

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Žarko M. Jović

HEMOMETRIJSKI PRISTUP U RAZVOJU
HPLC/UV I HPLC/MS METODA ZA
ODREĐIVANJE I ISPITIVANJE
STABILNOSTI TORASEMIDA
I NEČISTOĆA

doktorska disertacija

Beograd, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Žarko M. Jović

CHEMOMETRIC APPROACH
TO THE DEVELOPMENT OF HPLC/UV
AND HPLC/MS METHODS FOR
DETERMINATION AND STABILITY
TESTING OF TORASEMIDE
AND ITS IMPURITIES

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

MENTOR

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

ČLANOVI KOMISIJE

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

Prof. dr Mila Laušević, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Datum odbrane: _____

Želeo bih da izrazim veliku zahvalnost svom mentoru prof. dr Ljiljani Živanović, redovnom profesoru Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, na godinama uspešne saradnje, na izboru teme, nesebičnoj pomoći, razumevanju i podršci pri izradi ove doktorske disertacije.

Takođe se zahvaljujem prof. dr Miri Zečević, redovnom profesoru Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, na korisnim savetima i sugestijama.

Izražavam zahvalnost i prof. dr Mili Laušević, redovnom profesoru Tehnološko-metalurškog fakulteta, na stručnoj pomoći i praktičnoj saradnji ostvarenoj na Katedri za analitičku hemiju.

Posebnu zahvalnost dugujem kolegamicama Ani Protić i Marini Radišić koje su svojom velikodušnom pomoći i podrškom učinile da svoj eksperimentalni rad u okviru doktorske disertacije zaokružim na pravi način.

Zahvaljujem se i svim kolegama iz Agencije za lekove i medicinska sredstva Srbije koji su pomogli u izradi ