonizacija u pozitivnom modu; *m/z* odnos praćen u opsegu 100-2000 *m/z*; azot je korišćen kao gas za desolvataciju pri pritisku od 20 psi, temperaturi od 400 °C; pritisak gasa za raspršivanje je 45 psi; napon kapilare 4500 V; temperatura kapilare 350 °C.

MS/MS analiza

U jonskom izvoru je primenjena tehnika elektrosprej jonizacije u pozitivnom modu. Azot je korišćen kao gas za desolvataciju pri temperaturi od 400 °C, dok je napon kapilare iznosio 4500 V. Pritisak gasa za raspršivanje je 45 psi. Argon je korišćen kao kolizionni gas. Vrednosti kolizione energije su bile u opsegu 5-31 V pri kolizionom pritisku od 1,9 mTorr za fragmentaciju moksonidina, odnosno u opsegu 1-31 V pri kolizionom pritisku od 1,3 – 1,8 mTorr za fragmentaciju degradacionih proizvoda moksonidina.

3.6.3 Optimizacija *stability-indicating* UHPLC metode**3.6.3.1 Priprema osnovnih rastvora standardnih supstanci**

Osnovni rastvori standardnih supstanci pripremljeni su istim postupkom koji je opisan u poglavlju 3.2.1.

3.6.3.2 Priprema radnih rastvora supstanci za razvoj i optimizaciju metode

Standardni rastvori koji su korišćeni u optimizaciji *stability-indicating* UHPLC metode pripremljeni su na način koji je opisan u poglavlju 3.2.3.

3.6.3.3 Priprema rastvora mobilne faze**3.6.3.3.1 Priprema rastvora mobilne faze za screening eksperimente**

Mobilne faze u *screening* fazi su pripremljene prema definisanim faktorskim nivoima (tabela 14), kao i planu eksperimenata za 2^{4-1} frakcioni faktorski dizajn (tabela 15), odmeravanjem odgovarajuće količine amonijum-acetata (u zavisnosti od koncentracionog nivoa pufera) u 1 litru vode, dok je pH vrednost podešavana dodavanjem glacijalne sirćetne kiseline. Pripremljena mobilna faza je pre upotrebe profiltrirana kroz membranski filter (0,45 μm).

3.6.3.3.2 Priprema rastvora mobilne faze za Box-Behnken optimizacioni dizajn

Tokom faze optimizacije u kojoj su eksperimenti izvedeni prema planu za Box-Behnken dizajn, koncentracija acetatnog pufera je održavana konstantnom (10 mmol L^{-1}). Za pripremu pufera potrebno je tačno odmeriti 770,8 mg amonijum-acetata i rastvoriti u 1 litru vode, a zatim pH vrednost podesiti dodavanjem glacijalne sirćetne kiseline. Sadržaj mobilne faze je menjan prema planu eksperimenata datom u tabeli 15. Pripremljene mobilne faze su pre upotrebe profiltrirane kroz membranski filter (0,45 μm).

3.6.4 Validacija *stability-indicating* UHPLC-PDA metode

Standardni rastvori koji su korišćeni u validaciji *stability-indicating* UHPLC metode pripremljeni su od osnovnih rastvora dobijenih na način koji je opisan u poglavlju 3.2.1.

3.6.4.1 Priprema rastvora mobilne faze za validaciju *stability-indicating* UHPLC-PDA metode

Vodenu komponentu mobilne faze predstavlja 10 mmol L^{-1} acetatni pufer. Za pripremu pufera potrebno je tačno odmeriti 770,8 mg amonijum-acetata i rastvoriti u 1 litru vode, a zatim dodavanjem glacijalne sirćetne kiseline podesiti pH vrednost pufera na 3,43. Dobijeni pufer pomešati sa metanolom u zapreminskom odnosu 0,9:99,1. Pripremljena mobilna faza je pre upotrebe profiltrirana kroz membranski filter (0,45 μm).

3.6.4.2 Priprema rastvora standarda za procenu linearnosti metode

Otpipetirati redom 0,5 mL; 0,8 mL; 1,0 mL; 1,2 mL i 1,5 mL rastvora *a* u odmerne sudove od 10 mL. Za nečistoće A i B potrebno je otpipetirati redom 0,05 mL; 0,2 mL; 0,4 mL; 0,5 mL; 0,6 mL i 0,75 mL rastvora *c*, dok je za nečistoće C i D potrebno otpipetirati redom 0,1 mL; 0,4 mL; 0,8 mL; 1,0 mL; 1,2 mL i 1,5 mL rastvora *c*. Odmerni sudovi se zatim dopune mobilnom fazom do oznake. Dobijeni rastvori za

ispitivanje linearnosti metode sadrže moksonidin u koncentracijama 0,05; 0,08; 0,10; 0,12; i 0,15 mg mL⁻¹, zatim nečistoće A i B u koncentracijama 0,05; 0,20; 0,40; 0,50; 0,60 i 0,75 µg mL⁻¹ i nečistoće C i D u koncentracijama 0,10; 0,40; 0,80; 1,00; 1,20; i 1,50 µg mL⁻¹. Na svakom koncentracionom nivou rastvor je injektovan tri puta u hromatografski sistem.

3.6.4.3 Priprema rastvora standarda za procenu selektivnosti metode

Za procenu selektivnosti metode korišćeni su: radni rastvor standardnih supstanci, rastvor uzorka i rastvor placeba. Radni rastvor standardnih supstanci, pripremljen je na način opisan u poglavlju 3.2.3, dok su rastvori uzorka i placeba pripremljeni na način koji je opisan redom u poglavljima 3.3.5 i 3.4.

3.6.4.4 Priprema rastvora standarda za procenu preciznosti metode

Ponovljivost i srednja preciznost metode procenjene su određivanjem moksonidina i nečistoća A, B, C i D iz standardnih rastvora koje su sadržale sledeće koncentracije: moksonidin 0,1 mg mL⁻¹, nečistoće C i D 1,0 µg mL⁻¹ i nečistoće A i B 0,5 µg mL⁻¹. Pripremljeno je po šest ovakvih rastvora, na način koji je opisan u poglavlju 3.2.3.

3.6.4.5 Priprema rastvora standarda za procenu tačnosti metode

Otpipetirati odgovarajuće zapremine rastvora *a* (0,8; 1,0; 1,2 mL), odnosno odgovarajuće zapremine rastvora *c* nečistoća A i B (0,4; 0,5; 0,6 mL) i nečistoća C i D (0,8; 1,0; 1,2 mL). U svaki odmerni sud (od 10 mL) dodati 256 mg placeba (što odgovara odnosu komponenti u tabletama), odmerne sudove do polovine zapremine dopuniti mobilnom fazom, tretirati na ultrasoničnom kupatilu 10 minuta, i dopuniti mobilnom fazom do oznake. Dobijeni sadržaj centrifugirati (14 minuta, na 4000 obrtaja u minuti), supernatant zatim odvojiti i filtrirati kroz membranski filter (0,45 µm). Dobijeni rastvori za ispitivanje tačnosti metode sadrže moksonidin u koncentracijama 0,08; 0,10 i 0,12 mg mL⁻¹, zatim nečistoće A i B u koncentracijama 0,40; 0,50 i 0,60 µg mL⁻¹ i nečistoće C i D 0,80; 1,00 i 1,20 µg mL⁻¹. Za svaki koncentracioni nivo pripremljena su tri uzorka koji su injektovani jedanput u hromatografski sistem.

3.6.4.6 Priprema rastvora mobilne faze za procenu robusnosti metode

Procena robusnosti metode izvršena je prema planu eksperimenata za *Box Brenhken* dizajn, za faktore koji najviše mogu uticati na ishod analitičke metode, a kao odgovor praćena je rezolucija između svih ispitivanih komponenti. Mobilne faze pripremljene su u skladu sa planom eksperimenata u tabeli 18, za nivoe ispitivanih faktora koji su navedeni u tabeli 17.

3.6.5 Priprema rastvora uzorka *Moxogamma 0.4*[®] film tableta

Rastvori uzorka koji su korišćeni u validaciji *stability-indicating* UHPLC metode pripremljeni su prema postupku koji je opisan u poglavlju 3.4, uz korišćenje mobilne faze pripremljene prema postupku opisanom u poglavlju 3.6.4.1.

3.6.6 Hromatografska analiza

Hromatografska analiza sa izokratskim eluiranjem izvedena je pod sledećim hromatografskim uslovima:

Kolona: *Hypersil Gold aq*, C₁₈ (100 mm x 2,1 mm, 1,9 µm), *Thermo Fisher Scientific*, SAD.

Mobilna faza: metanol - rastvor amonijum-acetata (10 mmol L⁻¹) pH 3,43 podešen sa glacijalnom sirćetnom kiselinom (0,9:99,1, v/v)

Temperatura: 50,13 °C

Talasna dužina: 255 nm

Protok: 870 µg min⁻¹

Volumen injektovanja: 3 µL

UHPLC sistem, podešen prema navedenim hromatografskim uslovima, ispiran je mobilnom fazom do postizanja stabilne bazne linije. Podešenost sistema proverena je ponovljenim injektovanjem rastvora standarda do postizanja ujednačenosti površina hromatografskih pikova ispitivanih supstanci, za tri uzastopna injektovanja.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1 RAZVOJ RP-HPLC METODE ZA ODREĐIVANJE MOKSONIDINA I NJEGOVIH NEČISTOĆA

4.1.1 Preliminarna ispitivanja i izbor osetljive oblasti eksperimenta

Oficinalna metoda tečne hromatografije za određivanje sadržaja moksonidina i njegovih srodnih supstanci zasniva se na primeni mobilne faze sa jon par reagensom [13,14]. Formiranje jonskih parova omogućava bolju retenciju analita na nepolarnoj stacionarnoj fazi. Iako se oficinalnom metodom razdvajanje komponenti odvija na povišenoj temperaturi kolone (40 °C), predviđeno retenciono vreme moksonidina je oko 11,6 minuta, dok je ukupno trajanje analize dvostruko duže (oko 23 minuta). Oficinalna monografija opisuje hemijsku strukturu sve četiri poznate nečistoće moksonidina, međutim kao specificirane tj. one za koje su definisani kriterijumi prihvatljivosti, navodi samo nečistoće A i B, dok se C i D tretiraju kao ostale nečistoće. Farmakopeja takođe daje vrednosti relativnog retencionog vremena za nečistoću A koje iznosi oko 0,9 i za nečistoću B oko 1,7 u odnosu na retenciono vreme moksonidina.

Poznato je da primena mobilne faze sa jon par reagensom uzrokuje produženu ekvilibraciju, dok sami jonski parovi snažno interaguju sa stacionarnom fazom, ometajući pritom reproduktivnost retencionog vremena ispitivanih supstanci, i dodatno otežavajući završno ispiranje kolone i njeno održavanje. Takođe, povišena radna temperatura kolone vremenom dovodi do njenog bržeg uništavanja. Navedene činjenice, kao i dugotrajnost hromatografske analize, evidentno ograničavaju rutinsku primenjivost oficinalne metode.

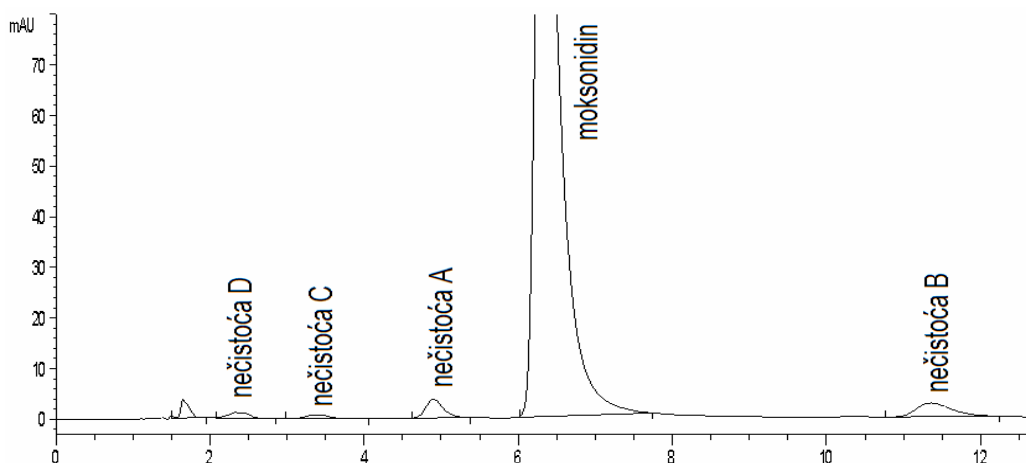
Sagledavajući opisane nedostatke, kako je već definisano u cilju ovog rada, razvijena je jednostavna i brza RP-HPLC metoda za određivanje moksonidina u prisustvu njegovih nečistoća, koja ne podrazumeva tehniku jonskih parova i time doprinosi značajnom unapređenju analitike moksonidina.

U osnovi hemijske strukture moksonidina i njegovih nečistoća A, B, C i D nalaze se dva heterociklična prstena, pirimidinski i imidazolidinski. Strukturnu razliku između moksonidina i njegovih nečistoća čini samo jedan supstituent (-OCH₃, -Cl ili -OH) na položaju C-4 ili C-6 pirimidinskog prstena. Ova činjenica ukazuje na izraženu strukturnu sličnost ispitivanih jedinjenja, čije se hromatografsko ponašanje samim tim prevashodno zasniva na hemijskim osobinama prisutnog supstituenta. Takođe,

postojanje strukturne sličnosti jedinjenja u višekomponentnom analitu dodatno otežava razvoj izokratske metode.

Izbor pH oblasti za ispitivanje hromatografskog ponašanja moksonidina bio je zasnovan na stepenu zastupljenosti molekulskog oblika u zavisnosti od pH vrednosti rastvora (videti poglavlje 1.1.3). Kako se u rastvorima sa $\text{pH} > 5$ značajnije povećava udeo molekulskog oblika moksonidina koji ima veći afinitet ka nepolarnoj stacionarnoj fazi, može se očekivati da bi u ovim uslovima trajanje analize bilo prolongirano, i prema tome neprihvatljivo za rutinsku primenu. Sa druge strane, protonovani oblici moksonidina dominiraju u veoma kiseloj sredini ($\text{pH} < 2,4$), ali se zbog ograničene stabilnosti stacionarne faze, preporučuje izbegavanje rada pri pH vrednosti mobilne faze ispod 2. Navedeni razlozi uzeti su u obzir prilikom definisanja opsega kisele pH oblasti za hromatografsko ispitivanje moksonidina.

Preliminarna ispitivanja hromatografskih uslova započeta su na stacionarnoj fazi istog pakovanja i dužine kao u oficinalnoj metodi (*Zorbax SB*, C_8 , 250 mm x 4,6 mm, 5 μm), dok je iz mobilne faze isključen jon par reagens, pa je ista predstavljala smešu različitih odnosa acetonitrila i vode, u oblasti kisele pH vrednosti. Ispitivanja su vršena bez zagrevanja kolone, međutim, i pored toga navedeni uslovi su se pokazali kao izrazito neretencioni. Primena nešto polarnije stacionarne faze (kolone *Zorbax SB CN* i *Zorbax SB Phenyl*, C_8 , 150 mm x 4,6 mm, 5 μm) očekivano je dovela do neretencionog ponašanja i tako dodatno potvrdila lipofilan karakter ispitivanih jedinjenja. U cilju poboljšanja retencionih osobina ispitivanih supstanci, odlučeno je da se dalje hromatografsko ispitivanje vrši na C_{18} stacionarnoj fazi. Ovaj tip stacionarne faze sadrži duge ugljovodonične C_{18} lance što ove kolone izdvaja po veoma niskoj polarnosti, zbog čega se slabo polarna jedinjenja na njima duže zadržavaju i sporije eluiraju. Očekivano, moksonidin kao i njegove nečistoće pokazali su zadovoljavajuću retenciju na ispitivanim kolonama (*Zorbax SB*, C_{18} , 150 mm x 4,6 mm, 5 μm ; *Zorbax SB*, C_{18} , 250 mm x 4,6 mm, 5 μm ; *Xterra*, C_{18} , 150 mm x 4,6 mm, 5 μm ; *Xterra RP*, C_{18} , 250 mm x 4,6 mm, 5 μm), ali je zapažena pojava izraženog *tailing*-a aktivne supstance (slika 17).

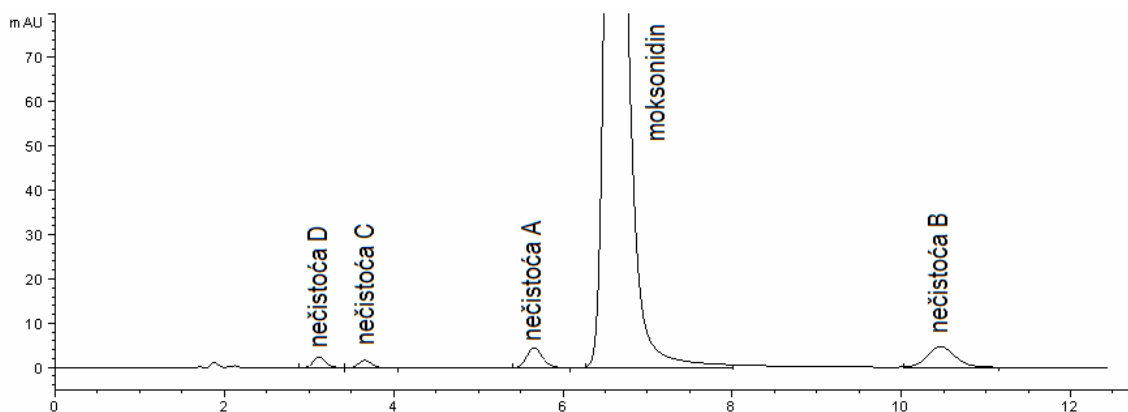


Slika 17. Radni standardni rastvor moksonidina i nečistoća A, B C i D (kolona Zorbax SB, C₁₈, 150 mm x 4,6 mm, 5 µm)

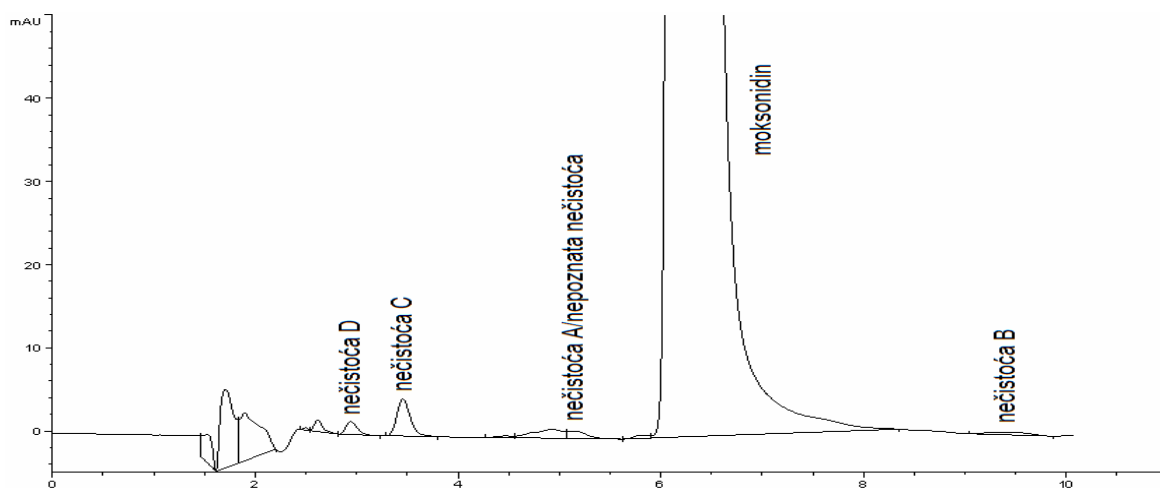
To je uslovalo preispitivanje sastava mobilne faze. Zapaženo je da smanjenje udela acetonitrila na račun uvođenja metanola donekle dovodi do smanjenja opisanog *tailing*-a i generalno poboljšanja izgleda ispitivanih hromatografskih pikova, i time navelo na mogućnost uvođenja metanola kao organske komponente mobilne faze. Dodatno, bolja rastvorljivost ispitivanih supstanci u metanolu, u odnosu na acetonitril, njegova manja toksičnost i niža cena opravdavaju finalni izbor metanola kao organske komponente mobilne faze u razvoju metode za koju je postavljeni kriterijum bio jednostavan i rutinski primenjiv analitički postupak. Variranje dužine hromatografske kolone u ovoj fazi ispitivanja (uvođenje kolona dužine 150 mm) imalo je za cilj skraćenje hromatografskog *run*-a, međutim, u slučaju ispitivanog analita primenom navedene mobilne faze, dužina kolone se nije pokazala kao faktor koji značajno utiče na ukupno trajanje analize, zbog čega su dalji eksperimenti vršeni na koloni dužine 250 mm.

Ispitivanja koja su nastavljena na koloni Xterra RP, C₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) odnosila su se na uvođenje modifikatora mobilne faze, za koji je izabran fosfatni pufer. Pored toga što ima ulogu održavanja konstantne vrednosti pH mobilne faze, široka primenljivost fosfatnog pufera se ogleda u efikasnosti na tri relativno široka pH nivoa (2, 7 ili 12) [96]. Koncentracija fosfatnog pufera pri kojoj je *tailing* hromatografskog pika moksonidina bio sveden na minimum iznosila je 0,05 mol L⁻¹. Kako niže koncentracije nisu dale zadovoljavajuće poboljšanje, dok su više koncentracije produžavale trajanje analize i dodatno negativno uticale na očuvanje

kvaliteta stacionarne faze, sva dalja ispitivanja vršena su pri konstantnoj vrednosti koncentracije fosfatnog pufera ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$). Iako je na pomenutoj koloni *Xterra RP*, C_{18} , (250 mm x 4,6 mm, 5 μm) postignuto hromatografsko razdvajanje ispitivanih komponenti, promenom pH i udela metanola u mobilnoj fazi nije dobijena zadovoljavajuća selektivnost i skraćenje analitičkog postupka, a da se pritom ne ugrozi rezolucija između hromatografskih pikova i simetrija pika aktivne supstance (slike 18. i 19).



Slika 18. Radni standardni rastvor moksonidina i nečistoća A, B C i D (kolona *Xterra RP*, C_{18} , 250 mm x 4,6 mm, 5 μm)



Slika 19. Rastvor uzorka (kolona *Xterra RP*, C_{18} , 250 mm x 4,6 mm, 5 μm)

Potencijalno prevazilaženje navedenih nedostataka ispitano je primenom *Symmetryshield* familije kolona istog proizvođača (*Waters Corporation*). Ove kolone poseduju ugrađene polarne grupe koje “štite” površinske silanolne ostatke stacionarne faze time smanjujući njihovu reaktivnost i ujedno olakšavajući interakciju stacionarne faze sa vodom. Zato je njihova primena naročito pogodna u slučaju mobilnih faza sa

visokim sadržajem vode. Ipak, njihova najznačajnija prednost je poboljšanje simetrije hromatografskih pikova i rezolucije u širem opsegu pH vrednosti. Ispitivanja na koloni *Symmetryshield*, C₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 μm) dala su očekivano poboljšanje simetrije svih hromatografskih pikova i rezolucije, uz dodatno skaćenje hromatografskog *run-a*, što je ovu kolonu izdvojilo kao konačan izbor stacionarne faze.

Tokom preliminarnih ispitivanja uočena je veza između hemijske strukture ispitivanih komponenti i njihovog hromatografskog ponašanja. Nečistoće C i D poseduju polarnu hidroksilnu grupu na položaju C-4 pirimidinskog prstena, što u odnosu na druge komponente omogućava brže eluiranje sa nepolarne stacionarne faze, pri primeni mobilne faze sa pretežno zastupljenom vodenom komponentom. Nečistoća C poseduje lipofilniju metoksi grupu na položaju C-6 zbog čega se eluira nešto kasnije. Zbog izražene strukturne sličnosti, a samim tim i hromatografskog ponašanja, zapaženo je da se rezolucija između njihovih hromatografskih pikova menja u zavisnosti od sastava mobilne faze, zbog čega je ovaj par identifikovan kao prvi kritični par za dalja ispitivanja. Drugi kritični par predstavljaju nečistoća A i moksonidin. Prisustvo hlora kao supstituenta na položaju C-4 pirimidinskog prstena utiče da se ove dve komponente kasnije eluiraju u odnosu na nečistoće C i D, ali analogno njihovom slučaju, lipofilniji supstituent na poziciji C-6 (metoksi grupa) utiče na nešto dužu retenciju moksonidina u odnosu na nečistoću A. Konačno, nečistoća B sadrži metoksi grupu kako u položaju C-4, tako i u položaju C-6, što je izdvaja kao najlipofilniju komponentu, sa najdužim retencionim vremenom.

Na osnovu svih preliminarnih ispitivanja, utvrđeni su faktori koji su imali najveći uticaj na hromatografsko ponašanje ispitivanih komponenti, a to su udeo metanola u mobilnoj fazi kao i pH vrednost njene vodene komponente. Kako temperatura kolone generalno predstavlja važan faktor uticaja na brzinu i stepen hromatografskog razdvajanja, odlučeno je da se njen uticaj, kao i uticaj dva pomenuta faktora detaljnije ispituju u fazi optimizacije metode. Budući da navedeni faktori najviše utiču na separaciju između kritičnih parova (nečistoće C i D i nečistoća A i moksonidin), vrednost rezolucije između istih je praćena kao jedan od odgovora sistema. U cilju postizanja što kraćeg hromatografskog *run-a*, pri zadovoljavajućoj rezoluciji između kritičnih parova, odlučeno je da se kao drugi odgovor sistema prati vrednost retencionih faktora svih ispitivanih komponenti.

Moksonidin pokazuje apsorpcioni maksimum na talasnim dužinama 230 nm i 255 nm [97]. Radi obezbeđivanja bolje osetljivosti tokom ispitivanja hromatografskog ponašanja moksonidina i njegovih nečistoća A, B, C i D izabrana je talasna dužina 255 nm, na kojoj i navedene nečistoće pokazuju dobru apsorbciju.

Uticaj tri izabrana faktora: pH vodene faze (x_1), temperature kolone (x_2) i udela metanola (x_3), ispitivan je u fazi optimizacije metode, primenom centralnog kompozicionog dizajna.

4.1.2 Optimizacija RP-HPLC metode primenom centralnog kompozicionog dizajna

Za optimizaciju eksperimentalnih uslova RP-HPLC metode izabrani su faktori i primenjen je centralni kompozicioni dizajn (*face-centered cube* dizajn). Svaki izabrani faktor ispitivan je na tri nivoa (niži, srednji i viši), pri čemu su vrednosti faktora na svakom nivou redom kodirane (-1, 0, +1). Vrednosti koje su ispitivani faktori imali na izabranim nivoima date su u tabeli 1, dok je plan eksperimenata za centralni kompozicioni dizajn predstavljen u tabeli 2.

Tabela 1. Nivoi ispitivanih faktora

Ispitivani faktori	Nivoi ispitivanih faktora		
	niži (-1)	srednji (0)	viši (+1)
pH vodene faze (x_1)	2,5	3,5	4,5
Temperatura kolone (°C, x_2)	20	25	30
Udeo metanola (% , x_3)	10	15	20

Tabela 2. Plan eksperimenata za centralni kompozicioni dizajn

Broj eksperimenta	Nivoi ispitivanih faktora		
	x_1	x_2	x_3
1.	-1	-1	-1
2.	-1	-1	+1
3.	-1	+1	-1
4.	-1	+1	+1
5.	+1	-1	-1
6.	+1	-1	+1
7.	+1	+1	-1
8.	+1	+1	+1
9.	-1	0	0
10.	+1	0	0
11.	0	-1	0
12.	0	+1	0
13.	0	0	-1
14.	0	0	+1
15.	0	0	0
16.	0	0	0
17.	0	0	0

Eksperimenti su izvođeni randomiziranim redosledom, a kao odgovor sistema praćeni su retencioni faktor (k') za moksonidin i nećistoće A, B, C i D, kao i rezolucija između kritičnih parova nećistoća D/nećistoća C (R_{CD}) i nećistoća A/moksonidin ($R_{A/moksonidin}$). Dobijeni eksperimentalni podaci predstavljani su u tabeli 3.

Tabela 3. Plan eksperimenata za *face-centered cube* dizajn sa vrednostima faktora kapaciteta ispitivanih supstanci i rezolucije između kritičnih parova

Broj eksperimenata	Faktor kapaciteta (k')					Rezolucija (R)	
	$k'_{\text{moksonidin}}$	k'_A	k'_B	k'_C	k'_D	$R_{C/D}$	$R_{A/\text{moksonidin}}$
1.	2,32	1,70	4,30	0,84	0,55	3,52	4,60
2.	0,78	0,60	1,52	0,20	0,11	1,68	2,52
3.	2,10	1,54	3,90	0,76	0,49	3,62	4,75
4.	0,91	0,71	1,63	0,29	0,20	1,65	2,54
5.	3,38	2,75	6,13	1,35	0,91	3,79	2,67
6.	1,60	-	2,75	0,65	0,49	1,91	-
7.	3,31	2,81	5,97	1,33	0,90	4,02	2,44
8.	1,49	-	2,54	0,60	0,46	1,88	-
9.	1,29	0,96	2,41	0,41	0,25	2,44	3,56
10.	2,22	2,00	3,88	0,89	0,64	2,65	1,47
11.	1,86	1,45	3,35	0,71	0,51	2,44	3,10
12.	1,73	1,36	3,08	0,66	0,46	2,61	3,28
13.	2,64	1,98	4,93	0,97	0,65	3,88	4,61
14.	1,12	0,89	2,03	0,37	0,26	1,74	2,46
15.	1,80	1,40	3,22	0,68	0,48	2,61	3,28
16.	1,80	1,40	3,22	0,68	0,48	2,61	3,28
17.	1,80	1,40	3,22	0,68	0,48	2,61	3,28

Polinom drugog reda koji predstavlja zavisnost između ispitivanih faktora (x_1 , x_2 , x_3) i posmatranih odgovora sistema (y) predstavljen je sledećom jednačinom:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 \quad (9)$$

Koeficijenti polinoma (b_1 - b_{33}) se odnose na intenzitete uticaja pojedinih eksperimentalnih faktora na posmatrani odgovor sistema, zatim intenzitete uticaja faktorskih interakcija, kao i kvadratne članove polinoma, a izračunavaju se regresionom analizom na osnovu dobijenih eksperimentalnih podataka posmatranih odgovora

sistema. Odsečak jednačine polinoma je označen sa b_o . Predznak + ili – ispred svakog koeficijenta ukazuju na smer uticaja datog faktora u smislu da li se sa povećanjem intenziteta faktora odgovor sistema povećava ili smanjuje, dok apsolutna vrednost koeficijenta govori o samom intenzitetu tog uticaja. Vrednosti izračunatih koeficijenata za ispitivane odgovore sistema predstavljene su u tabelama 4 i 5.

Tabela 4. Koeficijenti matematičkih modela za faktore kapaciteta ispitivanih supstanci

Koeficijenti modela	Faktor kapaciteta (k')				
	$k'_{\text{moksonidin}}$	k'_A	k'_B	k'_C	k'_D
b_o	1,7702	1,3752	3,1833	0,6595	0,4631
b_1	0,4600	0,5140	0,7510	0,2320	0,1800
b_2	-0,0400	-0,0190	-0,0930	-0,0110	-0,0060
b_3	-0,7850	-0,5490	-1,4760	-0,3140	-0,1980
b_{11}	0,0145	0,1295	-0,0017	0,0110	-0,0012
b_{22}	0,0545	0,0545	0,0683	0,0460	0,0388
b_{33}	0,1395	0,0845	0,3333	0,0310	0,0088
b_{12}	-0,0113	0,0000	-0,0100	-0,0100	-0,0087
b_{13}	-0,1088	-0,0675	-0,2200	-0,0400	-0,0163
b_{23}	0,0387	0,0125	0,0575	0,0175	0,0163

Tabela 5. Koeficijenti matematičkih modela za rezoluciju između kritičnih parova

Koeficijenti modela	Rezolucija (R)	
	$R_{C/D}$	$R_{A/\text{moksonidin}}$
b_o	2,5912	3,3257
b_1	0,1340	-1,1390
b_2	0,0440	0,0120
b_3	-0,9970	-1,1550
b_{11}	-0,0274	-0,8564
b_{22}	-0,0474	-0,1814
b_{33}	0,2376	0,1636
b_{12}	0,0163	-0,0500
b_{13}	-0,0263	-0,1025
b_{23}	-0,0488	0,0125

Ponavljanje eksperimenata u centralnoj tački omogućilo je izračunavanje standardne eksperimentalne greške, kao i procenu adekvatnosti uklapanja matematičkih modela sa eksperimentalno dobijenim podacima (eng. *lack of fit*). Statistička procena značajnosti koeficijenta modela, izvršena je primenom F -testa, dok je za procenu adekvatnosti uklapanja matematičkog modela i eksperimentalno dobijenih podataka primenjena analiza varijanse (ANOVA). Vrednost F se izračunava prema jednačini 10:

$$F = s_{lof}^2 / s_{pe}^2 = (SS_{lof} / df_{lof}) / (SS_{pe} / df_{pe}) \quad (10)$$

gde je SS_{lof} suma kvadrata neslaganja matematičkog modela i eksperimentalno dobijenih podataka, SS_{pe} suma kvadrata čiste eksperimentalne neizvesnosti, dok df_{lof} i df_{pe} predstavljaju broj stepeni slobode za navedene parametre. Da bi se odredila značajnost varijanse neslaganja matematičkog modela i eksperimentalno dobijenih podataka (s_{lof}^2) u odnosu na varijansu čiste eksperimentalne neizvesnosti (s_{pe}^2), dobijena F vrednost se upoređuje sa vrednostima u tabeli F -raspodele, za odgovarajući broj stepeni slobode [78,83,85,98]. U ispitivanom slučaju, dobijene F -vrednosti za svaki odgovor sistema upoređene su sa tabelarnom vrednošću, za broj stepeni slobode 5 i 2, i nivo pouzdanosti 95 % ($F_{tabelarno} = 19,30$). Zaključeno je da dobijeni model adekvatno opisuje ponašanje hromatografskog sistema, te da ne postoji statistički značajno odstupanje eksperimentalno dobijenih rezultata od onih predviđenih modelom.

Koeficijent determinacije (R^2) ukazuje na to koliko dobro matematički model opisuje ponašanje sistema. Ukoliko je njegova vrednost 1, znači da postoji savršeno uklapanje eksperimentalnih rezultata sa dobijenim modelom. Korigovani koeficijent determinacije (R_a^2) koriguje procenu pouzdanosti modela na osnovu broja eksperimenata iz kojih je on izveden, te se za njegovo određivanje koristi broj stepeni slobode. Dobijene vrednosti R^2 i R_a^2 takođe su ukazale na dobro slaganje eksperimentalnih i vrednosti predviđenih matematičkim modelom.

Rezultati regresione analize za ispitivane odgovore sistema predstavljeni su u tabeli 6.

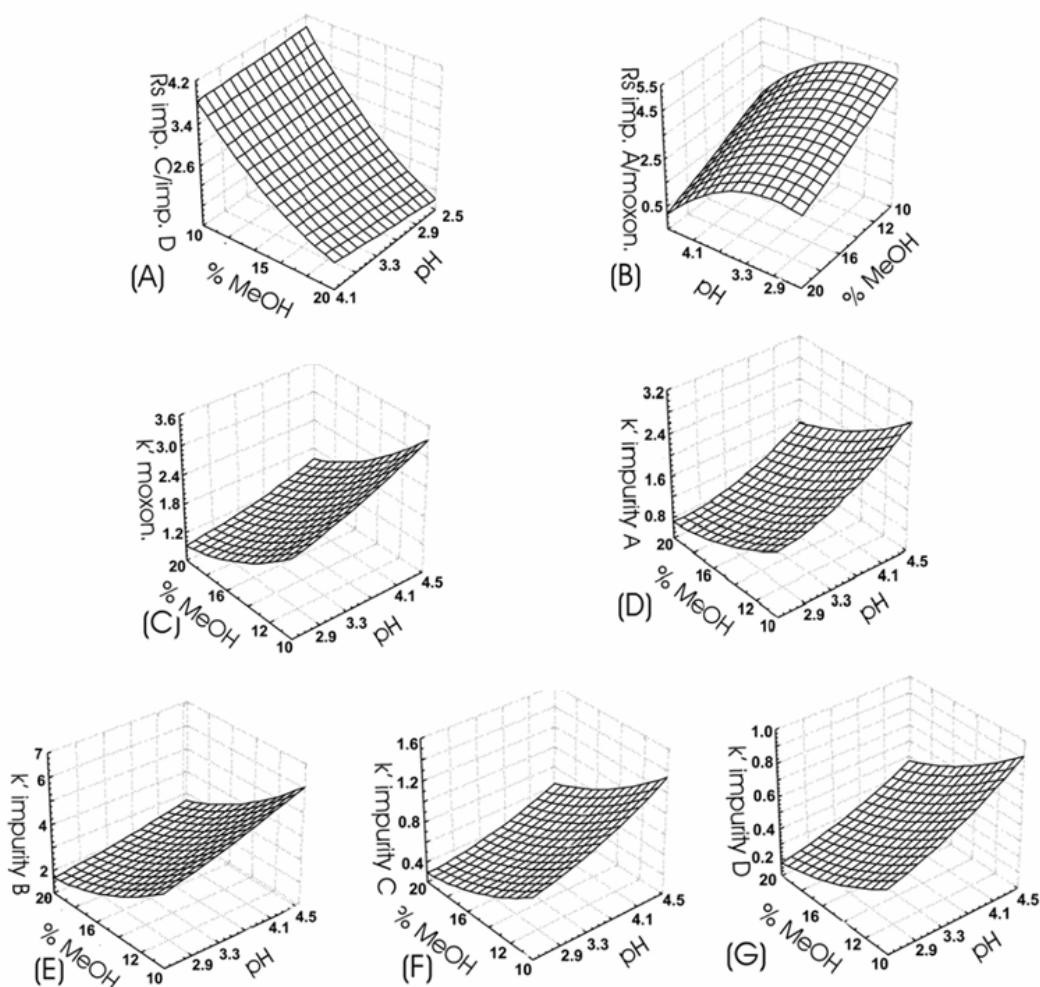
Tabela 6. Prikaz rezultata regresione analize (ANOVA)

Ispitivani odgovor sistema	Parametri ANOVA				
	SS_{pe}	SS_{lof}	F -vrednost	R^2	R^2_a
$k'_{moksosidin}$	8,7634	8,7307	0,9963	0,9965	0,9921
k'_A	6,2554	6,2199	0,9943	0,9946	0,9877
k'_B	29,5449	29,4913	0,9982	0,9981	0,9958
k'_C	1,6173	1,6089	0,9948	0,9948	0,9880
k'_D	0,7424	0,7338	0,9884	0,9893	0,9756
$R_{C/D}$	11,0626	11,0118	0,9954	0,9879	0,9724
$R_{A/moksosidin}$	32,4027	32,2203	0,9944	0,9929	0,9839

Vrednosti koeficijena koje ukazuju na uticaj udela metanola u mobilnoj fazi (b_3) imaju negativan predznak, ali i najveću apsolutnu vrednost u slučaju svih ispitivanih odgovora sistema, što ovaj faktor izdvaja kao najuticajniji na hromatografsko ponašanje. Povećanjem udela metanola smanjuje se rezolucija između kritičnih parova, ali i vrednost faktora kapaciteta svih ispitivanih komponenti usled njihovog bržeg eluiranja uslovljenog lipofilnim karakterom ispitivanih jedinjenja. Dodatno, kisela pH vrednost mobilne faze sprečava disocijaciju slabih organskih kiselina, kao što je moksonidin, i samim tim favorizuje održavanje ispitivanih jedinjenja u molekulskom obliku, što olakšava retenciju na nepolarnoj stacionarnoj fazi. Otuda je pri kiseloj pH vrednosti, retencija ispitivanih komponenti najviše zavisna od promene udela metanola. Sa druge strane, promena pH vrednosti vodene faze na osnovu izračunatih koeficijena (b_1) najviše se odražava na vrednosti faktora kapaciteta, dok je u slučaju nečistoća A, C i D taj uticaj po intenzitetu neznatno manji od uticaja udela metanola u mobilnoj fazi. Konačno, apsolutna vrednost koeficijena koji se odnose na uticaj temperature (b_2) značajno je manja u slučaju svih ispitivanih odgovora, pa se može zaključiti da promena ovog faktora ima najmanji uticaj na hromatografsko ponašanje.

Kako bi se hromatografsko ponašanje supstanci u funkciji ispitivanih faktora predstavilo grafički, faktor sa najmanjim uticajem je održavan pri konstantnoj vrednosti (25 °C), dok su na osnovu vrednosti preostala dva eksperimentalna faktora konstruisani 3D dijagrami. Zakrivljenosti površina odgovora sistema ukazuju na međusobne interakcije dva uticajna faktora, udela metanola u mobilnoj fazi i pH vrednosti njene

vodene faze. Zapaža se da je ovaj uticaj izraženiji na vrednosti rezolucije između kritičnih parova, dok je na vrednosti faktora kapaciteta približno isti za sve ispitivane komponente. Izgled 3D dijagrama površina odgovora sistema predstavljen je na slici 20.



Slika 20. 3D dijagrami površine odgovora sistema za rezoluciju između hromatografskih pikova nečistoće D i nečistoće C (A), nečistoće A i moksonidina (B) i faktora kapaciteta moksonidina (C), nečistoće A (D), nečistoće B (E), nečistoće C (F) i nečistoće D (G).

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da su optimalne vrednosti ispitivanih faktora sledeće: udeo metanola u mobilnoj fazi 15 %, pH vrednost vodene komponente 3,5 i temperatura kolone od 25 °C. Pri navedenim uslovima na koloni

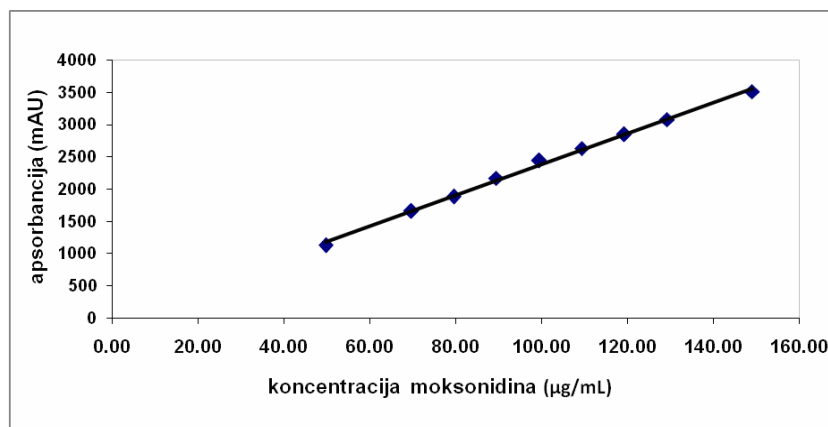
Symmetryshield, C₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) postiže se najbolje razdvajanje pet strukturno sličnih supstanci, u izokraskim uslovima za manje od 10 minuta (za kompletan pregled hromatografskih uslova videti poglavlje 3.5).

4.2 VALIDACIJA RP-HPLC METODE

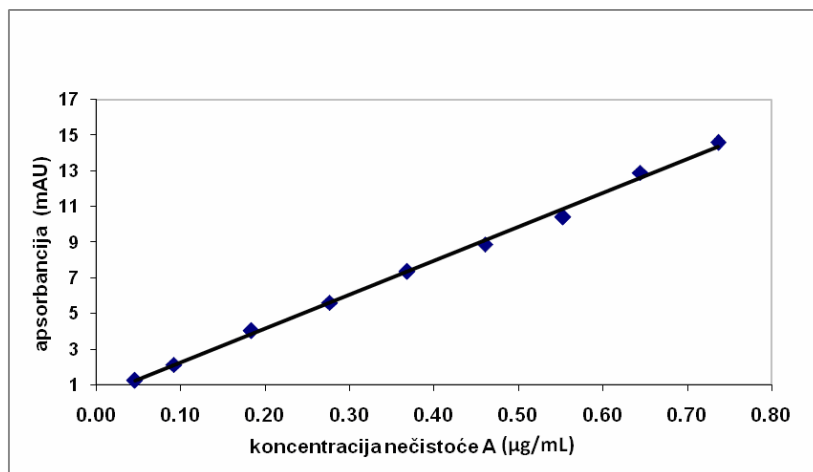
Validacija predložene analitičke metode za određivanje moksonidina i nečistoća A, B, C i D izvršena je u skladu sa zahtevima relevantnih smernica [45,99,100]. Validacijom je obuhvaćeno ispitivanje, linearnosti i opsega, selektivnosti, preciznosti, tačnosti, limita detekcije i kvantifikacije i robusnosti.

4.2.1 Ispitivanje linearnosti i opsega metode

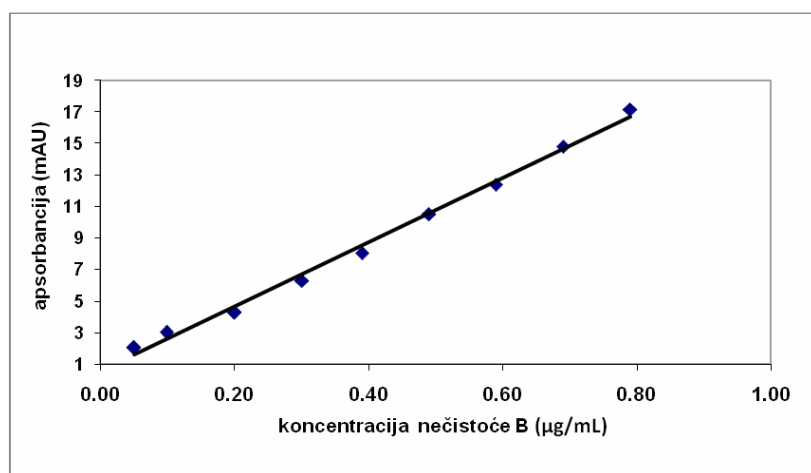
Ispitivanje linearnosti metode izvršeno je u devet tačaka, što je obuhvatilo opseg koncentracija od 50 µg mL⁻¹ do 150 µg mL⁻¹ za moksonidin i opseg koncentracija od 0,05 µg mL⁻¹ do 0,80 µg mL⁻¹ za nečistoće A, B, odnosno od 0,10 µg mL⁻¹ do 1,60 za nečistoće C i D. Za svaki koncentracioni nivo analizirana je zavisnost površine hromatografskog pika (apsorbancije) u funkciji koncentracije ispitivane supstance. Primenom metode najmanjih kvadrata izračunate su linearne jednačine i konstruisane kalibracione krive, koje su predstavljene na slikama 21 - 25.



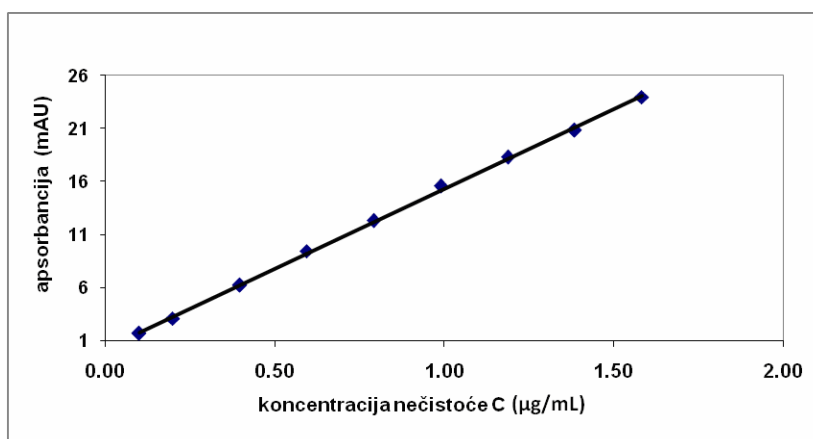
Slika 21. Kalibraciona kriva moksonidina



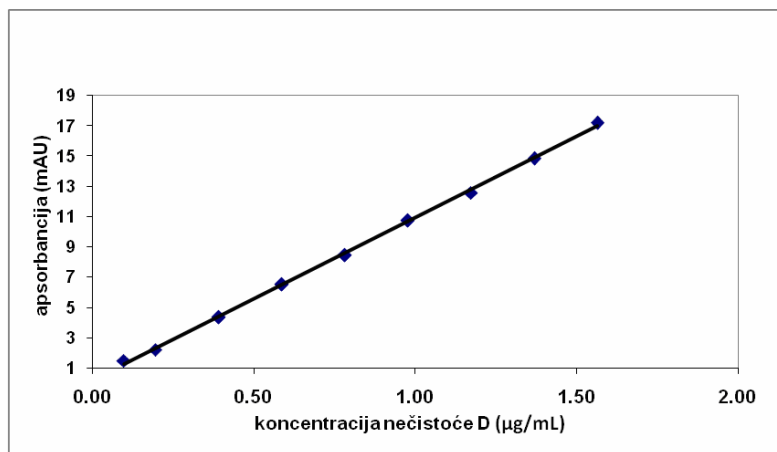
Slika 22. Kalibraciona kriva nečistoće A



Slika 23. Kalibraciona kriva nečistoće B



Slika 24. Kalibraciona kriva nečistoće C



Slika 25. Kalibraciona kriva nečistoće D

Regresiona analiza je pokazala da je predložena metoda linearna u ispitivanom opsegu koncentracija, jer je koeficijent korelacije (r) koji pokazuje stepen linearne zavisnosti ispitivanih parametara imao zadovoljavajuću vrednost za sve supstance. Izračunavanjem standardne greške odsečka (S_b) ispitana je značajnost odsečka (b), i dalje ocenjena pomoću *Studentovog t-testa*. Kako su izračunate vrednosti za svaku ispitivanu supstancu imale nižu vrednost od tabelarne ($t_{tabelarno} = 2,26$; $p = 0,05$), zaključeno je da odsečak nije statistički značajno različit od nule. Rezultati regresione analize ispitivanih supstanci prikazani su u tabeli 7.

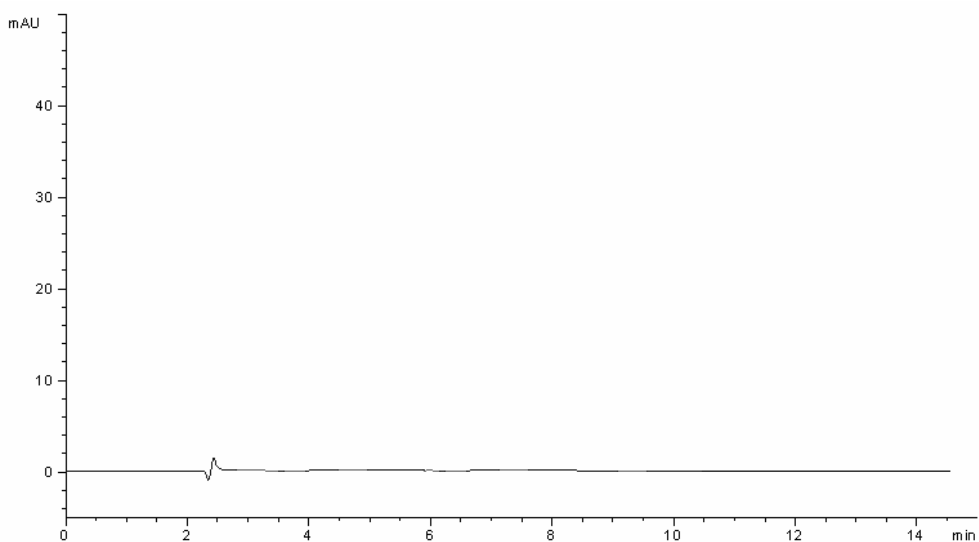
Tabela 7. Rezultati regresione analize

Ispitivana supstanca	Kalibraciona kriva, $y = ax + b$	Koeficijent korelacije, r	Standardna devijacija nagiba, S_a	Standardna devijacija odsečka, S_b	Izračunata vrednost devijacije za odsečak
Moksonidin	$23970x - 12,482$	0,9986	483,481	50,097	0,249
Nečistoća A	$19,061x + 0,340$	0,9988	0,358	0,157	2,165
Nečistoća B	$20,408x + 0,579$	0,9973	0,564	0,265	2,189
Nečistoća C	$15,039x + 0,332$	0,9996	0,159	0,150	2,214
Nečistoća D	$10,725x + 0,196$	0,9996	0,108	0,100	1,958

4.2.2 Ispitivanje selektivnosti metode

Selektivnost metode ispitana je upoređivanjem retencionih vremena hromatografskih pikova sa hromatograma dobijenih injektovanjem radnog rastvora

standardnih supstanci (moksonidina i nečistoća A, B, C i D), rastvora placeba i rastvora uzorka, pod utvrđenim hromatografskim uslovima. Na slici 26 je predstavljen hromatogram rastvora placeba za ispitivanje selektivnosti metode.



Slika 26. Hromatogram rastvora placeba

Kako na dobijenom hromatogramu rastvora placeba nije uočeno postojanje hromatografskih pikova čije bi retenciono vreme odgovaralo hromatografskim pikovima moksonidina i nečistoća A, B, C i D prisutnih u radnom rastvoru standardnih supstanci ili uzorku, potvrđeno je odsustvo interferencije i zaključeno da je predložena analitička metoda selektivna.

4.2.3 Ispitivanje preciznosti metode

Preciznost metode procenjena je kroz ispitivanje ponovljivosti (eng. *repeatability* ili *intra-assay precision*) i srednje preciznosti (eng. *intermediate precision*). Ispitivanje je vršeno u jednoj tački kalibracione krive u kojoj koncentracija ispitivanih supstanci korespondira koncentracionom nivou od 100 % radnog rastvora standardnih supstanci (moksonidina i nečistoća A, B, C i D), a pripremljeno je šest takvih rastvora. Srednja preciznost je analizirana tokom tri uzastopna dana. Obradom eksperimentalnih podataka, izračunate su vrednosti standardne devijacije (*SD*) i relativne standardne devijacije (*RSD*). Rezultati ispitivanja preciznosti metode predstavljeni su u tabeli 8.

Tabela 8. Rezultati ispitivanja preciznosti metode

	Ispitivana supstanca	Koncentracija pripremljenog rastvora ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Nađena koncentracija $\pm SD$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	<i>Recovery</i> (%)	<i>RSD</i> (%)
Ponovljivost metode	Moksonidin	100	99,987 \pm 0,143	99,99	0,14
	Nečistoća A	0,5	0,508 \pm 0,004	101,64	0,83
	Nečistoća B	0,5	0,496 \pm 0,004	99,26	0,78
	Nečistoća C	1,0	0,998 \pm 0,006	99,85	0,61
	Nečistoća D	1,0	1,005 \pm 0,006	100,48	0,57
Srednja preciznost metode	Moksonidin	100	100,041 \pm 0,295	100,04	0,29
	Nečistoća A	0,5	0,497 \pm 0,006	99,42	1,23
	Nečistoća B	0,5	0,503 \pm 0,007	100,59	1,39
	Nečistoća C	1,0	0,990 \pm 0,011	99,04	1,07
	Nečistoća D	1,0	0,997 \pm 0,006	99,66	0,60

Kako su dobijene vrednosti *RSD* za moksonidin i nečistoće A, B, C i D bile manje od 2 %, zaključeno je da predložena analitička metoda ima zadovoljavajuću preciznost.

4.2.4 Ispitivanje tačnosti metode

Tačnost predložene analitičke metode ispitivana je u tri tačke koje korespondiraju koncentracionom nivou od 80 %, 100 % i 120 % radnog standardnog rastvora moksonidina i znatno širem opsegu za nečistoće, koji korespondira koncentracionom nivou od 20 %, 100 % i 140 % radnog standardnog rastvora nečistoća A, B, C i D. Za svaku koncentraciju je urađeno po tri određivanja. Kako se tačnost metode izražava kroz *recovery* vrednost, koja predstavlja procenat prinosa određivanja za poznatu, dodatnu količinu analita placebo smeši, dobijeni rezultati nakon statističke obrade eksperimentalnih podataka (tabela 9) ukazuju da je predložena analitička metoda pokazala zadovoljavajuću tačnost u određivanju sadržaja moksonidina i nečistoća A, B, C i D.

Tabela 9. Rezultati ispitivanja tačnosti metode

Ispitivana supstanca	Koncentracija pripremljenog rastvora ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Nađena koncentracija $\pm SD$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recovery (%)	RSD (%)
Moksonidin	80,000	79,397 \pm 0,008	99,25	0,01
	100,000	100,090 \pm 0,056	100,09	0,06
	120,000	119,090 \pm 0,037	99,24	0,03
Nečistoća A	0,100	0,102 \pm 0,002	102,06	1,63
	0,500	0,496 \pm 0,004	99,24	0,83
	0,700	0,711 \pm 0,002	101,60	0,25
Nečistoća B	0,100	0,097 \pm 0,003	97,46	3,22
	0,500	0,495 \pm 0,008	99,09	1,62
	0,700	0,716 \pm 0,011	102,25	1,51
Nečistoća C	0,200	0,183 \pm 0,004	91,51	2,23
	1,000	0,980 \pm 0,001	97,98	0,11
	1,400	1,436 \pm 0,015	102,56	1,02
Nečistoća D	0,200	0,183 \pm 0,010	91,52	5,42
	1,000	0,974 \pm 0,005	97,35	0,55
	1,400	1,366 \pm 0,014	97,59	1,05

4.2.5 Ispitivanje limita detekcije i limita kvantifikacije

Limiti detekcije (*LOD*) i kvantifikacije (*LOQ*) za predloženu analitičku metodu određeni su eksperimentalno i procenom odnosa signal/šum. Pripremljeni radni rastvori za određivanje limita detekcije i kvantifikacije injektovani su pod utvrđenim hromatografskim uslovima, a zatim su izračunate vrednosti odnosa signal/šum. Koncentracije moksonidina i nečistoća A, B, C i D za koje je odnos signal/šum bio najmanje 3:1, odnosno 10:1 predstavljaju vrednosti limita detekcije i kvantifikacije (tabela 10).

Tabela 10. Rezultati ispitivanja limita detekcije i kvantifikacije

Ispitivana supstanca	Limit detekcije ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Limit kvantifikacije ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Moksonidin	0,02	0,06
Nečistoća A	0,03	0,05
Nečistoća B	0,01	0,04
Nečistoća C	0,03	0,07
Nečistoća D	0,03	0,07

4.2.6 Ispitivanje robusnosti metode

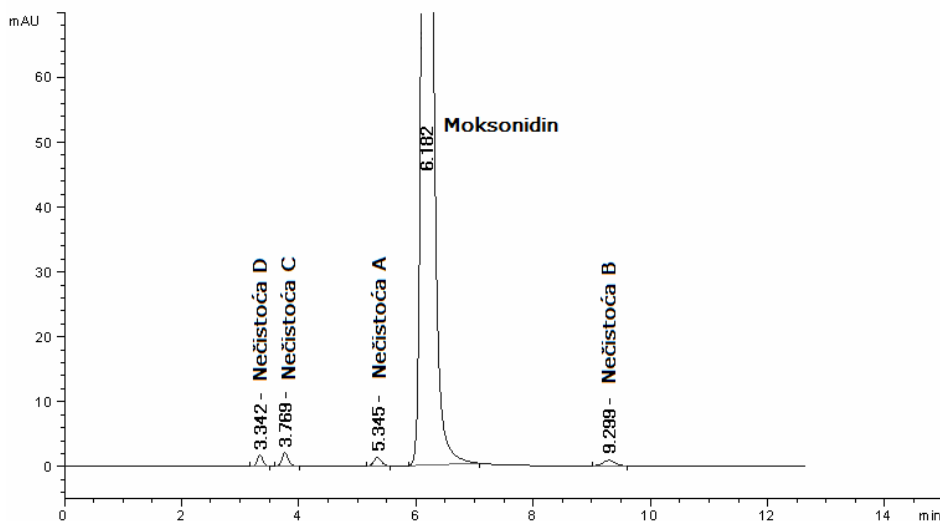
Za predloženu RP-HPLC metodu u toku njenog razvoja definisani su faktori koji bi mogli imati najveći uticaj na hromatografsko ponašanje ispitivanih komponenti. Procena navedenih uticaja izvršena je primenom centralnog kompozicionog dizajna. Ispitivanje je uključilo relativno širok opseg vrednosti za svaki faktor. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je za postizanje tačnih, preciznih i reproduktivnih rezultata primenom predložene RP-HPLC metode potrebno kontrolisati hromatografske uslove u skladu sa vrednostima ispitivanih faktora.

4.2.7 Ispitivanje pogodnosti sistema za kvalitativnu i kvantitativnu analizu moksonidina i njegovih nečistoća predloženom RP-HPLC metodom

Rezultati određivanja hromatografskih parametara za procenu pogodnosti sistema su prikazani u tabeli 11, dok je reprezentativni hromatogram predstavljen na slici 27.

Tabela 11. Hromatografski parametri procene pogodnosti sistema za RP-HPLC analizu moksonidina i njegovih nečistoća

Ispitivana supstanca	Preciznost injektovanja	Faktor kapaciteta, k'	Rezolucija, R	Simetrija pika
Moksonidin	0,05 %	1,75	$R_{A/moksonidin}$ 3,17	0,810
Nečistoća A	0,67 %	1,38	$R_{C/A}$ 7,24	0,873
Nečistoća B	0,70 %	3,13	$R_{moksonidin/B}$ 9,35	0,920
Nečistoća C	0,33 %	0,68	$R_{D/C}$ 2,33	0,864
Nečistoća D	0,10 %	0,49	/	0,894



Slika 27. Hromatogram radne smeše standarda moksonidina i nečistoća A, B, C i D za ispitivanje pogodnosti sistema

Dobijene vrednosti hromatografskih parametara ukazuju na dobru separaciju svih ispitivanih komponenti pod izokratskim uslovima za manje od 10 minuta. Zadovoljavajuća vrednost simetrije svih hromatografskih pikova (< 2 %) obezbeđuje njihovu preciznu integraciju, što zajedno sa potvrđenom preciznošću injektovanja (< 1 %) garantuje pouzdanu kvantifikaciju svih ispitivanih komponenti predloženom RP-HPLC metodom.

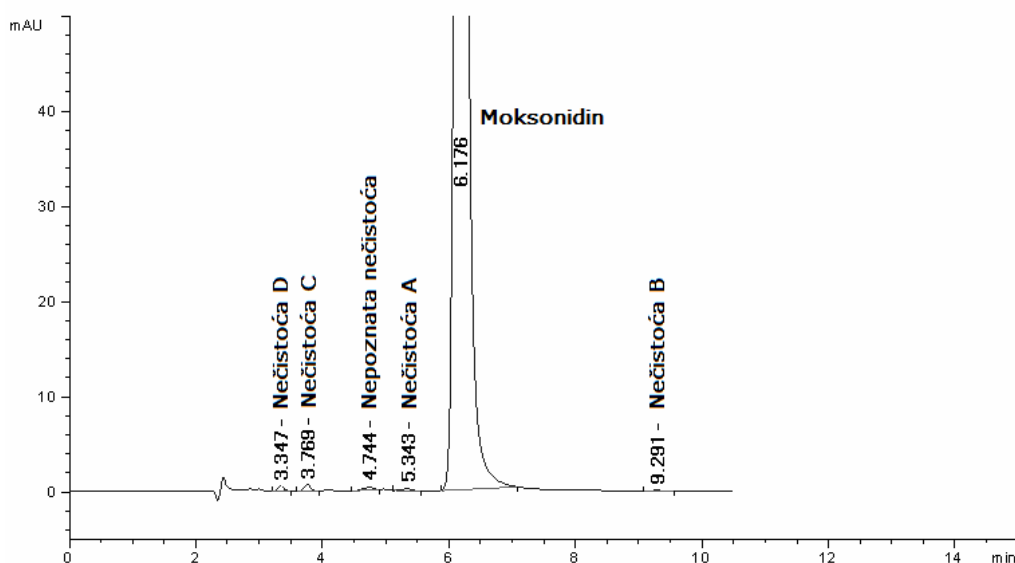
4.2.8 Određivanje sadržaja *Moxogamma 0.4*[®] tableta

Određivanje sadržaja moksonidina i njegovih nečistoća iz farmaceutskog doziranog oblika izvršeno je metodom eksternog standarda, preko površine pikova. Najpre su u hromatografski sistem injektovani radni rastvor smeše standarda (koncentracija moksonidina 0,1 mg mL⁻¹, nečistoća C i D 1,0 µg mL⁻¹ i nečistoća A i B 0,5 µg mL⁻¹), a zatim tri rastvora uzorka, od kojih je svaki injektovan tri puta. Rezultati dobijeni kvantitativnom analizom moksonidina i njegovih nečistoća prikazani su u tabeli 12, dok je hromatogram uzorka predstavljen na slici 28.

Tabela 12. Rezultati određivanja sadržaja moksonidina i njegovih nečistoća u farmaceutskom doziranom obliku

Ispitivana supstanca	Koncentracija pripremljenog rastvora (µg mL ⁻¹)	Nađena koncentracija ± SD (µg mL ⁻¹)	Recovery (%)	RSD (%)
Moksonidin	100	100,823 ± 0,244	100,84	0,24
Nečistoća A	0,500*	0,117 ± 0,002	0,12	1,31
Nečistoća B	0,500*	0,079 ± 0,001	0,08	1,46
Nečistoća C	1,000*	0,288 ± 0,005	0,29	1,56
Nečistoća D	1,000*	0,270 ± 0,003	0,27	1,28
Nepoznata nečistoća	0,500*	0,219 ± 0,003	0,22	1,37

* maksimalna dozvoljena količina



Slika 28. Hromatogram rastvora uzorka

Analizom moksonidina i njegovih nečistoća iz doziranog oblika zapaženo je prisustvo nepoznate nečistoće na hromatogramu uzorka ($t_r=4,744$) čiji je hromatografski pik zadovoljavajuće razdvojen od nečistoće A. Kako specifikacija u roku upotrebe (*shelf life*) ispitivanog doziranog oblika leka deklariše i sadržaj bilo kojih nepoznatih nečistoća $\leq 0,5$ %, na osnovu dobijenih podataka (tabela 12) može se zaključiti da je sadržaj nepoznate nečistoće kao i svih ispitivanih komponenti predloženom RP-HPLC metodom u okviru specifikacijskih granica. Time je potvrđena primenljivost predložene RP-HPLC metode za određivanje moksonidina i njegovih nečistoća iz farmaceutskog doziranog oblika.

4.3 STUDIJA FORSIRANE DEGRADACIJE MOKSONIDINA

Studija forsirane degradacije moksonidina sprovedena je u cilju definisanja njegovog degradacionog profila i razvoja odgovarajuće *stability-indicating* metode, a obuhvatila je ispitivanje aktivne farmaceutske supstance, kao i farmaceutskog doziranog oblika, u rastvoru i u čvrstom stanju, u skladu sa ICH smernicama [36,43]. Priprema uzoraka za studiju forsirane degradacije detaljnije je opisana u poglavlju 3.6.1.

Pored uzorka izloženog stres uslovima, dodatno je pri svakom stres uslovu ispitano još tri kontrolna uzorka, što je omogućilo ispravnu interpretaciju nastalih promena. Svi uzorci su nakon izlaganja stres agensu razblaženi mobilnom fazom, tako da je finalna koncentracija moksonidina za sprovođenje UHPLC-PDA analize bila $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ (računato na nedegradiranu supstancu), dok je za sprovođenje UHPLC-MS i UHPLC-MS/MS analize bila desetostruko manja.

Uzorci su analizirani pod uslovima opisanim u poglavlju 3.6.2. Trajanje hromatografskog *run*-a bilo je 2,5 puta duže od retencionog vremena moksonidina, kako bi se omogućila identifikacija eventualno prisutnih degradacionih proizvoda koji se zbog duže retencije kasnije eluiraju [57].

Ispitivanje je u slučaju nestabilnosti pri datim stres uslovima zaustavljano na nivou od 5 % - 20 % degradacije moksonidina. U uzorcima podvrgnutim stres uslovima ispitana je čistoća hromatografskog pika moksonidina (eng. *peak purity*) kako bi se potvrdilo odsustvo degradacije ili isključila mogućnost koeluiranja nastalog degradacionog proizvoda sa hromatografskim pikom aktivne supstance. Dodatno, tokom hromatografske analize stresiranih uzoraka praćeno je očuvanje ravnoteže mase

(eng. *mass balance*). Ukoliko je opadanje sadržaja aktivne farmaceutske supstance praćeno proporcionalnim porastom sadržaja degradacionih proizvoda, tako da njihov zbir ima vrednost približno istu početnoj vrednosti sadržaja aktivne supstance (blizu 100 %), koeluiranje je isključeno.

4.3.1 Hidroliza u neutralnoj sredini i termalna degradacija

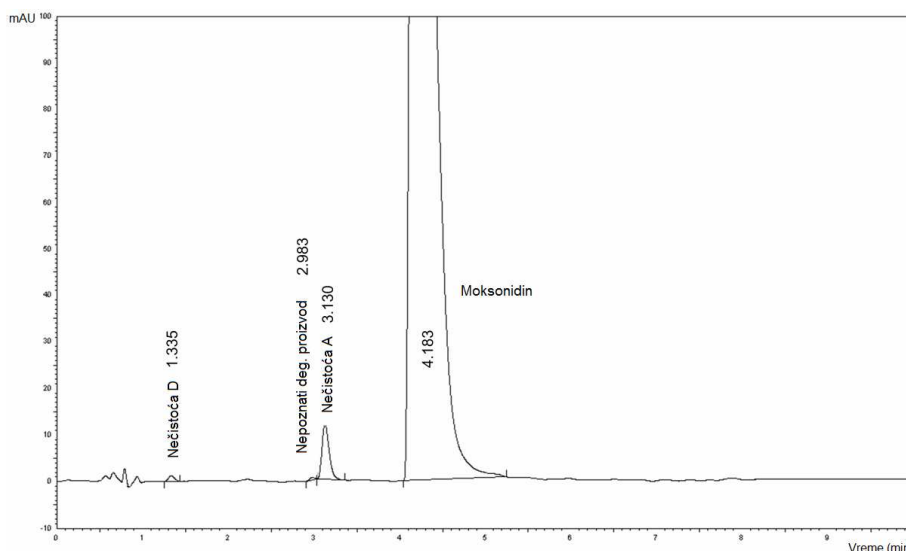
Hidrolitička otpornost moksonidina u neutralnoj sredini ispitana je sa rastvorom aktivne farmaceutske supstance, na sobnoj temperaturi. Uzorak je analiziran nakon 21 dan, i degradacija nije zabeležena. Dodatno, hidroliza u neutralnoj sredini ispitana je i na povišenoj temperaturi (70 °C) pri dužini izlaganja od 8 sati. Degradacija takođe nije zabeležena.

Termalna degradacija sprovedena je na aktivnoj farmaceutskoj supstanci i farmaceutskom doziranom obliku, u čvrstom stanju. Ispitivanje je vršeno zagrevanjem, na temperaturi od 70 °C, u nekoliko vremenskih tačaka, tokom 8 sati. U navedenom periodu nije došlo do značajne degradacije aktivne supstance u ispitivanim uzorcima (tabela 13), što je potvrđeno prethodno navedenim ispitivanjem čistoće pika i balansa mase.

4.3.2 Hidroliza u kiseloj sredini

Ispitivanje stabilnosti moksonidina u uslovima hidrolize u kiseloj sredini vršeno je sa aktivnom farmaceutskom supstancom u rastvoru, pri čemu je kao stres agens korišćena hlorovodonična kiselina (0,05 mol L⁻¹, 0,1 mol L⁻¹ i 0,5 mol L⁻¹). Degradacija nije postignuta sa nižim koncentracijama stres agensa na sobnoj temperaturi za 8 sati, zbog čega su dalja ispitivanja vršena sa većom koncentracijom hlorovodonične kiseline (0,5 mol L⁻¹) u znatno kraćim vremenskim razmacima, od 15, 30, 45 i 80 minuta. Degradacija od 5 % postignuta je za 80 minuta, a na hromatogramu uzorka se pored pika moksonidina zapažaju još tri manja pika (slika 29). Upoređivanjem relativnog retencionog vremena nastalih pikova sa onim na hromatogramu standardnog rastvora nečistoća, zapaža se da navedena retencionna vremena odgovaraju nečistoćama A i D, kao i da se na retencionom vremenu od 2,983 minuta, koje ne odgovara nijednoj od poznatih nečistoća moksonidina pojavljuje mali hromatografski pik. Može se pretpostaviti da je u pitanju novo nagrađeni degradacioni proizvod koji je zbog veoma

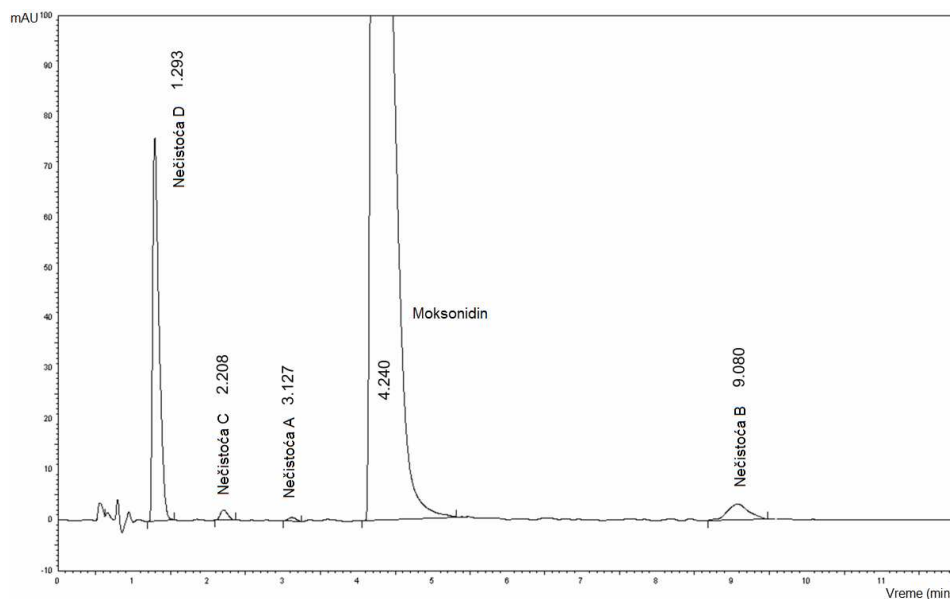
niskog sadržaja (približno 0,25 %) ispod nivoa propisanog limita za studije forsirane degradacije. Dominantni degradacioni proizvod u kiseloj sredini je nečistoća A.



Slika 29. Hromatogram rastvora moksonidina nakon degradacije hidrolizom u kiseloj sredini ($0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$, tokom 80 minuta, na sobnoj temperaturi)

4.3.3 Hidroliza u baznoj sredini

Ispitivanje stabilnosti moksonidina u uslovima hidrolize u baznoj sredini vršeno je sa aktivnom farmaceutskom supstancom u rastvoru, pri čemu je kao stres agens korišćen natrijum hidroksid ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$; $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ i 2 mol L^{-1}). Kako degradacija nije postignuta sa navedenim koncentracijama stres agensa na sobnoj temperaturi za 8 sati, dalja ispitivanja vršena su na povišenoj temperaturi ($70 \text{ }^\circ\text{C}$), pri koncentraciji natrijum hidroksida od 2 mol L^{-1} . Degradacija aktivne supstance od 15 % postignuta je za 15 minuta, a na hromatogramu uzorka se pored pika moksonidina zapažaju još četiri pika (slika 30.). Upoređivanjem relativnog retencionog vremena nastalih pikova sa onim na hromatogramu standardnog rastvora nečistoća, zapaža se da navedena retencionna vremena odgovaraju poznatim nečistoćama A, B, C i D, pri čemu je dominantni degradacioni proizvod u baznoj sredini nečistoća D.



Slika 30. Hromatogram rastvora moksonidina nakon degradacije hidrolizom u baznoj sredini ($2 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$, tokom 15 minuta, na temperaturi od $70 \text{ }^\circ\text{C}$)

4.3.4 Oksidativna degradacija

Stabilnost moksonidina u uslovima oksidativnog stresa, ispitana je sa aktivnom farmaceutskom supstancom u rastvoru, na sobnoj temperaturi, pri čemu je kao stres agens korišćen vodonik-peroksid (H_2O_2). Ispitivanje je najpre vršeno sa 3 % (v/v) H_2O_2 , pri čemu je moksonidin i nakon 8 sati pokazao stabilnost. Povećanje koncentracije stres agensa H_2O_2 na 10 % (v/v), nakon 5 sati nije dovelo do značajne degradacije aktivne supstance (približno 1 %).

4.3.5 Fotodegradacija

Fotodegradabilnost moksonidina ispitivana je na aktivnoj farmaceutskoj supstanci i farmaceutskom doziranom obliku, u čvrstom stanju i u rastvoru. Uzorci su izlagani uticaju direktne sunčeve svetlosti, dok su kontrolni uzorci držani u mraku. Pošto nakon 48 sati nije zabeležena degradacija, izlaganje uzoraka produženo je još 5 dana. Analizom dobijenih uzoraka nije zabeležena značajna degradacija moksonidina (tabela 13).

Na osnovu navedenog, može se zaključiti da su aktivna farmaceutska supstanca moksonidin kao i farmaceutski dozirani oblik pokazali stabilnost u studijama forsirane degradacije prilikom izlaganja termalnoj degradaciji, hidrolizi u neutralnoj sredini, oksidativnoj degradaciji i fotolizi.

Moksonidin je međutim pokazao nestabilnost u studiji forsirane degradacije prilikom izlaganja hidrolizi u kiseloj i baznoj sredini. Do degradacije u kiseloj sredini došlo je na sobnoj temperaturi, a u baznoj sredini nakon zagrevanja (70 °C). Analizom dobijenih hromatograma ustanovljeno je da pod navedenim stres uslovima degradacijom molekula moksonidina nastaju poznate nečistoće. Ovo je zaključeno na osnovu upoređivanja relativnog retencionog vremena sporednih pikova koji su primećeni na hromatogramima moksonidina izloženog delovanju stres agenasa, sa retencionim vremenima pikova na hromatogramu smeše standardnih supstanci nečistoća A, B, C i D. Rezultati studije forsirane degradacije moksonidina predstavljeni su u tabeli 13.

Tabela 13. Pregled rezultata dobijenih studijom forsirane degradacije moksonidina

Uslovi ispitivanja stabilnosti	Sadržaj aktivne farmaceutske supstance	Zapažanje
Hidroliza u kiseloj sredini (0,5 M HCl, 80 minuta)	95,0 %	Dominantni degradacioni proizvod nečistoća A
Hidroliza u baznoj sredini (2 M NaOH, 70 °C, 15 minuta)	85,0 %	Dominantni degradacioni proizvod nečistoća D
Hidroliza u neutralnoj sredini (21dan)	100,0 %	Bez degradacije
Oksidativna degradacija (10 % H ₂ O ₂ (v/v), 5 sati)	99,0 %	Bez značajne degradacije
Fotodegradacija sa uzorkom aktivne supstance (7 dana)	99,5 %	Bez značajne degradacije
Fotodegradacija sa uzorkom tableta (7 dana)	99,1 %	Bez značajne degradacije
Termalna degradacija sa uzorkom aktivne supstance (70 °C, 8 sati)	98,5 %	Bez značajne degradacije
Termalna degradacija sa uzorkom tableta (70 °C, 8 sati)	98,3 %	Bez značajne degradacije

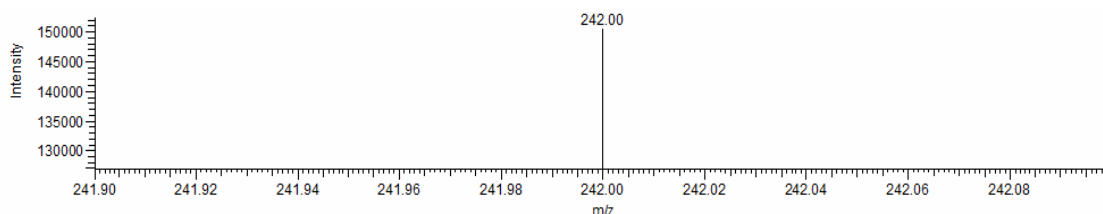
Odsustvo koeluiranja u svim stres uslovima potvrđeno je proverom *peak purity* faktora čija se vrednost kretala u intervalu 990–1000, kao i preko balansa mase. Struktura degradacionih proizvoda je dodatno potvrđena sprovođenjem UHPLC-MS analize, dok je fragmentacija moksonidina i njegovih degradacionih proizvoda sprovedena primenom UHPLC-MS/MS analize.

4.3.6 Primena masene spektrometrije u identifikaciji nastalih degradacionih proizvoda

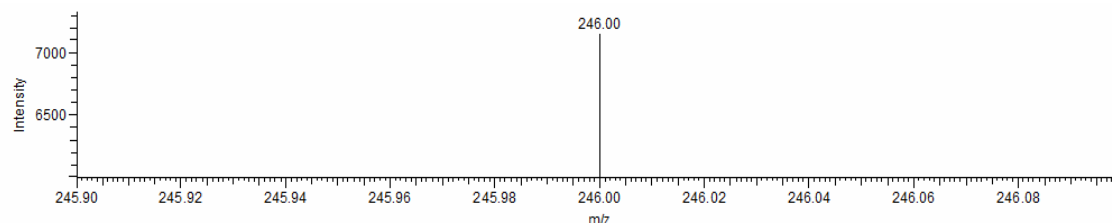
UHPLC-MS analiza standardnih rastvora moksonidina, njegovih nečistoća A, B, C i D, kao i uzoraka nakon hidrolitičke degradacije u kiseloj i baznoj sredini, sprovedena je nakon neznatnog modifikovanja eksperimentalnih uslova u odnosu na UHPLC-PDA analizu (videti poglavlje 3.6.2).

U strukturi moksonidina i nečistoća A, B, C i D nalazi se imidazolinski prsten kao primarno mesto protonovanja (videti poglavlje 1.1.3), te je kao tehnika jonizacije izabrana elektrosprej jonizacija u pozitivnom modu. Elektrosprej jonizacijom se od neutralnog molekula dobijaju joni, a zavisno od primenjene energije jonizacije, dešava se i fragmentacija molekula. Interpretacijom masenih spektara u smislu tumačenja veze prekursor-produkt jon, dobijaju se informacije o potencijalnim delovima strukture. Primenom više masenih spektrometara u serijama dobija se sprega, pa se tumačenjem načina formiranja jonskih fragmenata nastalih iz više sekvencijalnih reakcija iz početnog „matičnog“ molekula/jona, može dobiti još potpunija informacija o strukturi.

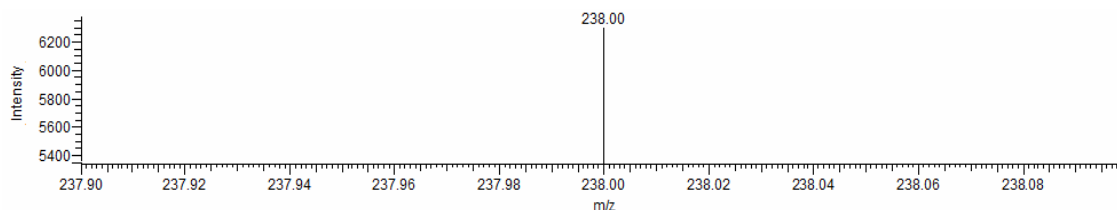
Nastanak nečistoća poznate strukture dodatno je potvrđen na osnovu snimljenih masenih spektara dobijenih degradacionih proizvoda u uslovima stresa i masenih spektara poznatih sintetskih nečistoća, dok je u masenom spektru nepoznatog degradacionog proizvoda zabeležen molekulski jon sa m/z odnosom od 272 (slika 36). Molekulski joni moksonidina i nečistoća A, B, C i D imali su redom sledeće vrednosti m/z odnosa 242, 246, 238, 224, 228 (slike 31-35).



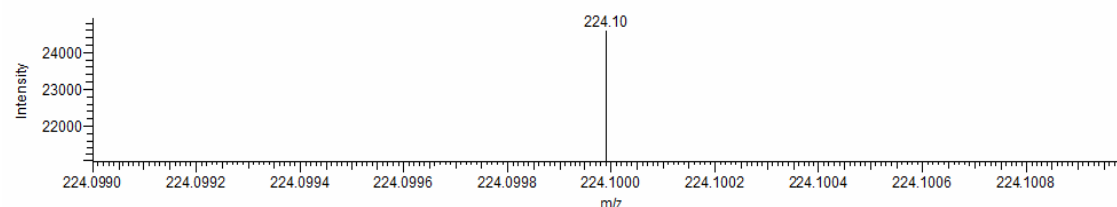
Slika 31. ESI maseni spektar moksonidina



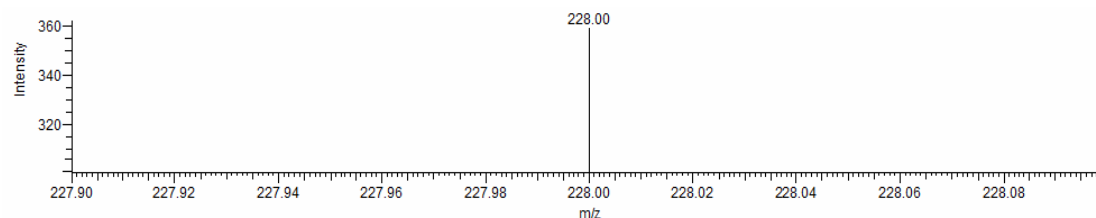
Slika 32. ESI maseni spektar nečistoće A



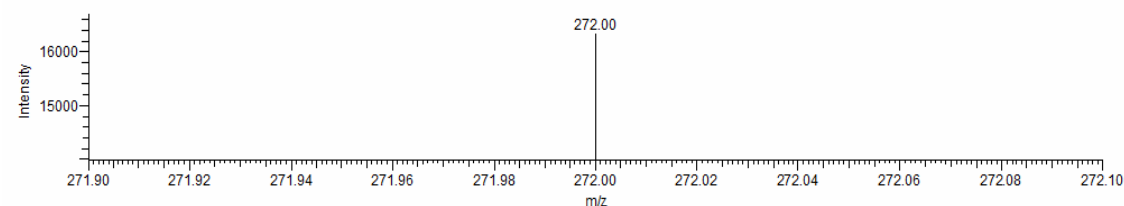
Slika 33. ESI maseni spektar nečistoće B



Slika 34. ESI maseni spektar nečistoće C



Slika 35. ESI maseni spektar nečistoće D



Slika 36. ESI maseni spektar nepoznatog degradacionog proizvoda

4.3.6.1 Fragmentacija moksonidina i njegovih degradacionih proizvoda

Primenom MS/MS analize, nakon cepanja polaznih molekula u masenom spektrometru došlo je do formiranja karakterističnih fragmentnih jona na osnovu kojih je predložen put fragmentacije moksonidina i njegovih degradacionih proizvoda (slika 37).

U slučaju moksonidina, fragmentacijom pri različitim kolizionim energijama formirani su fragmentni joni sa signalima u masenom spektru kojima odgovara m/z odnos od 198,96 (9 V), 206,03 (5 V), 136,02 (18 V) i 149,03 (10 V).

Protonovani molekulski jon nečistoće A je dao karakteristične fragmente sa m/z odnosom od 208,00 (18 V), 202,99 (21 V), 148,97 (22 V), 173,94 (19 V) i 209,83 (20 V).

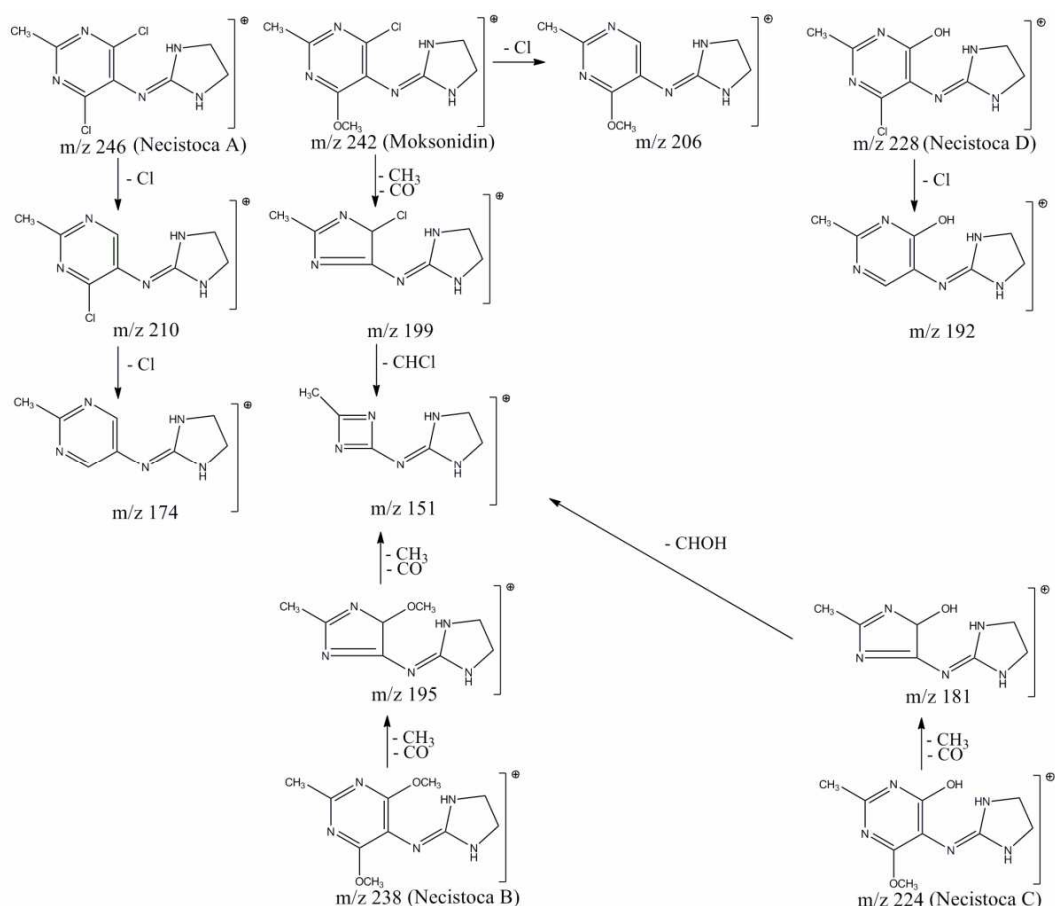
U masenom spektru nečistoće B zabeleženo je formiranje fragmentnih jona sa m/z odnosom 195,00 (9 V), 179,99 (14 V) i 150,99 (12 V).

Maseni spektar nečistoće C pokazao je karakteristične fragmente sa m/z odnosom od 150,98 (7 V), 180,98 (9 V), 124,01 (13 V) i 165,99 (13 V).

Protonovani molekularni jon nečistoće D zabeležen je sa fragmentnim jonima koji su imali m/z odnos od 141,06 (13 V), 191,99 (6 V) i 195,77 (8 V).

Maseni spektar pika nepoznate nečistoće, sa retencionim vremenom 2,98 minuta, sa hromatograma uzorka izloženog hidrolizi u kiselj sredini pokazao je protonovani molekularni jon (MH⁺) sa m/z 272, dok su fragmentacijom pri različitim kolizionim energijama formirani fragmentni joni sa m/z odnosom 218,31 (15 V), 253,85 (1 V), 189,17 (11 V), 147,77 (25 V), 196,73 (8 V) i 222,95 (7 V). Kako se dobijeni fragmentni joni razlikuju od fragmentnih jona moksonidina, strukturne karakteristike nepoznatog degradacionog proizvoda nisu utvrđene.

Daljom fragmentacijom, putem (MS)ⁿ analize moglo bi se doći do saznanja o njenoj strukturi, odnosno o postojanju potencijalne istovetnosti dobijenih fragmentnih jona sa fragmentima moksonidina. Pored toga, primena nuklearne magnetne rezonantne spektroskopije može obezbediti detaljnu strukturnu analizu. Međutim, kako je navedeni nepoznati degradacioni proizvod u uslovima forsirane degradacije hidrolizom u kiselj sredini formiran u količini koja je ispod propisanog limita za studije forsirane degradacije, navedena ispitivanja u cilju strukturne identifikacije biće svrsishodna samo ukoliko se isti bude javljao i kroz ubrzane i dugoročne studije stabilnosti moksonidina.



Slika 37. Predloženi put fragmentacije moksonidina i njegovih nečistoća

Obim i put fragmentacije molekula moksonidina i njegovih nečistoća, kao i vrednosti kolizione energije zavise od broja i vrste prisutnih supstituenata, ali i od broja dvostrukih veza i rezonantne stabilizacije nastalih fragmentnih jona.

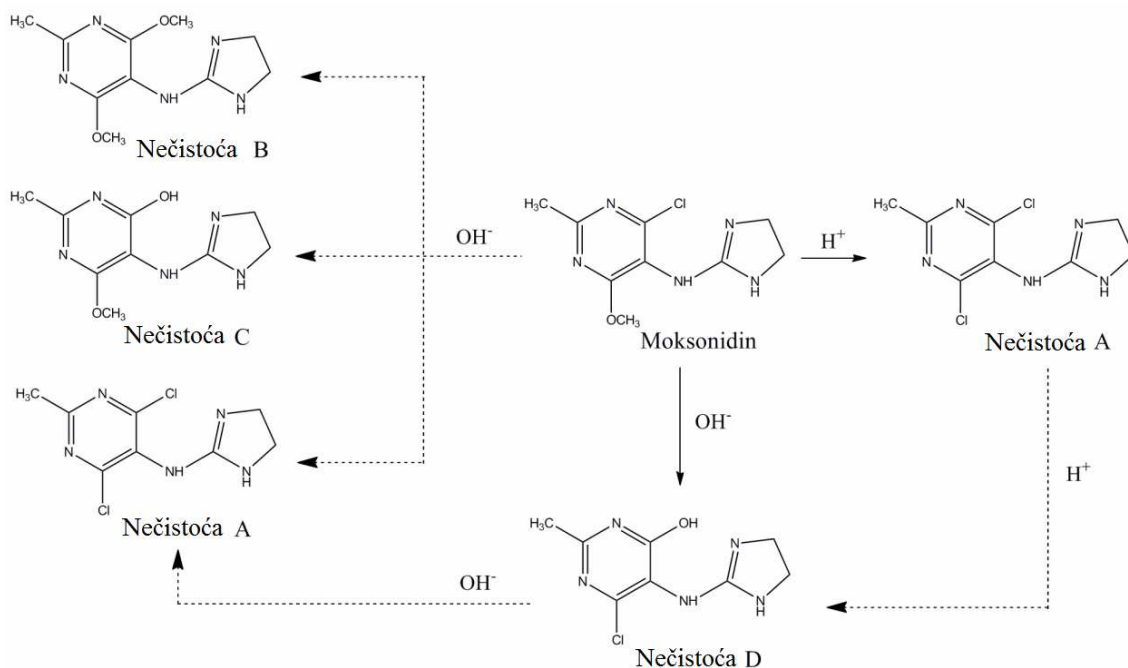
U slučaju molekula moksonidina i nečistoća A i D, zapažaju se fragmentni joni nastali kao rezultat odvajanja atoma hlora, sa m/z odnosom 206,03, 209,83 i 191,99, tim redosledom. Odvajanjem drugog atoma hlora u masenom spektru nečistoće A nastaje fragmentni jon sa m/z odnosom od 173,94. Sa druge strane, za jedinjenja koja poseduju metoksi grupu zapažen je jedinstven put fragmentacije, što potvrđuje i identična vrednost kolizione energije (9 V) pri kojoj dolazi do formiranja fragmentnih jona, usled cepanja najpre metil radikala iz metoksi supstituenta, a zatim i odvajanja CO grupe čime dolazi do narušavanja strukture pirimidinskog prstena, i formiranja petočlanog prstena (imidazolska struktura). Na taj način nastaju fragmentni joni sa razlikom 43 u odnosu na osnovni molekulski jon moksonidina i nečistoća B i C, koji su u masenom spektru zabeleženi sa m/z odnosom od 198,96, 195,00 i 180,98, tim redosledom. Dalja

fragmentacija istim putem će u slučaju nečistoće B dovesti do formiranja intermedijernog fragmenta sa m/z odnosom od 179,99 (cepanje metil radikala sa druge metoksi grupe), a odvajanjem CO grupe do formiranja fragmentnog jona sa m/z odnosom od 150,99 i cepanja imidazolske strukture. Kako su u masenom spektru moksonidina, kao i nečistoće C zabeleženi fragmentni joni sa vrlo bliskim m/z odnosom (149,03 i 150,98), može se pretpostaviti da se dalji put fragmentacije ovih jedinjenja odvija cepanjem petočlanog imidazolovog prstena i odvajanjem CHCl radikala u slučaju moksonidina, odnosno CHOH u slučaju nečistoće C.

4.3.7 Predloženi put degradacije za moksonidin

Pozicije 2-, 4- i 6- pirimidinskog prstena su deficitarne elektronima usled delokalizacije elektrona ka elektronegativnim atomima azota u samom pirimidinskom prstenu, zbog čega se ovoj strukturi ne pripisuje tipičan aromatični karakter. Navedena delokalizacija elektrona će uticati na reaktivnost supstituenata na ovim pozicijama pirimidinskog prstena. Primera radi, atom halogena na ovim pozicijama lako podleže nukleofilnoj supstituciji, pa će u slučaju kisele ili bazne hidrolize nukleofilnim napadom biti supstituisan hidroksilnom grupom. Međutim, ovaj proces može biti donekle otežan u prisustvu supstituenata obogaćenih elektronima (hidroksilna grupa, amino grupa). Hidroliza se generalno lakše odvija na pozicijama 2-, 4- i 6- pirimidinskog prstena, nego na poziciji C-5 [101]. Navedene činjenice idu u prilog rezultatima sprovedene studije forsirane degradacije, kojima je dokazana nestabilnost moksonidina u uslovima hidrolize u kiseloj i baznoj sredini.

Predloženi put degradacije moksonidina predstavljen je na slici 38. Isprekidanim strelicama predstavljen je put degradacije koji je primećen u značajno manjem obimu, a za koji se može očekivati da bude intenzivniji u slučaju jačih stres uslova.



Slika 38. Predloženi put degradacije moksonidina

Nastajanje nečistoće A kao degradacionog proizvoda u kiseljoj sredini povezano je sa reakcijom nukleofilne supstitucije na položaju C-6 pirimidinskog prstena pri čemu dolazi do zamene metoksi grupe atomom hlora, dok je građenje nečistoće D, kao dominantnog degradacionog proizvoda u baznoj sredini takođe povezano sa reakcijom nukleofilne supstitucije u prisustvu hidroksilne grupe i intramolekulskim premeštanjem atoma hlora na položaj C-6.

Na osnovu sprovedenih studija forsirane degradacije uočeno je da se zagrevanjem intenzivira hidroliza u baznoj sredini. Takođe, nečistoća A hidrolizom kako u kiseljoj, tako i u baznoj sredini može nagraditi nečistoću D. U baznoj sredini beleži se i porast nečistoće B jer oslobodena metoksi grupa kao nuleofil može da napada intermedijerne forme molekula moksonidina (npr. kada se hlor oslobađa sa pozicije C-4) što rezultira neznatnim porastom nečistoće B. Na hromatogramu dobijenom analizom uzorka nakon hidrolize u baznoj sredini takođe se mogu zapaziti minorni pikovi nečistoća C i A koji mogu voditi poreklo ne samo od molekule moksonidina, već i od reakcija nukleofilne supstitucije na nivou nagrađenog degradacionog proizvoda, nečistoće D. Takođe, nastajanje nečistoće C u baznoj sredini može biti favorizovano supstitucijom metoksi grupe hidroksilnom na nivou nagrađene nečistoće B.

4.4 RAZVOJ I OPTIMIZACIJA *STABILITY-INDICATING* UHPLC METODE ZA MOKSONIDIN

4.4.1 Preliminarna ispitivanja

Nakon razvoja i validacije HPLC metode, dalja ispitivanja moksonidina bila su fokusirana na sprovođenje studije forsirane degradacije moksonidina, kako bi se definisao njegov degradacioni profil. Za razvoj *stability-indicating* metode izabrana je UHPLC tehnika, koja danas predstavlja hromatografsku tehniku izbora naročito u ispitivanju uzoraka dobijenih nakon studija forsirane degradacije, zbog visoke osetljivosti i značajno unapređenih performansi u odnosu na HPLC tehniku (videti poglavlje 1.4.2). Pošto je za najpouzdanije definisanje konačnog degradacionog profila, koje uključuje i identifikaciju potencijalno dobijenih nepoznatih degradacionih proizvoda neophodno uključiti masenu spektrometriju (UHPLC-MS i UHPLC-MS/MS), transfer HPLC metode u UHPLC metodu je bio isključen, zbog neophodnosti promene pufera mobilne faze.

Preliminarna ispitivanja uslova za razvoj UHPLC tehnike, izbor kolone i faktora koji mogu uticati na hromatografsko ponašanje moksonidina, zasnivao se na već utvrđenim saznanjima tokom razvoja HPLC metode. Kako je moksonidin pokazao najbolje retencione osobine na C₁₈ stacionarnoj fazi, ispitivanja su započeta korišćenjem kolone *Hypersil Gold*, C₁₈ (50 mm x 2,1 mm, 1,9 μm). U pitanju je stacionarna faza koju čini visoko prečišćena silika kod koje su slobodne silanolne grupe zaštićene (eng. *endcapped*) uvođenjem alkil grupa, i dodatno tehnološki unapređene postupkom derivatizacije čime je njihova reaktivnost umanjena. Preliminarni eksperimenti vršeni su pri protoku mobilne faze od 300 μL min⁻¹ i injekcionom zapreminom od 3 μL, dok je talasna dužina ostala nepromenjena (255 nm). Ispitivanje je započeto pri istim uslovima temperature kolone i pH vrednosti mobilne faze kao u slučaju HPLC metode, dok je kao modifikator mobilne faze umesto fosfatnog izabran acetatni pufer zbog njegove isparljivosti i kompatibilnosti sa MS detektorom [46]. Metanol je na osnovu već opisanih prednosti (videti poglavlje 4.1.1) i njegove pogodnosti za MS analizu zadržan kao organska komponenta mobilne faze. Zapaženo je da je redosled eluiranja ispitivanih komponenti ostao nepromenjen i na UHPLC koloni, čime je dodatno potvrđena konzistentnost hromatografskog ponašanja moksonidina i njegovih nečistoća. Tokom ispitivanja je utvrđeno da i pored promena udela metanola u mobilnoj fazi (od početnih

5 %) i pH vrednosti pufera, rezolucija između ispitivanih komponenti nije dala zadovoljavajuće rezultate, dok je sa porastom udela metanola njena vrednost dodatno opadala. Poznato je da porast temperature kolone smanjuje viskozitet mobilne faze, omogućavajući njen brži protok, bez negativnog uticaja na vrednost pritiska u UHPLC koloni. Iako je povećanje temperature dovelo do željenog skraćenja retencionog vremena ispitivanih komponenti, njihovo razdvajanje na baznoj liniji nije bilo unapređeno. Kako je smanjenje udela metanola u mobilnoj fazi bilo neophodno u cilju značajnijeg poboljšanja hromatografskih parametara, kao problem se nametnula ograničena stabilnost korišćene stacionarne faze u datim uslovima. Zbog navedenog, u daljem toku ispitivanja uvedena nova hromatografska kolona *Hypersil Gold aq, C₁₈* (100 mm x 2,1 mm, 1,9 μm), kod koje su posebnim tehnološkim postupkom uvedene polarne funkcionalne grupe čime je njena otpornost povećana u uslovima potpuno vodenih mobilnih faza, uz očuvanu efikasnost i stabilnost. Zato je u nastavku ispitivanja metanol isključen iz mobilne faze. Na novoj koloni je postignuta zadovoljavajuća rezolucija između ispitivanih komponenti, čemu je dodatno doprinelo i povećanje dužine kolone. U cilju smanjenja retencionog vremena ispitivanih komponenti istovremeno je povećavana temperatura kolone i protok mobilne faze. Poznato je da u UHPLC sistemu porast protoka ne ugrožava postignutu rezoluciju i efikasnost (videti poglavlje 1.4.1.2), te je i u ovom slučaju zadovoljavajuće skraćenje vremena analize postignuto uz očuvanje navedenih parametara. Na taj način su definisani preliminarni UHPLC uslovi koji su primenjeni za analizu uzoraka dobijenih u studiji forsirane degradacije. Mobilnu fazu činio je rastvor amonijum-acetata (10 mmol L⁻¹) pH 3,5, temperatura kolone iznosila je 55 °C, protok 450 μL min⁻¹, dok su talasna dužina i injekciona zapremina ostali nepromenjeni.

4.4.2 Primena frakcionog faktorskog dizajna u *screening* fazi

Tokom preliminarnih ispitivanja u razvoju UHPLC metode ustanovljeno je da su faktori koji utiču na hromatografsko ponašanje ispitivanih komponenti generalno isti kao i u slučaju razvoja HPLC metode. Zato je u toku *screening* faze odlučeno da se uticaj tih faktora i statistički proceni, izvođenjem ograničenog broja eksperimenata, prema planu 2⁴⁻¹ frakcionog faktorskog dizajna, a u cilju iznalaženja najpogodnije eksperimentalne oblasti u kojoj će hromatografski parametri biti maksimalno unapređeni. U odnosu na preliminarna ispitivanja, a u svrhu redukcije vrednosti onih

faktora koji mogu ugroziti vek trajanja UHPLC kolone (slaba regenerabilnost čestica stacionarne faze ispod 2 μm), odlučeno je da se uticaj promene temperature i koncentracije pufera prati kroz opadajući opseg vrednosti. Ispitivani faktori i njihovi novoi predstavljeni su u tabeli 14, dok je plan eksperimenata za 2^{4-1} frakcioni faktorski dizajn prikazan u tabeli 15.

Tabela 14. Nivoi ispitivanih faktora

Ispitivani faktori	Nivoi ispitivanih faktora		
	niži (-1)	srednji (0)	viši (+1)
Udeo metanola (% , x_1)	0	3	6
pH vodene faze (x_2)	2,5	3,0	3,5
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$, x_3)	25	40	55
Koncentracija $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ u mobilnoj fazi (mmol L^{-1} , x_4)	0	5	10

Tabela 15. Plan eksperimenata za 2^{4-1} frakcioni faktorski dizajn

Broj eksperimenta	Nivoi ispitivanih faktora			
	x_1	x_2	x_3	x_4
1.	0	0	0	0
2.	0	0	0	0
3.	+1	+1	+1	+1
4.	0	0	0	0
5.	-1	-1	-1	-1
6.	+1	-1	-1	+1
7.	+1	-1	+1	-1
8.	0	0	0	0
9.	-1	+1	+1	-1
10.	-1	-1	+1	+1
11.	-1	+1	-1	+1
12.	+1	+1	-1	-1

Tokom *screening* faze izvedeno je 8 eksperimenata sa četiri ponavljanja u centralnoj tački, kako bi se izračunala standardna greška. Eksperimenti su izvođeni randomizirano, a kao odgovor sistema praćena je vrednost faktora kapaciteta

moksonidina i nečistoća A, B, C i D. Kako je nakon hidrolize moksonidina u kiseloj sredini zabeležena pojava nepoznatog degradacionog proizvoda čiji je sadržaj bio ispod propisanog limita za studije forsirane degradacije, njegovo dalje praćenje nije bilo neophodno. Međutim, da bi se dodatno stekao uvid u hromatografsko ponašanje nepoznatog degradacionog proizvoda pri promeni različitih hromatografskih faktora, odlučeno je da se tokom procesa optimizacije metode prati i navedeni degradacioni proizvod.

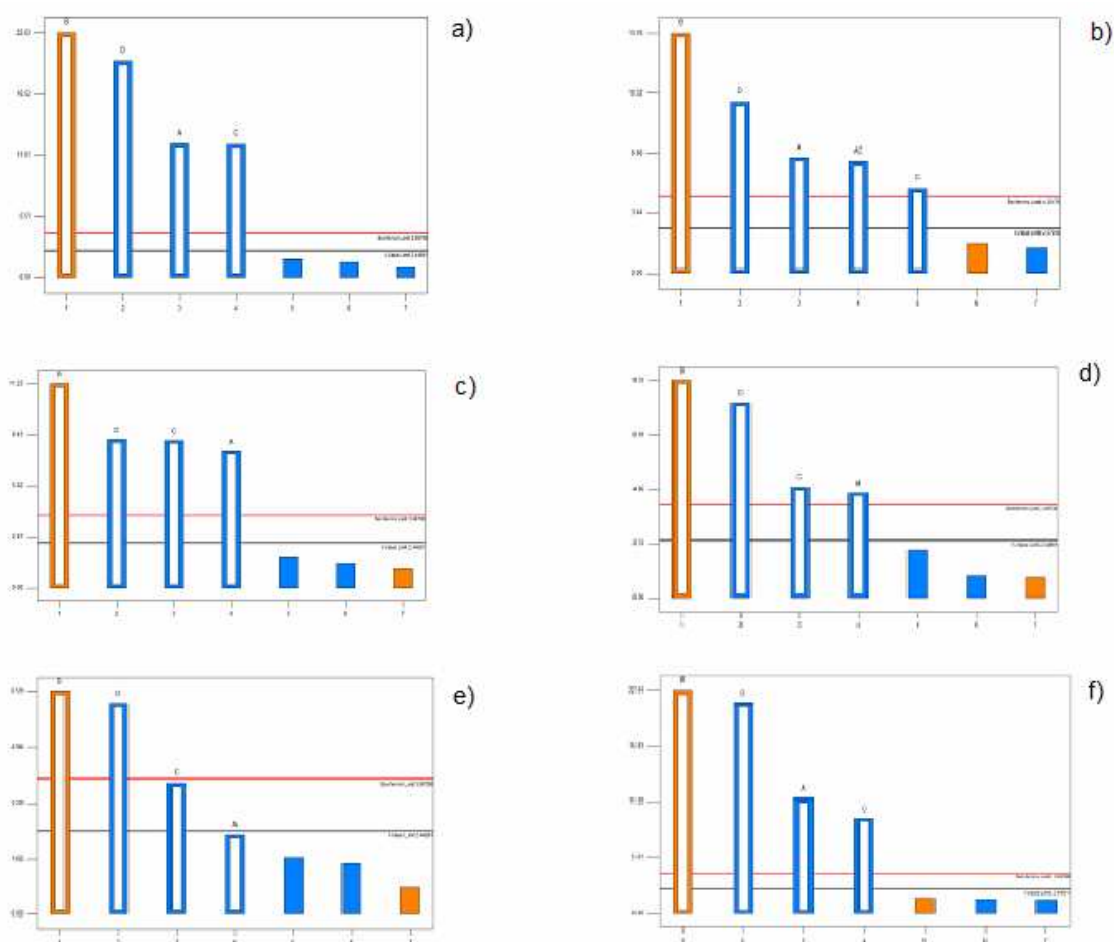
Dobijene vrednosti faktora kapaciteta za ispitivane komponente u *screening* fazi predstavljene su u tabeli 16.

Tabela 16. Plan eksperimenata za *screening* dizajn sa vrednostima faktora kapaciteta ispitivanih supstanci

Broj eksperimenata	Faktor kapaciteta, k'					
	$k'_{\text{moksonidin}}$	k'_A	k'_B	k'_C	k'_D	$k'_{n.d.p.}$
1.	7,19	4,00	14,00	2,55	1,19	5,01
2.	7,19	4,09	14,41	2,74	1,20	5,11
3.	4,40	2,74	9,04	1,67	0,75	3,24
4.	7,20	4,29	14,56	2,82	1,32	5,33
5.	12,85	6,60	24,53	4,74	1,98	8,96
6.	2,48	2,18	6,00	1,37	0,82	1,64
7.	4,59	0,57	9,05	1,72	0,82	3,46
8.	7,22	4,05	14,40	2,75	1,22	5,34
9.	19,71	15,20	29,15	12,25	5,26	17,31
10.	2,55	1,47	4,86	0,92	0,42	1,83
11.	15,82	8,49	32,10	6,19	2,44	10,93
12.	19,85	12,70	29,45	8,78	4,49	15,61

Statističkom obradom dobijenih podataka, primenom višestruke linearne regresione analize izračunati su koeficijenti matematičkih modela za sve dobijene vrednosti faktora kapaciteta ispitivanih supstanci. Radi boljeg uklapanja dobijenih eksperimentalnih rezultata u matematičke modele, za pojedine odgovore sistema je izvršena transformacija, i to pomoću matematičke funkcije kvadratni koren za

moksonidin (\sqrt{k}) i prirodnog logaritma za nečistoće C, D i nepoznati degradacioni proizvod ($\ln(k)$). Značajnost dobijenih koeficijenata, a time i odgovarajućih ispitivanih faktora procenjena je *Studentovim t-testom*. Statistički značajan uticaj na hromatografsko ponašanje, praćenjem faktora kapaciteta, imali su oni koeficijenti, odnosno faktori za koje je izračunata *t*-vrednost veća od tabelarne tj. kritične *t*-vrednosti ($t_{kritično} = 2,45$, dok je za odgovor *k* (nečistoća A) $t_{kritično} = 2,57$). Vizuelna interpretacija rezultata putem Pareto dijagrama data je na slici 39.



Slika 39. Pareto dijagrami izračunatih *t*-vrednosti za koeficijente matematičkih modela ispitivanog odgovora (faktor kapaciteta ispitivanih supstanci), gde je A – udeo metanola u mobilnoj fazi (%); B – pH vrednost vodene faze ; C – temperatura kolone (°C); D – koncentracija amonijum-acetata u mobilnoj fazi (mM).

Na predstavljenim Pareto dijagramima jasno se zapaža da sva četiri ispitivana faktora, osim u slučaju nečistoće D, imaju statistički značajan uticaj na ispitivani

hromatografski parametar, što ukazuje na dobru selekciju uticajnih faktora pre započinjanja *screening* dizajna. Najuticajniji među faktorima i jedini sa pozitivnim smerom dejstva je pH vrednost vodene komponente mobilne faze, što znači da se sa povećanjem vrednosti ovog faktora i praćeni odgovor sistema povećava. Ostala tri faktora imaju negativan uticaj, pa se sa povećanjem njihove vrednosti očekuje smanjenje odgovora sistema. Udeo metanola u mobilnoj fazi pokazuje nešto slabiji uticaj, a u slučaju nečistoće D on nije statistički značajan. Faktor temperature kolone je po svom intenzitetu sličan faktoru udela metanola, dok se jedino kod nepoznatog degradacionog proizvoda zapaža statistička značajnost interakcije ova dva faktora na ispitivani odgovor. Zanimljivo je zapaziti da je uticaj koncentracije pufera po svom intenzitetu na drugom mestu za sve ispitivane odgovore. Međutim, imajući u vidu izražen uticaj ovog faktora na trajanje hromatografske analize (vrednosti na nižem i srednjem ispitivanom nivou) kao i na izgled hromatografskog pika moksonidina (pojava izraženog *tailing*-a u odsustvu pufera, tj. pri nižem ispitivanom nivou), odlučeno je da se analiza uticaja preostalih faktora u okviru optimizacionog dizajna vrši pri konstantnoj vrednosti koncentracije pufera od 10 mmol L⁻¹. Ova koncentracija pufera odgovara gornjem nivou ispitivanog faktora u okviru *screening* faze.

4.4.3 Primena *Box-Behnken* dizajna u optimizacionoj fazi

Faktori koji su u toku *screening* faze pokazali statistički značajan uticaj na odgovor sistema, detaljnije su ispitani primenom 3³ *Box-Behnken* dizajna, kako bi se u višekomponentnom sistemu strukturno veoma sličnih jedinjenja predvideli optimalni uslovi za hromatografsku analizu. Ispitivani faktori i njihovi nivoi predstavljeni su u tabeli 17, dok je plan eksperimenata za 3³ *Box-Behnken* dizajn prikazan u tabeli 18.

Tabela 17. Nivoi ispitivanih faktora

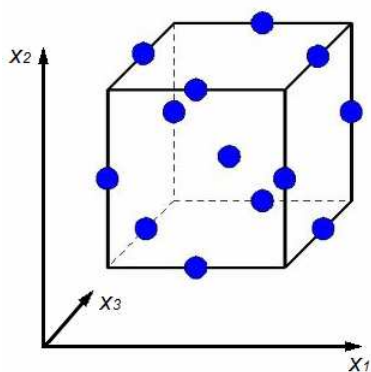
Ispitivani faktori	Nivoi ispitivanih faktora		
	niži (-1)	srednji (0)	viši (+1)
Udeo metanola (% , x_1)	0	3	6
pH vodene faze (x_2)	2,5	3,0	3,5
Temperatura (°C, x_3)	35	45	55

Tabela 18. Plan eksperimenata za *Box-Behnken* dizajn

Broj eksperimenata	Nivoi ispitivanih faktora		
	x_1	x_2	x_3
1.	+1	0	-1
2.	+1	0	+1
3.	0	-1	+1
4.	0	+1	+1
5.	-1	+1	0
6.	0	+1	-1
7.	0	0	0
8.	0	0	0
9.	0	0	0
10.	+1	+1	0
11.	+1	-1	0
12.	-1	0	+1
13.	-1	0	-1
14.	0	-1	-1
15.	-1	-1	0
16.	0	0	0

Izuzimajući uticaj koncentracije pufera zbog već navedenog obrazloženja, odlučeno je da se usled potvrđenog statistički značajnog uticaja faktora x_1 i x_2 na ispitivanim nivoima tokom *screening* faze, vrednost istih u optimizacionoj fazi ne menja. Međutim, kako je tokom *screening* faze zapaženo da temperatura od 25 °C značajno prolongira trajanje analize, odlučeno je da se tokom optimizacije metode eksperimentalni opseg za faktor x_3 suzi za 10 °C, tako da je niži nivo ispitivanog faktora iznosio 35 °C.

Eksperimenatni prostor u slučaju 3^3 *Box-Behnken* dizajna ima formu kocke (slika 40) pri čemu su eksperimentalne tačke locirane na ivicama kocke i u njenom centru, što isključuje izvođenje eksperimenata pri ekstremnim vrednostima nivoa faktora, specifičnim za uglove kocke. U okviru 3^3 *Box-Behnken* dizajna je izvedeno ukupno 16 eksperimenata uključujući i ponavljanja u centralnoj tački.



Slika 40. Grafički prikaz eksperimentalnog prostora za 3^3 Box-Behnken dizajn

Eksperimenti su izvođeni randomizirano, a kao odgovor sistema praćena je vrednost rezolucije između hromatografskih pikova ispitivanih komponenti. Praćena je rezolucija između sledećih parova: nečistoća C/D ($R_{C/D}$), nečistoća C/A ($R_{C/A}$), nečistoća A/moksonidin ($R_{A/moksonidin}$), moksonidin/nečistoća B ($R_{moksonidin/B}$) i nečistoća A/nepoznati degradacioni proizvod ($R_{A/n.d.p.}$). Dobljene vrednosti navedenog parametra za ispitivane parove predstavljene su u tabeli 19.

Tabela 19. Plan eksperimenata za 3^3 *Box-Behnken* dizajn sa vrednostima rezolucije između ispitivanih supstanci

Broj eksperimenata	Rezolucija, R				
	$R_{C/D}$	$R_{C/A}$	$R_{A/moksonidin}$	$R_{moksonidin/B}$	$R_{A/n.d.p.}$
1.	3,03	1,61	1,32	5,03	0
2.	2,19	1,68	0,94	4,00	0
3.	0,76	1,00	0,64	2,12	0
4.	2,48	2,23	1,67	4,08	0,76
5.	4,16	2,33	1,41	4,22	0,53
6.	4,32	2,27	1,42	4,15	0
7.	1,33	1,33	1,21	4,12	0
8.	2,43	1,78	1,32	4,39	0
9.	2,00	1,50	1,27	4,20	0
10.	4,31	2,23	1,67	4,08	0
11.	0,78	0,98	0,68	2,38	0
12.	1,19	1,19	1,29	4,61	1,10
13.	1,77	2,22	1,12	4,08	0
14.	0,87	1,06	0,74	2,19	0
15.	0,94	0,97	0,67	2,29	0
16.	1,90	1,45	1,24	4,17	0

Prilikom statističke obrade rezultata primenom odgovarajućeg softvera (videti poglavlje 3.1.6), preporučeno je da se u slučaju parova nečistoća C/D i nečistoća A /nepoznati degradacioni proizvod, ne posmatra direktno zavisnost rezolucije od različitih vrednosti ispitivanih faktora već da se na posmatrani odgovor sistema primeni matematička transformacija, prirodni logaritam, tako da je zavisno promenljiva zapravo $\ln(R_{C/D})$ i $\ln(R_{A/n.d.p.})$.

Na osnovu eksperimentalnih podataka, u zavisnosti od ispitivanog odgovora sistema, dobijeni su linearni, interakcioni i kvadratni matematički modeli, koji su predstavljeni polinomima prvog odnosno drugog reda, a kojima se opisuje zavisnost između ispitivanih faktora (x_1, x_2, x_3) i posmatranih odgovora sistema (y).

Za ispitivane odgovore $\ln(R_{D/C})$ i $R_{C/A}$ dobijen je linearni matematički model, koji se može predstaviti sledećim polinomom prvog reda:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 \quad (11)$$

Polinomom drugog reda kojim je predstavljen interakcioni matematički model opisana je zavisnost između ispitivanih faktora i odgovora $R_{A/moksonidin}$ i $\ln(R_{A/n.d.p.+0.01})$:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 \quad (12)$$

Kvadratni matematički model koji je dobijen za ispitivani odgovor $R_{moksonidin/B}$ predstavljen je sledećim polinomom drugog reda:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 \quad (13)$$

Vrednosti izračunatih koeficijenata za ispitivane odgovore sistema predstavljene su u tabeli 20.

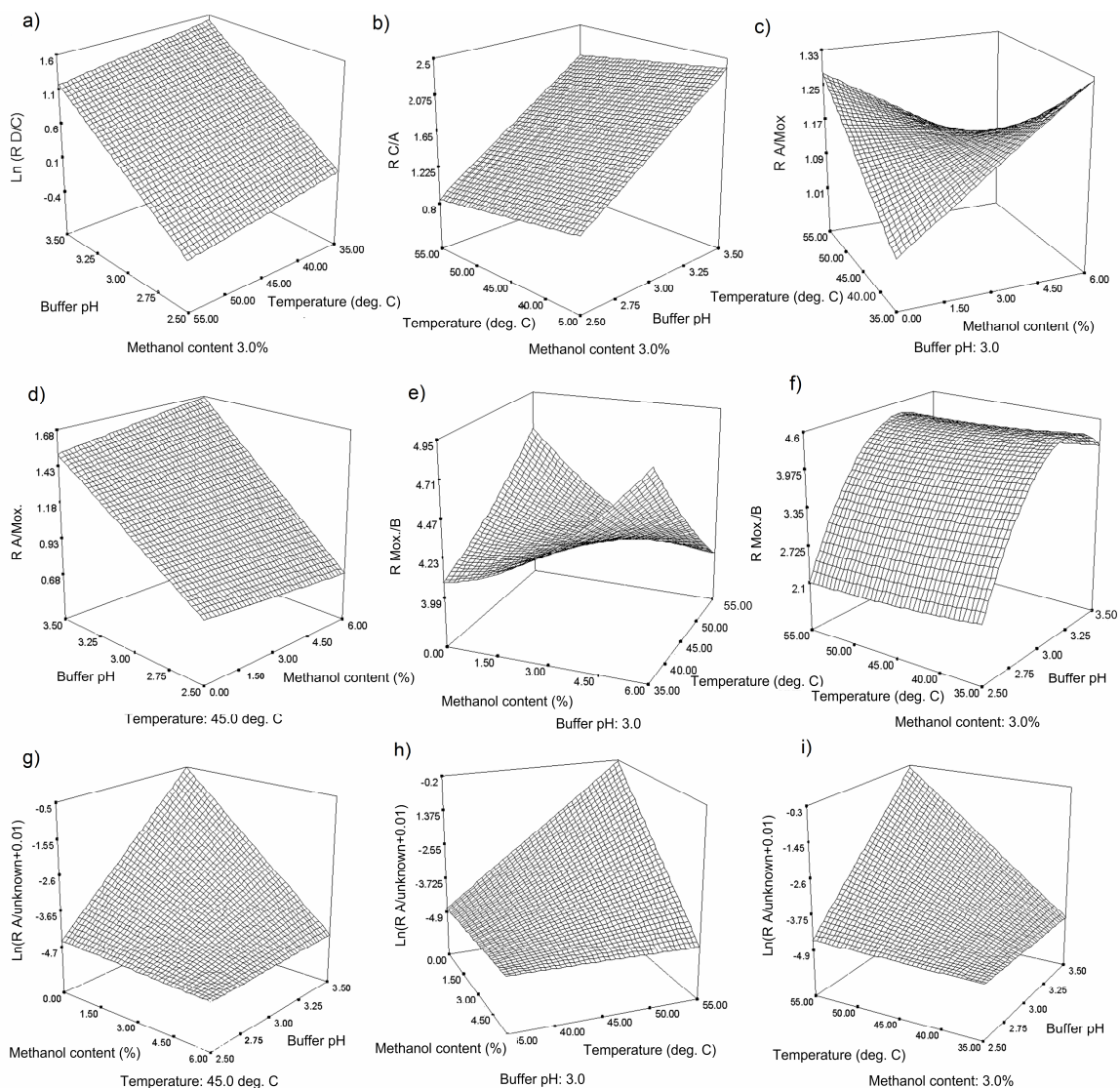
Tabela 20. Koeficijenti matematičkih modela dobijeni primenom *Box-Brehnken* optimizacionog dizajna

Koeficijenti modela	Rezolucija (R)				
	$\ln(R_{D/C})$	$R_{C/A}$	$R_{A/moksonidin}$	$R_{moksonidin/B}$	$\ln(R_{A/n.d.p.+0.01})$
b_0	-3,2119	-1,5506	+0,7206	-42,9272	+4,0395
b_1	+0,0415	-0,0087	+0,0862	+0,6062	+3,3238
b_2	+1,4955	+1,2625	-0,0525	+29,2725	-5,5779
b_3	-0,0176	-0,0132	-0,0395	-0,0151	-0,4112
b_{11}				+0,0176	
b_{22}				-4,5450	
b_{33}				+0,0005	
b_{12}			+0,0417	-0,0383	-0,6492
b_{13}			-0,0046	-0,0130	-0,0384
b_{23}			+0,0170	+0,0000	+0,2125

Analizom dobijenih vrednosti koeficijenata, zapaža se da pH vrednost vodene faze predstavlja najuticajnji faktor na vrednost rezolucije između gotovo svih ispitivanih parova, a naročito između hromatografskog pika moksonidina i nečistoće B. Uzimajući u obzir činjenicu da se nečistoća B poslednja eluira, značaj ovog faktora se samim tim ogleda i u direktnom uticaju na trajanje hromatografske analize. Udeo

metanola u mobilnoj fazi ima najznačajniji uticaj na rezoluciju između nečistoće A i nepoznatog degradacionog proizvoda, tako da se sa povećanjem ovog faktora i vrednost rezolucije povećava. Apsolutna vrednost koeficijenata koji ukazuju na uticaj temperature kolone je u slučaju svih ispitivanih parova bila najniža, te se može zaključiti da promene ovog faktora najmanje utiču na vrednosti rezolucije između ispitivanih parova. Faktorske interakcije, koje su zapažene kod poslednja tri ispitivana para, nisu pokazale značajniji uticaj na vrednosti rezolucije, što potvrđuje apsolutna vrednost koeficijenata koji ih karakterišu, kao i činjenica da je njihova vrednost u svim slučajevima bila manja od vrednosti koeficijenata koji ukazuju na pojedinačan uticaj faktora.

Zavisnost odgovora sistema od pojedinačnih faktora, ali i međusobnih faktorskih interakcija u okviru ispitivanog eksperimentalnog regiona vizuelno se mogu predstaviti putem 3D dijagrama, imajući u vidu da *Box-Behnken* dizajn spada u grupu dizajna površine odgovora (eng. *response surface design*). Planarne površine na 3D dijagramima karakteristične su za odgovore sa linearnim matematičkim modelom, dok zakrivljene površine ukazuju na postojanje interakcija, pa se zapažaju kod interakcionog i kvadratnog matematičkog modela. Na slici 41 predstavljeni su 3D dijagrami ispitivanih odgovora sistema u zavisnosti od dva ispitivana faktora, pri konstantnoj vrednosti trećeg faktora.



Slika 41. 3D dijagrami površine odgovora sistema za rezoluciju između hromatografskih pikova ispitivanih komponenti

Na predstavljenim 3D dijagramima jasno se uočavaju zakrivljene površine za ispitivani odgovor koji sadrži kvadratne članove matematičkog modela ($R_{moksonidin/B}$). Najveću vrednost među koeficijentima kvadratnih članova ima promena pH vrednosti vodene faze. Na 3D dijagramu za ovaj odgovor zapaža se da promena za samo jednu pH jedinicu dovodi do dvostrukog smanjenja rezolucije između hromatografskog pika moksonidina i nečistoće B (slika 41 f). Sa druge strane, površine na 3D dijagramima za odgovore $R_{A/moksonodin}$ i $\ln(R_{A/n.d.p.+0.01})$ imaju slabiju zakrivljenost, jer je zbog odsustva kvadratnih članova ona uslovljena samo prisustvom faktorskih interakcija (slika 41 c, d, g, h, i). Planarne površine koje se uočavaju za posmatrane odgovore $\ln(R_{D/C})$ i $R_{C/A}$,

ukazuju na odsustvo međufaktorskih interakcija (slika 41 a, b). Analizom dobijenih površina za odgovor $R_{A/moksonidin}$ zapaža se značajan uticaj promene pH vrednosti mobilne faze na vrednost rezolucije, kada se ovaj faktor u okviru definisanog eksperimentalnog područja istovremeno menja sa udelom metanola. Sa druge strane, kada se pH vrednost kao najuticajniji faktor održava konstantnom (srednji nivo), uticaj istovremene promene preostala dva faktora na rezoluciju je znatno ujednačeniji.

Ponavljanje eksperimenata u centralnoj tački omogućilo je izračunavanje standardne eksperimentalne greške, kao i procenu adekvatnosti uklapanja matematičkih modela sa eksperimentalno dobijenim podacima (eng. *lack of fit*). Statistička procena značajnosti koeficijenata modela, izvršena je primenom F -testa, dok je za procenu adekvatnosti uklapanja matematičkog modela i eksperimentalno dobijenih podataka primenjena analiza varijanse (ANOVA). Dobijene F -vrednosti predstavljaju odnos sume kvadrata greške uklapanja matematičkog modela (SS_{lof}) i sume kvadrata čiste eksperimentalne greške (SS_{pe}). Rezultati regresione analize za ispitivane odgovore sistema predstavljeni su u tabeli 21.

Tabela 21. Prikaz rezultata regresione analize (ANOVA)

Ispitivani odgovor sistema	Parametri ANOVA				
	SS_{pe}	SS_{lof}	F -vrednost	R^2	R^2_a
$\ln(R_{D/C})$	0,1900	0,3600	0,6316	0,8977	0,8721
$R_{C/A}$	0,1100	0,4600	1,3939	0,8544	0,8180
$R_{A/moksonidin}$	0,0066	0,0970	3,3485	0,9395	0,8992
$R_{moksonidin/B}$	0,0420	0,0460	1,0952	0,9934	0,9834
$\ln(R_{A/n.d.p.+0.01})$	1,4000	1,0100	0,3607	0,9442	0,9070

Upoređivanjem dobijenih F -vrednosti za svaki odgovor sistema sa tabelarnom vrednošću za odgovarajući broj stepeni slobode, i nivo pouzdanosti 95 % ($F_{tabelarno} = 8,81$ za posmatrani odgovor $\ln(R_{C/D})$ i $R_{C/A}$; $F_{tabelarno} = 8,94$ za odgovore $R_{A/moksonidin}$ i $\ln(R_{A/n.d.p.})$; $F_{tabelarno} = 9,28$ za odgovor $R_{moksonidin/B}$), zaključeno je da dobijeni model adekvatno opisuje ponašanje hromatografskog sistema, te da ne postoji statistički značajno odstupanje eksperimentalno dobijenih rezultata od onih predviđenih modelom. Vrednosti koeficijenata determinacije (R^2), uzimajući u obzir i broj stepeni slobode

(R^2_a), takođe su ukazale na dobro slaganje eksperimentalnih i vrednosti predviđenih matematičkim modelom.

4.3.3. Primena multikriterijumskog odlučivanja u formi Deringerove funkcije

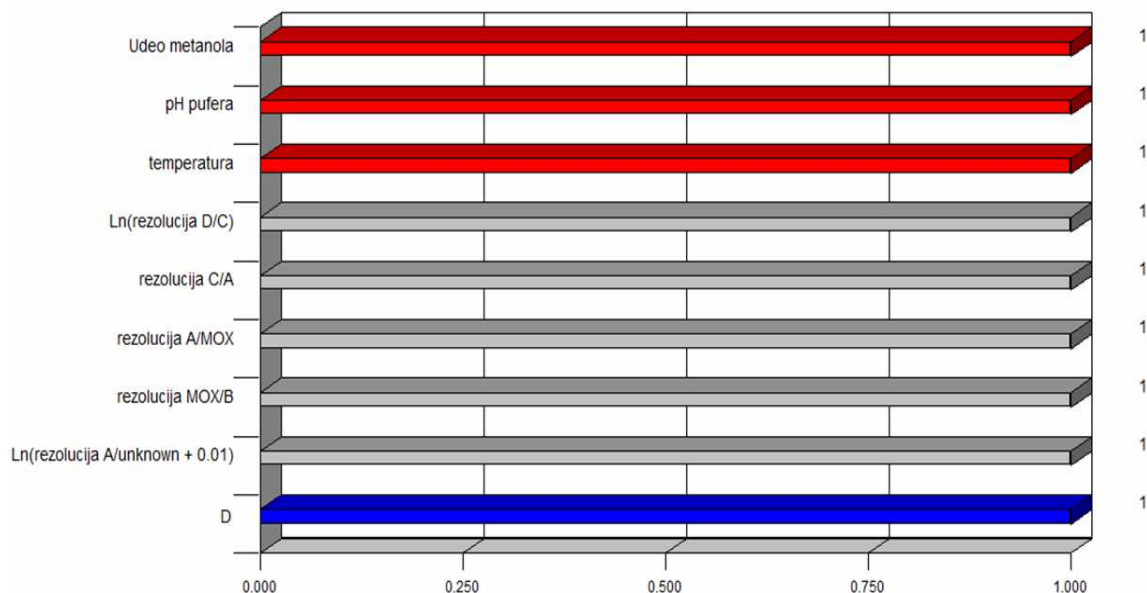
Sagledavanjem svih pojedinačnih odgovora sistema, najoptimalniji uslovi za izvođenje hromatografske analize mogu se iznaći u onom delu 3D dijagrama površina odgovora sistema gde one dostižu svoj maksimum. Međutim, pošto se prati više odgovora sistema, čiji se matematički modeli, kao i dobijene površine međusobno razlikuju, procena optimalnih uslova može biti otežana, a vrlo često i neadekvatna. Iz navedenog razloga sprovedena je višestruka optimizacija putem izračunavanja *Derringer*-ove funkcije poželjnih odgovora sistema u kojoj se kombinuju rezultati različitih matematičkih modela i uklapaju se u jednu matematičku jednačinu. Takođe, u navedenoj funkciji su sadržani i postavljeni ciljevi optimizacije, koji se odnose na postizanje što je moguće veće vrednosti posmatranog odgovora u okviru ispitivanog eksperimentalnog prostora, ali uz mogućnost kraćeg trajanja hromatografske analize. Postavljeni ciljevi za ispitivane odgovore sistema navedeni su u tabeli 22.

Tabela 22. Pregled postavljenih ciljeva za posmatrane odgovore u okviru multikriterijumske optimizacije metode

Posmatrani odgovor	Cilj	Donja granica	Gornja granica
$\ln(R_{D/C})$	Opseg	0,11	1,46
$R_{C/A}$	Opseg	1,20	2,33
$R_{A/moksonidin}$	Opseg	1,20	1,67
$R_{moksonidin/B}$	Opseg	2,12	5,03
$\ln(R_{A/n.d.p.+0.01})$	Opseg	0,08	0,10

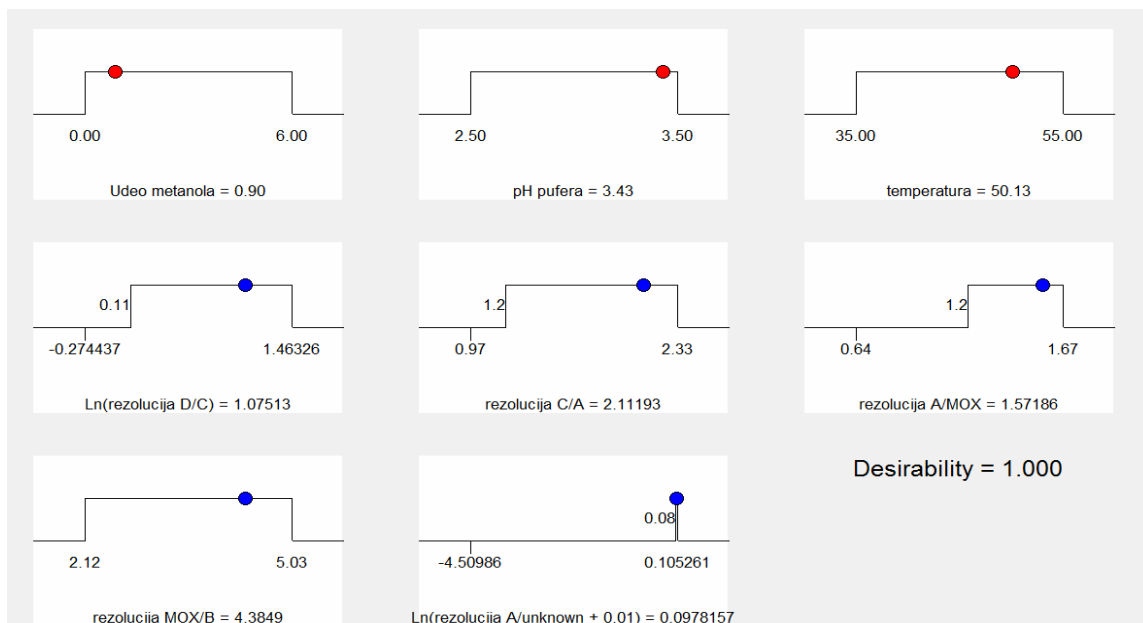
Tokom optimizacije metode uočeno je da rezolucija između moksonidina i nečistoće B pri svim ispitivanim eksperimentalnim uslovima ima konstantno veću vrednost u odnosu na rezoluciju između preostalih parova. Cilj koji je postavljen za navedeni par odnosio se na postizanje što kraće hromatografske analize, uz održavanje što je moguće pogodnije vrednosti rezolucije, u okviru definisanog opsega. Za preostale parove postavljeni ciljevi su se takođe odnosili na skraćanje hromatografskog *run*-a, uz održavanje zadovoljavajuće separacije pri vrednostima rezolucije koje se kreću u definisanom opsegu. Takođe, ispunjenje postavljenih ciljeva uključivalo je i očuvanje

simetrije svih hromatografskih pikova. Za sve postavljene ciljeve izabran je isti značaj, odnosno nije bilo favorizovano zadovoljenje ni jednog cilja pojedinačno.



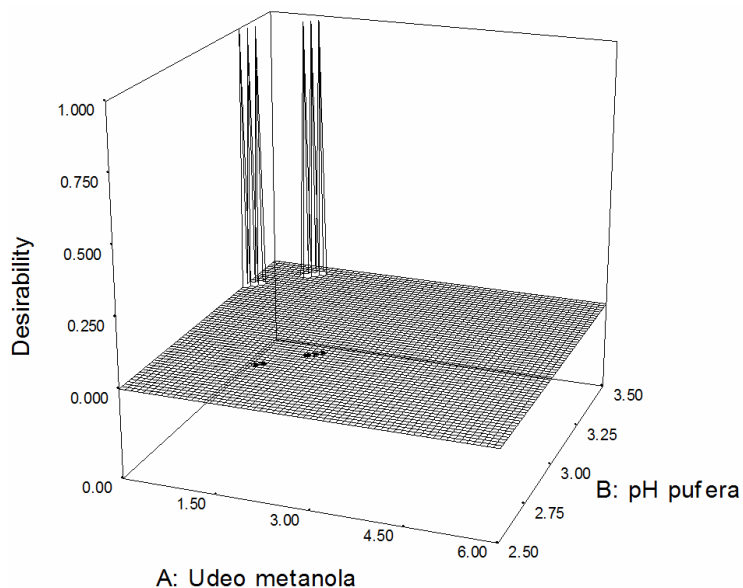
Slika 42. Pareto dijagram vrednosti pojedinačnih i ukupne funkcije poželjnih odgovora

Na Pareto dijagramu (slika 42) predstavljene su dobijene vrednosti pojedinačnih i ukupne funkcije poželjnih odgovora. Kako je u svim slučajevima *Derringer*-ova funkcija imala maksimalnu vrednost, može se zaključiti da su za sve posmatrane odgovore dobijene vrednosti koje se najbolje uklapaju u postavljene ciljeve. Grafički prikaz zadovoljenja postavljenih ciljeva predstavljen je na slici 43.



Slika 43. Grafički prikaz zadovoljenja postavljenih ciljeva unutar ispitivanog eksperimentalnog opsega, u odnosu na postavljene ciljeve za svaki odgovor

U cilju boljeg vizuelnog razumevanja ponašanja posmatranog sistema, opšta *Derringer*-ova funkcija se može predstaviti i u formi trodimenzionalnog dijagrama (slika 44), tako da maksimalna vrednost ove funkcije predstavlja najbolju kombinaciju nivoa hromatografskih faktora po svim postavljenim kriterijumima.



Slika 44. 3D dijagram zavisnosti ukupne funkcije poželjnih odgovora (D) od udela metanola i pH vrednosti vodene faze

Maksimalne vrednosti pojedinačnih, kao i ukupne funkcije poželjnih odgovora postignute su pri sledećim vrednostima ispitivanih faktora: udeo metanola 0,90 %, pH vrednost vodene faze 3,43 i temperatura kolone 50,13 °C. Kako su navedeni hromatografski uslovi nakon optimizacije i primene metodologije multikriterijumskog odlučivanja definisani kao najpogodniji za hromatografsku analizu moksonidina i njegovih nečistoća, validacija predložene *stability-indicating* UHPLC metode je izvršena u skladu sa dobijenim vrednostima.

4.5 VALIDACIJA STABILITY-INDICATING RP-UHPLC METODE

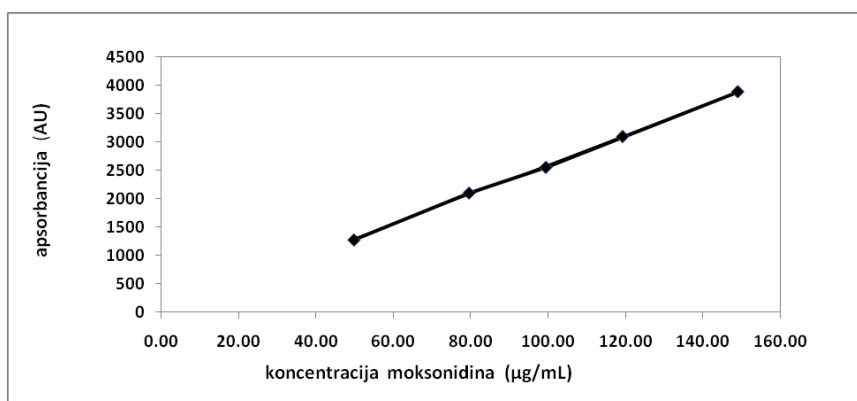
Validacija predložene *stability-indicating* metode za određivanje moksonidina i nečistoća A, B, C i D izvršena je u skladu sa zahtevima relevantnih smernica [45,99,100]. Validacijom je obuhvaćeno ispitivanje, linearnosti i opsega, selektivnosti, preciznosti, tačnosti, limita detekcije i kvantifikacije i robusnosti.

4.5.1 Ispitivanje robusnosti metode

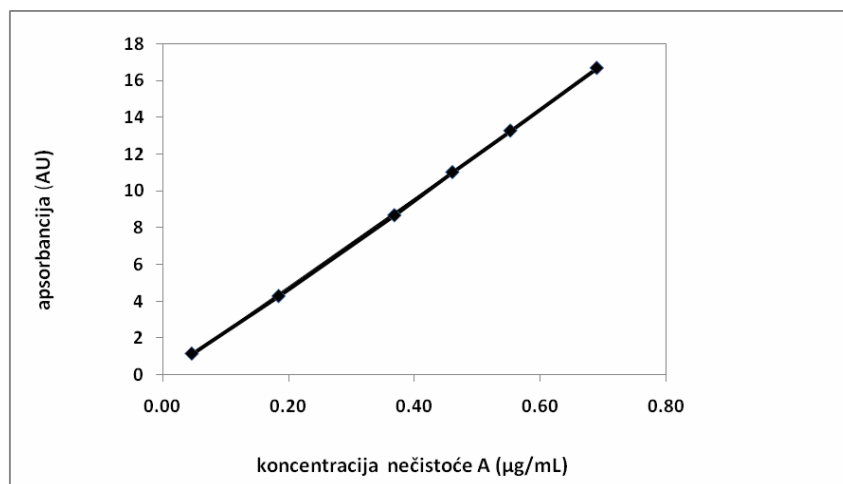
Za predloženu metodu su u toku *screening* faze definisani faktori koji bi mogli uticati na ishod merenja, a njihov uticaj procenjen je primenom *Box-Behnken* dizajna (videti poglavlje 4.4.3), čime je utvrđena i robusnost predložene metode. Dodatno, u cilju postizanja što kraćeg trajanja hromatografske analize, ispitan je uticaj promene protoka mobilne faze na održavanje zadovoljavajuće vrednosti rezolucije između ispitivanih komponenti. Imajući u vidu da porast protoka mobilne faze nema negativan uticaj na efikasnost UHPLC kolone kao i na vrednost rezolucije, za razliku od kolona sa veličinom čestica od 10 μm ili 5 μm [57], opseg pri kome je menjan protok kretao se od 450 $\mu\text{g mL}^{-1}$ - 870 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Zabeležen je ujednačen i neznatni pad vrednosti rezolucije pri promeni protoka u relativno širokom opsegu, koji se u slučaju svih ispitivanih komponenti kretao u zadovoljavajućim okvirima. Takođe, poznato je da promena protoka uslovljava i porast pritiska u hromatografskoj koloni, te pojavu izraženijeg otpora koji može biti ograničavajući faktor u ispitivanju uticaja ovog parametra na hromatografsko ponašanje. Budući da pojava otpora nije zabeležena pri postepenom porastu protoka mobilne faze, a da se rezolucija u svim slučajevima kretala u odgovarajućem opsegu, izabrana je vrednost protoka od 870 $\mu\text{L min}^{-1}$, jer je pri istom postignuto zadovoljavajuće skraćenje hromatografske analize (oko 5,3 minuta).

4.5.2 Ispitivanje linearnosti i opsega metode

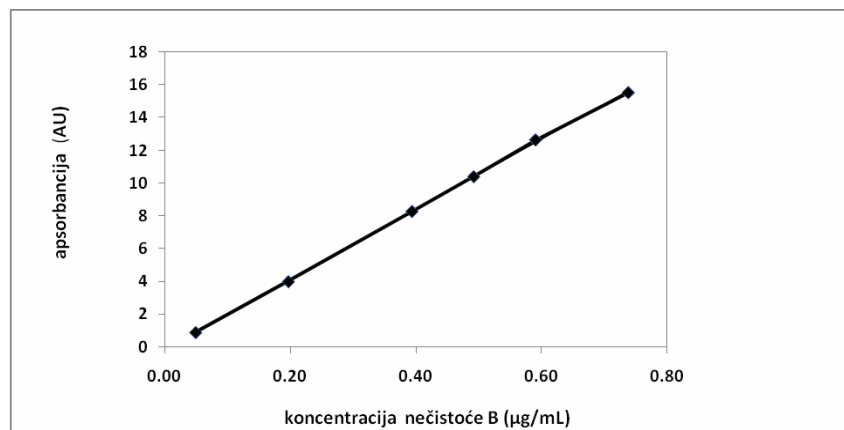
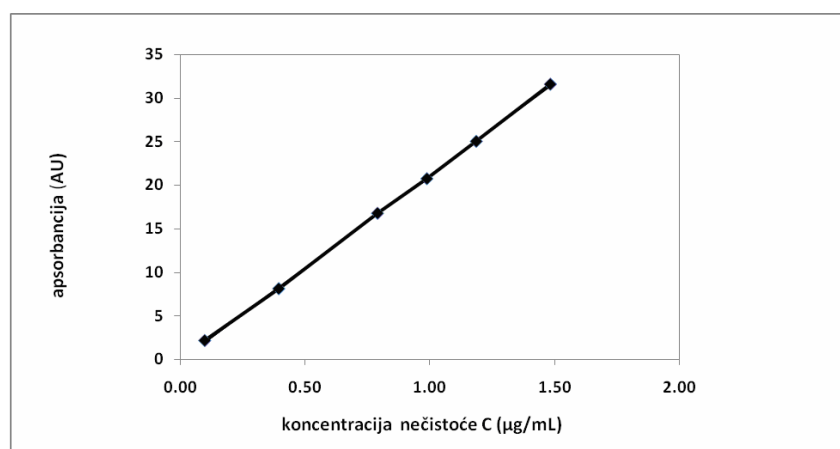
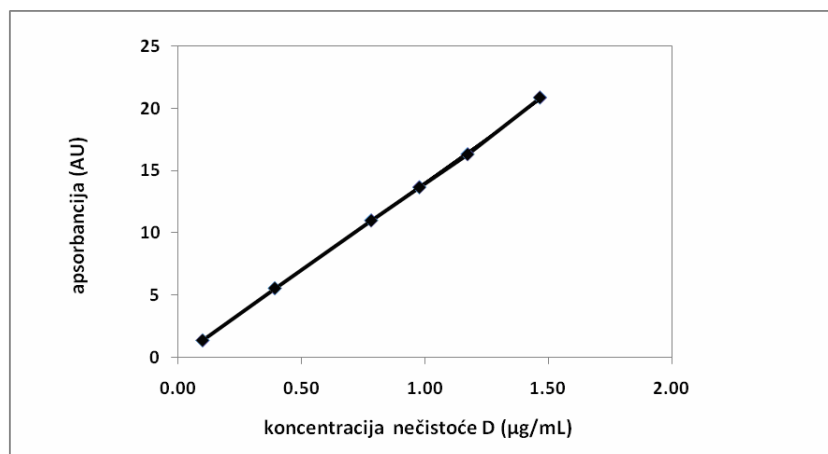
Ispitivanje linearnosti metode izvršeno je u pet tačaka za moksonidin, što je obuhvatilo opseg koncentracija od $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ do $150 \mu\text{g mL}^{-1}$, i u šest tačaka za nečistoće, što je obuhvatilo opseg koncentracija od $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ do $0,75 \mu\text{g mL}^{-1}$ za nečistoće A, B, odnosno opseg od $0,10 \mu\text{g mL}^{-1}$ do $1,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ za nečistoće C i D. Za svaki koncentracioni nivo analizirana je zavisnost površine hromatografskog pika (apsorbancije) u funkciji koncentracije ispitivane supstance. Primenom metode najmanjih kvadrata izračunate su linearne jednačine i konstruisane kalibracione krive, koje su predstavljene na slikama 45-49.



Slika 45. Kalibraciona kriva moksonidina



Slika 46. Kalibraciona kriva nečistoće A

**Slika 47.** Kalibraciona kriva nečistoće B**Slika 48.** Kalibraciona kriva nečistoće C**Slika 49.** Kalibraciona kriva nečistoće D

Regresiona analiza je pokazala da je predložena metoda linearna u ispitivanom opsegu koncentracija, jer je koeficijent korelacije (r) koji pokazuje stepen linearne zavisnosti ispitivanih parametara imao zadovoljavajuću vrednost za sve supstance ($r \geq 0,999$ za aktivnu farmaceutsku supstancu i za sve nečistoće). Izračunavanjem

standardne greške odsečka (S_b) ispitana je značajnost odsečka (b), i dalje ocenjena pomoću *Studentovog t-testa*. Kako su izračunate vrednosti za svaku ispitivanu supstancu imale nižu vrednost od tabelarne ($t_{tabelarno} = 3,182$; $p = 0,05$ za moksonidin; $t_{tabelarno} = 2,776$; $p = 0,05$ za nečistoće), zaključeno je da odsečak nije statistički značajno različit od nule. Rezultati regresione analize ispitivanih supstanci prikazani su u tabeli 23.

Linearnost metode dodatno je potvrđena izvođenjem *F-testa* (*Fisher-ov* odnos varijanse), koji se preporučuje kao veoma pouzdano sredstvo u proceni linearnosti za bilo koju kalibracionu funkciju [98]. Kako dobijena vrednost koeficijenta korelacije $r \geq 0,999$ ne mora nužno da znači i postojanje linearne zavisnosti između površine hromatografskog pika i koncentracije supstance za ispitivani koncentracioni opseg, izračunavanjem *F* vrednosti dobija se podatak koliko je značajna varijansa neslaganja primenjenog matematičkog modela i eksperimentalno dobijenih podataka s_{lof}^2 , u odnosu na varijansu čiste eksperimentalne neizvesnosti s_{pe}^2 . Upoređivanjem dobijenih *F*-vrednosti za svaku ispitivanu komponentu ($F = 3,29$ za moksonidin; $F = 3,00$ za nečistoće), sa tabelarnom vrednošću za odgovarajući broj stepeni slobode, i nivo pouzdanosti 95 % ($F_{tabelarno} = 3,71$ za moksonidin; $F_{tabelarno} = 3,26$ za nečistoće), može se zaključiti da je ova vrednost u slučaju svakog ispitivanog odgovora manja od tabelarne, te da je prethodno utvrđena linearnost svih ispitivanih supstanci dodatno i potvrđena izvođenjem *F-testa*.

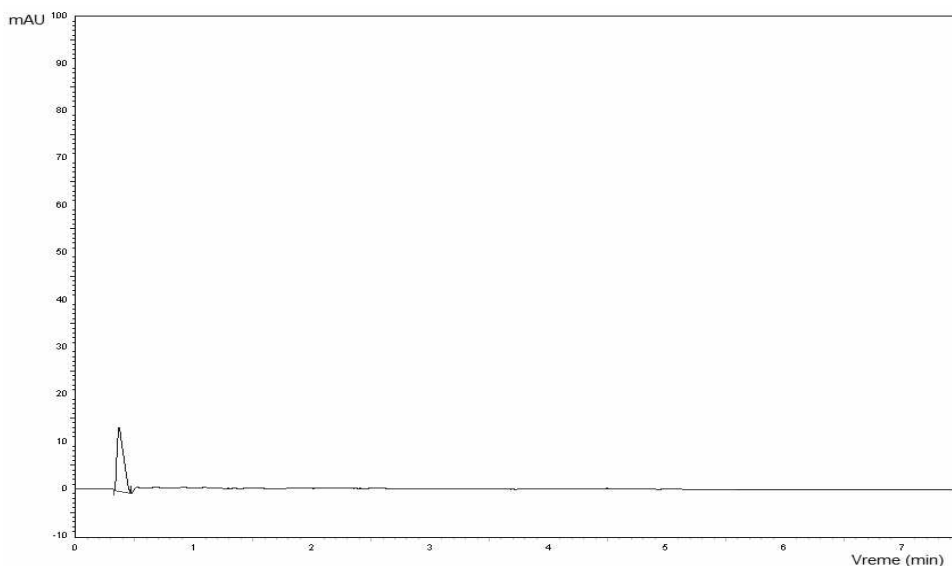
Tabela 23. Rezultati regresione analize

Ispitivana supstanca	Kalibraciona kriva, $y = ax + b$	Koeficijent korelacije, r	Standardna devijacija nagiba, S_a	Standardna devijacija odsečka, S_b	Izračunata vrednost devijacije za odsečak
Moksonidin	26,1253x-9,5955	0,9997	0,3670	38,5398	0,2490
Nečistoća A	24,1999x-0,0952	0,9998	0,2166	0,0955	0,9971
Nečistoća B	21,4714x-0,1937	0,9999	0,1816	0,0856	2,2617
Nečistoća C	21,2494x-0,1345	0,9999	0,1579	0,1495	0,8994
Nečistoća D	14,1067x-0,0253	0,9998	0,1422	0,1332	0,1899

4.5.3 Ispitivanje selektivnosti metode

Selektivnost metode ispitana je upoređivanjem retencionih vremena hromatografskih pikova sa hromatograma dobijenih injektovanjem radnog rastvora

standardnih supstanci (moksonidina i nečistoća A, B, C i D), rastvora placeba i rastvora uzorka, pod utvrđenim hromatografskim uslovima. Na slici 50 je predstavljen hromatogram rastvora placeba za ispitivanje selektivnosti metode.



Slika 50. Hromatogram rastvora placeba

Kako na dobijenom hromatogramu rastvora placeba nije uočeno postojanje hromatografskih pikova čije bi retenciono vreme odgovaralo hromatografskim pikovima moksonidina i nečistoća A, B, C i D prisutnih u radnom rastvoru standardnih supstanci ili uzorku, potvrđeno je odsustvo interferencije i zaključeno da je predložena analitička metoda selektivna.

4.5.4 Ispitivanje preciznosti metode

Preciznost metode procenjena je kroz ispitivanje ponovljivosti (eng. *repeatability* ili *intra-assay precision*) i srednje preciznosti (eng. *intermediate precision*). Ispitivanje je vršeno u jednoj tački kalibracione krive u kojoj koncentracija ispitivanih supstanci korespondira koncentracionom nivou od 100 % radnog rastvora standardnih supstanci (moksonidina i nečistoća A, B, C i D), a pripremljeno je šest takvih rastvora. Srednja preciznost je analizirana tokom tri uzastopna dana. Obradom eksperimentalnih podataka, izračunate su vrednosti standardne devijacije (*SD*) i relativne standardne devijacije (*RSD*). Rezultati ispitivanja preciznosti metode predstavljeni su u tabeli 24.

Tabela 24. Rezultati ispitivanja preciznosti metode

	Ispitivana supstanca	Koncentracija pripremljenog rastvora ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Nađena koncentracija $\pm SD$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recovery (%)	RSD (%)
Ponovljivost metode	Moksonidin	100	100,752 \pm 0,033	100,75	0,03
	Nečistoća A	0,5	0,456 \pm 0,004	99,05	0,90
	Nečistoća B	0,5	0,488 \pm 0,002	99,12	0,49
	Nečistoća C	1,0	1,004 \pm 0,003	101,56	0,28
	Nečistoća D	1,0	0,981 \pm 0,009	100,36	0,90
Srednja preciznost metode	Moksonidin	100	100,830 \pm 0,913	101,44	0,91
	Nečistoća A	0,5	0,454 \pm 0,004	98,70	0,88
	Nečistoća B	0,5	0,484 \pm 0,005	98,19	1,04
	Nečistoća C	1,0	1,012 \pm 0,015	102,34	1,49
	Nečistoća D	1,0	0,995 \pm 0,012	101,74	1,24

Kako su dobijene vrednosti *RSD* za moksonidin i nečistoće A, B, C i D bile manje od 2 %, zaključeno je da predložena analitička metoda ima zadovoljavajuću preciznost.

4.5.5 Ispitivanje tačnosti metode

Tačnost predložene analitičke metode ispitivana je u tri tačke koje korespondiraju koncentracijom nivou od 80 %, 100 % i 120 % radnog standardnog rastvora moksonidina i radnog standardnog rastvora nečistoća A, B, C i D. Za svaku koncentraciju je urađeno po tri određivanja. Kako se tačnost metode izražava kroz *recovery* vrednost, koja predstavlja procenat prinosa određivanja za poznatu, dodatnu količinu analita placebo smeši, dobijeni rezultati nakon statističke obrade eksperimentalnih podataka (tabela 25) ukazuju da je predložena *stability-indicating* metoda pokazala zadovoljavajuću tačnost u određivanju sadržaja moksonidina i nečistoća A, B, C i D.

Tabela 25. Rezultati ispitivanja tačnosti metode

Ispitivana supstanca	Koncentracija pripremljenog rastvora ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Nađena koncentracija $\pm SD$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recovery (%)	RSD (%)
Moksonidin	80,000	80,914 \pm 0,039	101,14	0,05
	100,000	99,095 \pm 0,030	99,09	0,03
	120,000	118,930 \pm 0,073	99,11	0,06
Nečistoća A	0,400	0,373 \pm 0,004	93,31	1,00
	0,500	0,471 \pm 0,003	94,21	0,60
	0,600	0,558 \pm 0,009	92,98	1,58
Nečistoća B	0,400	0,364 \pm 0,002	91,05	0,67
	0,500	0,492 \pm 0,005	98,40	1,12
	0,600	0,565 \pm 0,011	94,15	1,92
Nečistoća C	0,800	0,778 \pm 0,014	97,30	1,83
	1,000	1,012 \pm 0,017	101,24	1,65
	1,200	1,131 \pm 0,015	94,22	1,34
Nečistoća D	0,800	0,781 \pm 0,009	97,63	1,16
	1,000	0,962 \pm 0,015	96,17	1,60
	1,200	1,124 \pm 0,017	93,69	1,51

4.5.6 Ispitivanje limita detekcije i limita kvantifikacije

Limiti detekcije (*LOD*) za predloženu analitičku metodu određeni su izračunavanjem odnosa standardne devijacije odgovora (σ) i nagiba kalibracione krive (*S*), prema izrazu $LOD=3,3 \sigma/S$, dok su limiti kvantifikacije (*LOQ*) za ispitivane komponente određeni prema izrazu $LOQ=10 \sigma/S$ [45]. Dobijene su sledeće vrednosti za limite detekcije: 0,04 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za moksonidin; 0,02 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za nečistoće A i B; 0,03 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za nečistoću C i 0,04 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za nečistoću D. Limiti kvantifikacije su imali sledeće vrednosti 0,14 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za moksonidin; 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za nečistoće A i B; 0,08 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za nečistoću C i 0,10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za nečistoću D.

Dobijene vrednosti ukazuju da predložena *stability-indicating* metoda poseduje zadovoljavajuću osetljivost.

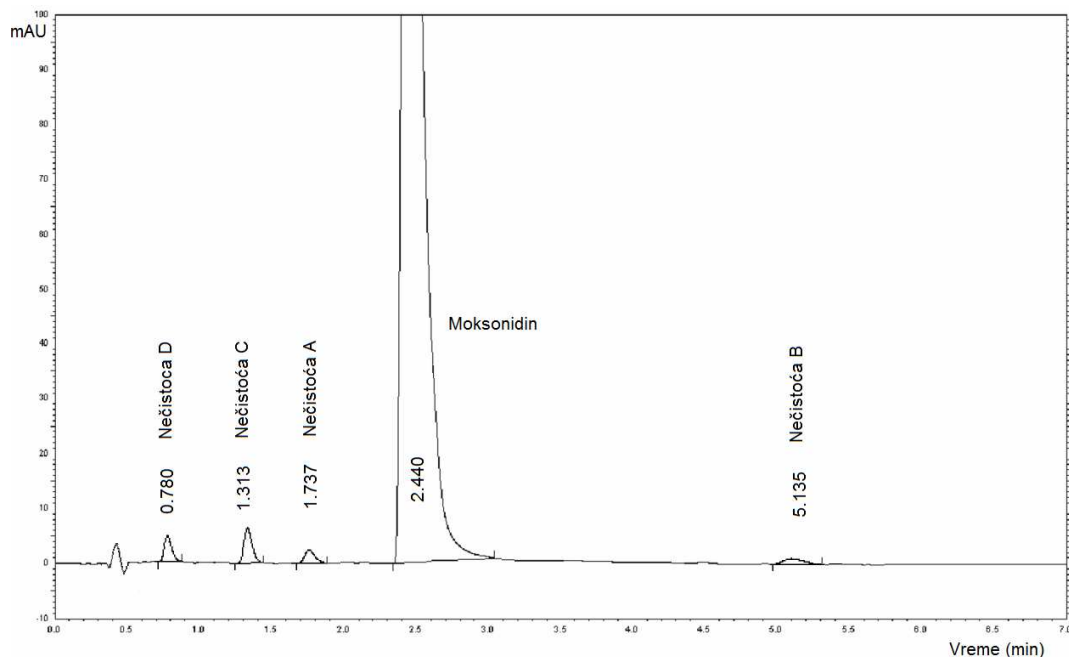
4.5.7 Ispitivanje pogodnosti sistema za kvalitativnu i kvantitativnu analizu moksonidina i njegovih nečistoća predloženom UHPLC metodom

Rezultati određivanja hromatografskih parametara za procenu pogodnosti sistema su prikazani u tabeli 26, dok je reprezentativni hromatogram predstavljen na slici 51.

Tabela 26. Hromatografski parametri procene pogodnosti sistema za UHPLC analizu moksonidina i njegovih nečistoća

Ispitivana supstanca	Preciznost injektovanja	Faktor kapaciteta, k'	Rezolucija, R	Simetrija pika
Moksonidin	0,11 %	4,95	$R_{A/moksonidin}$ 3,61	1,94
Nečistoća A	0,83 %	3,24	$R_{C/A}$ 3,13	1,50
Nečistoća B	0,67 %	11,52	$R_{moksonidin/B}$ 12,72	1,35
Nečistoća C	0,48 %	2,20	$R_{D/C}$ 4,49	1,28
Nečistoća D	0,85 %	0,90	/	1,37

Dobijene vrednosti rezolucije (računate na $W_{1/2}$ hromatografskog pika) ukazuju na dobru separaciju svih ispitivanih komponenti, dok vrednosti faktora kapaciteta potvrđuju zadovoljavajuću razdvojenost od pika mobilne faze. Razdvajanje strukturno veoma sličnih komponenti je postignuto pri izokraskim uslovima i u relativno kratkom vremenskom periodu (oko 5,3 minuta). Takođe, očuvana simetrija svih hromatografskih pikova ($< 2\%$) ukazuje na odsustvo *tailing*-a i dobro eluiranje supstanci pri datim hromatografskim uslovima, kao i na mogućnost precizne integracije istih.



Slika 51. Hromatogram radne smeše standarda moksonidina i nečistoća A, B, C i D za ispitivanje pogodnosti sistema

Kako je na osnovu dobijenih vrednosti potvrđena i preciznost ponovljenih injektovanja ($RSD < 1\%$), može se zaključiti da je predloženo *stability-indicating* UHPLC metodom omogućena pouzdana identifikacija i kvantifikacija moksonidina i njegovih nečistoća.

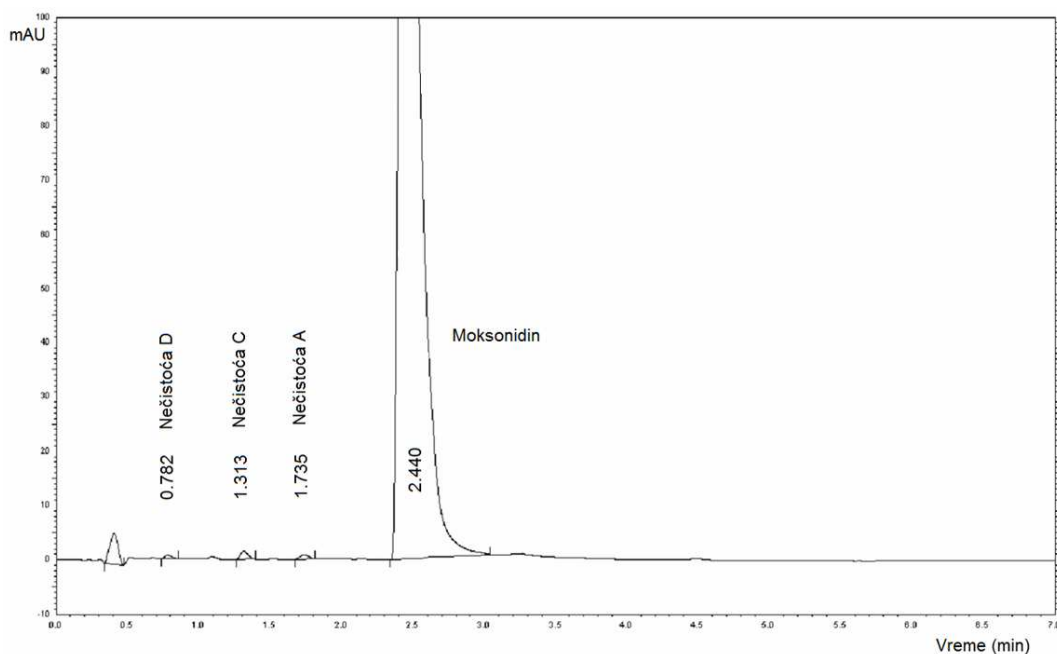
4.5.8 Određivanje sadržaja *Moxogamma 0.4*[®] tableta

Rezultati dobijeni kvantitativnom analizom moksonidina i njegovih nečistoća iz farmaceutskog doziranog oblika *Moxogamma 0.4*[®] tableta, prikazani su u tabeli 27, dok je hromatogram uzorka predstavljen na slici 52.

Tabela 27. Rezultati određivanja sadržaja moksonidina i njegovih nečistoća u farmaceutskom doziranom obliku primenom predložene UHPLC metode

Ispitivana supstanca	Koncentracija pripremljenog rastvora ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Nađena koncentracija $\pm SD$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recovery (%)	RSD (%)
Moksonidin	100	101,617 \pm 0,529	101,62	0,52
Nečistoća A	0,500*	0,181 \pm 0,001		0,61
Nečistoća B	0,500*	< LOD		/
Nečistoća C	1,000*	0,223 \pm 0,002		0,89
Nečistoća D	1,000*	0,207 \pm 0,004		1,75

* maksimalna dozvoljena količina



Slika 52. Hromatogram rastvora uzorka

Na osnovu dobijenih podataka (tabela 27) može se zaključiti da je sadržaj identifikovanih nečistoća kao i aktivne farmaceutske supstance, dobijen predloženom *stability-indicating* metodom u okviru specifikacijskih granica. Time je potvrđena primenljivost navedene metode za određivanje moksonidina i njegovih nečistoća iz farmaceutskog doziranog oblika.

5. ZAKLJUČAK

1. Razvijena je i optimizovana RP-HPLC metoda sa UV detekcijom za određivanje moksonidina i njegovih nečistoća A, B, C i D u farmaceutskom doziranom obliku. Nakon preliminarnih ispitivanja utvrđeno je da na hromatografsko ponašanje ispitivanih supstanci najviše utiče udeo metanola u mobilnoj fazi, temperatura kolone i pH vrednost vodene faze. Izvršena je optimizacija metode primenom centralnog kompozicionog dizajna (*face centered cube* dizajna) u kojoj je uticaj navedenih faktora detaljnije ispitan, a kao odgovori sistema praćeni su faktori kapaciteta svih ispitivanih supstanci, kao i vrednost rezolucije između kritičnih parova ($R_{D/C}$ i $R_{A/moksonidin}$). Na osnovu regresione analize i analize varijanse (ANOVA) izvršena je statistička procena značajnosti uticaja ispitivanih faktora, odnosno adekvatnosti dobijenog matematičkog modela koji opisuje ponašanje posmatranog sistema. Konstruisani su 3D dijagrami posmatranih odgovora sistema u funkciji udela metanola u mobilnoj fazi i pH vrednosti vodene faze. Definisani su optimalni hromatografski uslovi za izokratsko razdvajanje ispitivanih supstanci na koloni *Symmetryshield*, C₁₈, (250 mm×4,6 mm, 5 μm), koji su uključivali mobilnu fazu sastava metanol - rastvor kalijum-dihidrogenfosfata (0,05 mol L⁻¹) pH 3,5 podešen sa *orto*-fosfornom kiselinom (15:85, v/v), temperaturu kolone 25 °C, protok mobilne faze od 1 mL min⁻¹, volumen injiciranja od 20 μL i talasnu dužinu detekcije od 255 nm. Validacijom RP-HPLC metode potvrđena je dobra selektivnost, osetljivost, linearnost, preciznost i robusnost metode. Primenom RP-HPLC metode za određivanje sadržaja moksonidina i njegovih nečistoća u farmaceutskom doziranom obliku (tablete), dobijeni su reproduktivni rezultati, uz kvantifikaciju jedne nepoznate nečistoće, čiji je sadržaj bio u dozvoljenim granicama.
2. Razvijeni su i postavljeni izokratski hromatografski uslovi za ispitivanje uzoraka dobijenih u studiji forsirane degradacije moksonidina, primenom UHPLC-PDA tehnike. Navedeni uslovi su uključili kolonu *Hypersil Gold aq*, C₁₈ (100 mm x 2,1 mm, 1,9 μm), mobilnu fazu sastava rastvor amonijum-acetata (10 mmol L⁻¹) pH 3,5, temperaturu kolone od 55 °C, protok mobilne faze od 450 μL min⁻¹, volumen injiciranja od 3 μL i talasnu dužinu detekcije od 255 nm.

3. Sprovedena je studija forsirane degradacije aktivne farmaceutske supstance moksonidin i farmaceutskog doziranog oblika (tablete). Ispitivanje stabilnosti izvršeno je u uslovima hidrolize u kiseljoj, neutralnoj i baznoj sredini, termalne degradacije, oksidacije i fotolize. Farmaceutski dozirani oblik je u ispitivanim uslovima pokazao apsolutnu stabilnost, dok je aktivna farmaceutska supstanca pokazala degradaciju u uslovima hidrolize u kiseljoj sredini ($0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$) i baznoj sredini ($2 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$, $70 \text{ }^\circ\text{C}$). U uslovima hidrolize u kiseljoj sredini zabeležena je pojava nepoznatog degradacionog proizvoda ispod propisanog limita za studije forsirane degradacije.
4. Identifikacija nastalih degradacionih proizvoda je izvršena UHPLC-PDA, UHPLC-MS i MS/MS metodama, na osnovu njihovih retencionih vremena i odgovarajućih spektara na oba detektora. Kao dominantni proizvod hidrolitičke degradacije moksonidina u kiseljoj sredini identifikovana je nečistoća A, dok je dominantni proizvod hidrolitičke degradacije moksonidina u baznoj sredini bila nečistoća D. Na osnovu dobijenih rezultata studije forsirane degradacije definisani su putevi degradacije moksonidina.
5. Razvijena je i optimizovana nova izokraska metoda za praćenje stabilnosti aktivne farmaceutske supstance moksonidin i odgovarajućeg farmaceutskog doziranog oblika (tablete). Metoda je razvijena primenom eksperimentalnog dizajna i metodologije multikriterijumskog odlučivanja. U *screening* fazi, za identifikaciju faktora koji imaju statistički značajan uticaj na hromatografsko ponašanje ispitivanih supstanci korišćen je 2^{4-1} frakcioni faktorski dizajn. Ispitivan je uticaj koncentracije pufera, udela metanola u mobilnoj fazi, temperature kolone i pH vrednosti vodene faze, a kao posmatrani odgovori sistema praćeni su faktori kapaciteta svih ispitivanih supstanci. Prikaz rezultata putem Pareto dijagrama ukazao je da sva četiri ispitivana faktora imaju značajan uticaj na hromatografsko ponašanje ispitivanih supstanci, ali je u cilju postizanja odgovarajuće simetrije hromatografskog pika moksonidina i sprečavanja dugotrajnosti analize, za optimizaciju metode selektovana koncentracija pufera od 10 mmol L^{-1} . Optimizacija metode izvršena je primenom 3^3 Box-Behnken dizajna kojim je

detaljnije ispitan uticaj preostala tri faktora na vrednost rezolucije između svih ispitivanih supstanci. Na osnovu regresione analize i analize varijanse (ANOVA) izvršena je statistička procena značajnosti uticaja ispitivanih faktora, odnosno adekvatnosti dobijenog matematičkog modela koji opisuje ponašanje posmatranog sistema. Konstruisani su 3D dijagrami posmatranih odgovora sistema. Krajnji optimalni uslovi su definisani primenom multikriterijumskog odlučivanja, izračunavanjem opšte *Derringer*-ove funkcije poželjnih odgovora. Kako je dobijena vrednost opšte *Derringer*-ove funkcije iznosila 1, svi postavljeni ciljevi su bili maksimalno zadovoljeni. Konstruisan je 3D dijagram *Derringer*-ove funkcije u odnosu na pH vrednost vodene faze i udeo metanola u mobilnoj fazi. Definisani optimalni uslovi *stability-indicating* metode su uključili kolonu *Hypersil Gold aq*, C₁₈ (100 mm x 2,1 mm, 1,9 μm), mobilnu fazu sastava metanol - rastvor amonijum-acetata (10 mmol L⁻¹) pH 3,43, podešen dodatkom glacijalne sirćetne kiseline (0,90:99,1, v/v), temperaturu kolone od 50,13 °C, protok mobilne faze od 870 μL min⁻¹, volumen injiciranja od 3 μL i talasnu dužinu detekcije od 255 nm. Validacijom UHPLC-PDA metode potvrđena je odgovarajuća selektivnost, osetljivost, linearnost, preciznost i robusnost metode. Primenom UHPLC-PDA metode za određivanje sadržaja moksonidina i njegovih nečistoća u farmaceutskom doziranom obliku (tablete), dobijeni su reproduktivni rezultati, čime je potvrđena primenljivost metode za ispitivanje stabilnosti aktivne farmaceutske supstance i farmaceutskog doziranog oblika.

LITERATURA

- [1] Remko M, Swart M, Bickelhaupt FM. Theoretical study of structure, pKa, lipophilicity, solubility, absorption, and polar surface area of some centrally acting antihypertensives. *Bioorg Med Chem.* 2006; 14: 1715-1728.
- [2] Remko M, Walsh OA, Richards WG. Theoretical Study of Molecular Structure, Tautomerism, and Geometrical Isomerism of Moxonidine: Two-Layered ONIOM Calculations. *J. Phys. Chem. A.* 2001; 105: 6926-6931.
- [3] Moreira TS, Takakura AC, Menani JV, Colombari E. Involvement of central alpha1- and alpha2-adrenoceptors on cardiovascular responses to moxonidine. *Eur J Pharmacol.* 2007; 563: 164-171.
- [4] Ernsberger P, Haxhiu MA, Graff LM, Collins LA, Dreshaj I, Grove DL, Graves ME, Schäfer SG, Christen MO. A novel mechanism of action for hypertension control: moxonidine as a selective I1-imidazoline agonist. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1994; 8: 27-41.
- [5] Ziegler D, Haxhiu MA, Kaan EC, Papp JG, Ernsberger P. Pharmacology of moxonidine, an I1-imidazoline receptor agonist. *J. Cardiovasc. Pharm.* 1996; 27: S26-S37.
- [6] Szabo B. Imidazoline antihypertensive drugs: a critical review on their mechanism of action. *Pharmacol Ther.* 2002; 93: 1-35.
- [7] Edwards LP, Brown-Bryan TA, McLean L, Ernsberger P. Pharmacological properties of the central antihypertensive agent, moxonidine. *Cardiovasc Ther.* 2012; 30: 199-208.
- [8] Chan CK, Burke SL, Zhu H, Piletz JE, Head GA. Imidazoline receptors associated with noradrenergic terminals in the rostral ventrolateral medulla mediate the hypotensive responses of moxonidine but not clonidine. *Neuroscience.* 2005; 132: 991-1007.
- [9] Prichard BN, Graham BR, Owens CW. Moxonidine: a new antiadrenergic antihypertensive agent. *J Hypertens Suppl.* 1999; 17: S41-54.
- [10] Sweetman SC (ed), Martindale: The Complete Drug Reference 36, Pharmaceutical Press, London, UK, 2009.
- [11] He MM, Abraham TL, Lindsay TJ, Schaefer HC, Pouliquen IJ, Payne C, Czeskis B, Shipley LA, Oliver SD, Mitchell MI. Metabolism and disposition of

- the antihypertensive agent moxonidine in humans. *Drug Metab Dispos.* 2003; 31: 334-342.
- [12] Wirth DD, He MM, Czeskis BA, Zimmerman KM, Roettig U, Stenzel W, Steinberg MI. Identification, synthesis and pharmacological activity of moxonidine metabolites. *Eur J Med Chem.* 2002; 37: 23-34.
- [13] European Pharmacopoeia, 7th Ed., Council of Europe, Strasbourg Cedex, 2011.
- [14] British Pharmacopoeia, British Pharmacopoeia Commission, The Stationery Office (TSO), London, United Kingdom, 2011.
- [15] Wiczling P, Nasal A, Kubik Ł, Kaliszczak R. A new pH/organic modifier gradient RP HPLC method for convenient determination of lipophilicity and acidity of drugs as applied to established imidazoline agents. *Eur J Pharm Sci.* 2012; 47: 1-5.
- [16] Mělnický R, Kvapil L, Grepl M, Hradil P. Formation and various mutual transformations of moxonidine. *Acta Universitatis Palackianae Olomucensis, Facultas Rerum Naturalium Chemica.* 2007; 46: 45-50.
- [17] Czeskis, B.A. Synthesis of triple [¹⁴C]-labeled moxonidine. *J Labelled Comp Radiopharm.* 2004; 47: 699-704.
- [18] Rudolph M, Janssen W, Strassner M. Determination of moxonidine (BDF 5895) in plasma by gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 1992; 10: 323-328.
- [19] Zhao L, Ding L, Wei X. Determination of moxonidine in human plasma by liquid chromatography–electrospray ionisation-mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2006; 40: 95–99.
- [20] He MM, Abraham TL, Lindsay TJ, Chay SH, Czeskis BA, Shipley LA. Metabolism and disposition of moxonidine in Fischer 344 rats. *Drug Metab Dispos.* 2000; 28: 446-459.
- [21] Kakde R, Gadpayale K, Qureshi MO. Stability indicating HPTLC method for determination of Moxonidine in pharmaceutical preparations. *Int.J.PharmTech Res.* 2012; 4: 358-363.
- [22] Filipic S, Nikolic K, Krizman M, Agbaba D. The Quantitative Structure - Retention Relationship (QSRR) analysis of some centrally acting antihypertensives and diuretics. *QSAR Comb Sci.* 2008; 27: 1036-1044.

- [23] Put R, Perrin C, Questier F, Coomans D, Massart DL, Vander Heyden Y. Classification and regression tree analysis for molecular descriptor selection and retention prediction in chromatographic quantitative structure-retention relationship studies. *J Chromatogr A*. 2003; 988: 261-276.
- [24] Ghasemi J, Saaidpour S. Quantitative structure-property relationship study of n-octanol-water partition coefficients of some of diverse drugs using multiple linear regression. *Anal Chim Acta*. 2007; 604: 99-106.
- [25] ICH Q3A(R2), Impurities In New Drug Substances, International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, 2006.
- [26] ICH Q3B(R2), Impurities In New Drug Products, International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, 2006.
- [27] Ahuja S, Impurities evaluation of pharmaceuticals, Marcel Dekker Inc., New York, USA, 1998.
- [28] ICH Q6A, Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances, International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use 1999.
- [29] Roy J, Mahmud M, Sobhan A, Aktheruzzaman M, Al-Faoouque M and Ali E. Marketed vitamin B-complex injectables: stability and mutual interaction. *Drug Dev Ind Pharm*. 1994; 20: 2157-2163.
- [30] Smith RJ, Webb ML. *Analysis of Drug Impurities*, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, 2007.
- [31] Görög S, Babják M, Balogh G, Brlik J, Csehi A, Dravec F, Gasdag M, Horváth P, Laukó A, Varga K. Drug impurity profiling strategies. *Talanta*. 1997; 44: 1517-1526.
- [32] Görög S, *Identification and Determination of Impurities in Drugs*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands, 2000.
- [33] Baertschi SW (ed), *Pharmaceutical Stress Testing, Predicting Drug Degradation*, Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA, 2005.

- [34] Hartauer KJ, Arbuthnot GN, Baertschi SW, Johnson RA, Luke WD, Pearson NG, Rickard EC, Tingle CA, Tsang PK, Wiens RE. Influence of peroxide impurities in povidone and crospovidone on the stability of raloxifene hydrochloride in tablets: identification and control of an oxidative degradation product. *Pharm Dev Technol.* 2000; 5: 303-310.
- [35] Ahuja S, Scypinski S, *Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis, Volume 3*, Academic Press, San Diego, USA, 2001.
- [36] ICH Q1A (R2), *Stability testing of new drug substances and products, International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use*, 2003.
- [37] Singh S, Junwal M, Modhe G, Tiwari H, Kurmi M, Parashar N, Sidduri P. Forced degradation studies to assess the stability of drugs and products. *Trends Anal. Chem.* 2013; 49: 71-88.
- [38] Ahuja S, Scypinski S, *Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis (Separation Science and Technology)*, Volume 10, Elsevier Inc, USA, 2011.
- [39] Huynh-Ba K. *Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development: Regulations, Methodologies, and Best Practices*, Springer Science+Business Media, New York, USA, 2009.
- [40] Jocić B, Zecević M, Zivanović L, Protić A, Jadranin M, Vajs V. Study of forced degradation behavior of eletriptan hydrobromide by LC and LC-MS and development of stability-indicating method. *J Pharm Biomed Anal.* 2009; 50: 622-629.
- [41] Alsante KM, Ando A, Brown R, Ensing J, Hatajik TD, Kong W, Tsuda Y. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007; 59: 29-37.
- [42] Ahuja S, Alsante KM. *Handbook of Isolation and Characterization of Impurities in Pharmaceutical (Separation Science and Technology)*, Volume 5, Elsevier Science, USA, 2003.
- [43] ICH Q1B (1997), *Stability testing: Photostability testing of new drug substances and products, International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use*, 1996.

- [44] Bakshi M, Singh S. Development of validated stability-indicating assay methods-critical review. *J Pharm Biomed Anal.* 2002; 28: 1011-1040.
- [45] ICH Q2 (R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, 2005.
- [46] Meyer VR, Practical high-performance liquid chromatography, 4th Edition, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK, 2004.
- [47] Živanović Lj, Odabrane metode za farmaceutsku analizu, Nijansa, Zemun, 1995.
- [48] Snyder LR, Kirkland JJ, Introduction to modern liquid chromatography, 2nd Edition, Wiley-Interscience, New York, USA, 1979.
- [49] Ahuja S, Dong MW, Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC (Separation Science and Technology), Volume 6, Elsevier Inc, USA, 2005.
- [50] Alan Xu Q. Ultra-High Performance Liquid Chromatography and Its Applications, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, USA, 2013.
- [51] Knox JH, Parcher JF. Effect of column to particle diameter ratio on the dispersion of unadsorbed solutes in chromatography. *Anal Chem.* 1969; 41: 1599-1606.
- [52] Wirth MJ. Mass transport in sub-2-microm high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2007; 1148: 128-130.
- [53] de Villiers A, Lestremau F, Szucs R, Gélébart S, David F, Sandra P. Evaluation of ultra performance liquid chromatography. Part I. Possibilities and limitations. *J Chromatogr A.* 2006; 1127: 60-69.
- [54] Gritti F, Guiochon G. Perspectives on the evolution of the column efficiency in liquid chromatography. *Anal Chem.* 2013; 85: 3017-3035.
- [55] Cazes J, Scott R. Chromatography Theory. Marcel Dekker Inc, New York, USA, 2002.
- [56] Roge AB, Firke SN, Dhane RM, Gunjkar VJ, Vadvalkar SM. Novel achievement of HPLC: UPLC. *Int.J.PharmTech Res.* 2011; 3: 1423-1429.
- [57] Nováková L, Matysová L, Solich P. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta.* 2006; 68: 908-918.
- [58] Swartz, M.E. UPLC™: An introduction and review. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2005; 28: 1253-1263.

- [59] Gritti F, Guiochon G. The van Deemter equation: assumptions, limits, and adjustment to modern high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2013; 1302: 1-13.
- [60] Fekete S, Oláh E, Fekete J. Fast liquid chromatography: the domination of core-shell and very fine particles. *J Chromatogr A*. 2012; 1228: 57-71.
- [61] Oláh E, Fekete S, Fekete J, Ganzler K. Comparative study of new shell-type, sub-2 micron fully porous and monolith stationary phases, focusing on mass-transfer resistance. *J Chromatogr A*. 2010; 1217: 3642-3653.
- [62] Guillarme D, Grata E, Glauser G, Wolfender JL, Veuthey JL, Rudaz S. Some solutions to obtain very efficient separations in isocratic and gradient modes using small particles size and ultra-high pressure. *J Chromatogr A*. 2009; 1216: 3232-3243.
- [63] Guillarme D, Veuthey JL. *UHPLC in Life Sciences*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2012.
- [64] Carr PW, Stoll DR, Wang X. Perspectives on recent advances in the speed of high-performance liquid chromatography. *Anal Chem*. 2011; 83: 1890-1900.
- [65] Rodriguez-Aller M, Gurny R, Veuthey JL, Guillarme D. Coupling ultra high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry: constraints and possible applications. *J Chromatogr A*. 2013; 1292: 2-18.
- [66] Wren SA, Tchelitcheff P. Use of ultra-performance liquid chromatography in pharmaceutical development. *J Chromatogr A*. 2006; 1119: 140-146.
- [67] Guillarme D, Nguyen DT, Rudaz S, Veuthey JL. Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis: application to short columns packed with small particle. Part I: isocratic separation. *Eur J Pharm Biopharm*. 2007; 66: 475-482.
- [68] Cielecka-Piontek J, Zalewski P, Jelińska A, Garbacki P. UHPLC: The Greening Face of Liquid Chromatography. *Chromatographia*. 2013; 76: 1429-1437.
- [69] Herbert CG, Johnstone RAW, *Mass spectrometry, Basics*, CRC Press LLC, Boca Raton, USA, 2003.
- [70] Hoffmann E, Strooband V, *Mass spectrometry, Principles and applications*, 3rd Edition, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK, 2007.

- [71] Gross J. *Mass Spectrometry: A Textbook*, 2nd Edition, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 2011.
- [72] Barker J. *Mass Spectrometry: Analytical Chemistry by Open Learning*, 2nd Edition, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK, 1999.
- [73] Watson JT, Sparkman OD, *Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation*, 4th Edition, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK, 2007.
- [74] Rossi DT, Sinz MW, *Mass spectrometry in drug discovery*, Marcel Dekker Inc., New York, USA, 2002.
- [75] Rodriguez-Aller M, Gurny R, Veuthey JL, Guillarme D. Coupling ultra high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry: constraints and possible applications. *J Chromatogr A*. 2013; 1292: 2-18.
- [76] Schappler J, Nicoli R, Nguyen D, Rudaz S, Veuthey JL, Guillarme D. Coupling ultra high-pressure liquid chromatography with single quadrupole mass spectrometry for the analysis of a complex drug mixture. *Talanta*. 2009; 78: 377-387.
- [77] Guillarme D, Schappler J, Rudaz S, Veuthey JL. Coupling ultra-high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry. *Trends Anal. Chem*. 2010; 29: 15-27.
- [78] Brereton RG. *Chemometrics - data analysis for the laboratory and chemical plant*. John Wiley & Sons Ltd. Chichester, UK, 2003.
- [79] Jon Gabrielsson J, Lindberg NO, Lundstedt T. Multivariate methods in pharmaceutical applications. *J. Chemometrics*. 2002; 16: 141-160.
- [80] Hibbert DB. Experimental design in chromatography: a tutorial review. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2012; 910: 2-13.
- [81] Dejaegher B, Heyden YV. Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications. *J Pharm Biomed Anal*. 2011; 56: 141-158.
- [82] Mason R, Gunst R, Hess J. *Statistical design and analysis of experiments*. John Wiley & Sons Inc, New Jersey, USA, 2003.
- [83] Ferreira SL, Bruns RE, da Silva EG, Dos Santos WN, Quintella CM, David JM, de Andrade JB, Breitkreitz MC, Jardim IC, Neto BB. Statistical designs and

- response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. *J Chromatogr A*. 2007; 1158: 2-14.
- [84] Khuri AI, Mukhopadhyay S. Response surface methodology. *WIREs Comput Stat*. 2010; 2: 128-149.
- [85] Lundstedt T, Seifert E, Abramo L, Thelin B, Nystrom A, Pettersen J, Bergman R. Experimental design and optimization. *Chemom Intell Lab Syst*. 1998; 42: 3-40.
- [86] Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escalera LA. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*. 2008; 76: 965-977.
- [87] Miller JN, Miller JC. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 6th Edition, Pearson Education Limited 2000, 2010.
- [88] Zivanović L, Protić A, Zecević M, Jocić B, Kostić M. Multicriteria optimization methodology in development of HPLC separation of mycophenolic acid and mycophenolic acid glucuronide in human urine and plasma. *J Pharm Biomed Anal*. 2009; 50: 640-648.
- [89] Brereton RG. *Applied Chemometrics for Scientists*. John Wiley & Sons Ltd. Chichester, UK, 2007.
- [90] Bourguignon B, Massart DL. Simultaneous optimization of several chromatographic performance goals using Derringer's desirability function. *J Chromatogr*. 1991; 586: 11-20.
- [91] Costa NR, Lourenço J, Pereira ZL. Desirability function approach: A review and performance evaluation in adverse conditions. *Chemom Intell Lab Syst*. 2011; 107: 234-244.
- [92] Hendriks MMWB, De Boer JH, Smilde AK, Doornbos DA. Multicriteria decision making. *Chemom Intell Lab Syst*. 1992; 16: 175-191.
- [93] Orlandini S, Giannini I, Pinzauti S, Furlanetto S. Multivariate optimization and validation of a capillary electrophoresis method for the analysis of resveratrol in a nutraceutical. *Talanta*. 2008; 74: 570-577.
- [94] Sivakumar T, Manavalan R, Muralidharan C, Valliappan K. Multi-criteria decision making approach and experimental design as chemometric tools to

- optimize HPLC separation of domperidone and pantoprazole. *J Pharm Biomed Anal.* 2007; 43: 1842-1848.
- [95] Zečević M, Jocić B, Živanović Lj, Protić A. Application of multicriteria methodology in the development of improved RP-LC-DAD method for determination of rizatriptan and its degradation products. *Chromatographia.* 2008; 68: 911-918.
- [96] Sadek PC, *The HPLC solvent guide*, 2nd Edition, Wiley-Interscience, New York, USA, 2002.
- [97] Moffat AC, Osselton MD, Widdop B. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, 3rd Edition, Pharmaceutical Press, London, UK, 2004.
- [98] Araujo P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *J Chromatogr B.* 2009; 877: 2224-2234.
- [99] Reviewer guidance on validation of chromatographic methods. Center for drug evaluation and research, Food and drug administration. Maryland, USA. 1994.
- [100] *United states pharmacopoeia 30 – National Formulary 25.* The United states pharmacopoeial convention. Maryland, USA, 2007.
- [101] Brown DJ. *The Chemistry of Heterocyclic Compounds, The Pyrimidines.* John Wiley & Sons Inc. New York, USA, 1962.

PRILOZI

SPISAK OBJAVLJENIH RADOVA IZ DOKTORSKE DISERTACIJE

Radovi iz doktorske disertacije štampani u međunarodnim časopisima:

Milovanović S, Otašević B, Zečević M, Zivanović L, Protić A. Development and validation of reversed phase high performance liquid chromatographic method for determination of moxonidine in the presence of its impurities. *J Pharm Biomed Anal.* 2012; 59: 151-156.

Otašević B, **Milovanović S**, Zečević M, Golubović J, Protić A. UPLC Method for Determination of Moxonidine and Its Degradation Products in Active Pharmaceutical Ingredient and Pharmaceutical Dosage Form. *Chromatographia.* 2014; 77: 109-118.

Rad iz doktorske disertacije saopšten na međunarodnom skupu štampan u proširenom obliku:

Svetlana Milovanović, Mira Zečević, Biljana Otašević, Ljiljana Živanović, Ana Protić. Razvoj RP-HPLC metode za određivanje moksonidina u prisustvu njegovih nečistoća. *II Kongres farmaceuta Bosne i Hercegovine sa međunarodnim učešćem*, Banja Luka, 17-20. novembra 2011.

Rad iz doktorske disertacije saopšten na domaćem skupu štampan kao kratak izvod:

Svetlana Milovanović, Mira Zečević, Biljana Otašević. Ispitivanje uslova za RP-HPLC analizu moksonidina u prisustvu njegovih nečistoća. *5. Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem*, Beograd, 13-17. oktobar 2010. *Arh. farm.* 2010; 60: 962-963.

Rad iz doktorske disertacije saopšten na međunarodnom skupu štampan kao kratak izvod:

Jelena Golubović, **Svetlana Milovanović**, Biljana Otašević, Mira Zečević, Ana Protić.
Stability-indicating UPLC assay method for moxonidine active pharmaceutical ingredient and pharmaceutical dosage form, 39th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, June 16-20, 2013, Amsterdam, The Netherlands.

BIOGRAFIJA AUTORA

Svetlana Milovanović je rođena 26.12.1979. godine u Beogradu gde je završila osnovnu i srednju medicinsku školu, farmaceutskog smera. Školske 1998/99. godine upisala je Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu. Diplomirala je 2005. godine sa prosečnom ocenom 9,26 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Na osnovu visokih akademskih rezultata postignutih tokom studija, 2002. godine je svrstana među najbolje studente Univerziteta u Beogradu i nagrađena jednokratnom stipendijom ambasade Kraljevine Norveške. Od 2005. godine do 2006. godine obavila je pripravnički staž i položila stručni ispit za diplomirane farmaceute. Doktorske akademske studije iz Farmaceutске hemije upisala je školske 2006/07. godine na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Od 2007. godine zaposlena je u Agenciji za lekove i medicinska sredstva Srbije. Najpre je kao stručni saradnik radila na radnom mestu za poslove implementacije zahteva standarda u organizacionoj celini Upravljanje kvalitetom, a od jula 2011. godine obavlja poslove procene i harmonizacije teksta Sažetka karakteristika leka (SPC) i Uputstva za lek (PIL) u Sektoru za stavljanje u promet humanih lekova. Kao zaposlena na navedenim radnim mestima pohađala je brojne seminare i obuke iz datih oblasti. U okviru naučno-istraživačkog rada objavila je kao autor i koautor dva naučna rada publikovana u međunarodnim časopisima, kao i tri saopštenja sa međunarodnih i domaćih naučnih skupova.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Светлана Б. Миловановић

број индекса 17/06

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Хеометријски приступ у испитивању моксидина, његових нечистоћа и потенцијалних деградационих производа применом метода течне хроматографије и масене спектрометрије

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

Потпис докторанда

У Београду, 05.06.2014.

Миловановић Светлана

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Светлана Б. Миловановић

Број индекса 17/06

Студијски програм Фармацеутска хемија

Наслов рада Хеометријски приступ у испитивању моксилидина, његових
нечистоћа и потенцијалних деградационих производа применом
метода течне хроматографије и масене спектрометрије

Ментор Проф. др Мира Зечевић

Потписани/а Светлана Б. Миловановић

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 05.06.2014.

Милошковић Светлана

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Хеометријски приступ у испитивању моксицидина, његових нечистоћа и потенцијалних деградационих производа применом метода течне хроматографије и масене спектрометрије

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

У Београду, 05.06.2014.

Потпис докторанда

Милош Јанковић

1. Ауторство - Дозвољавање 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. Дозвољавање 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 прераде. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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 прераде. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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.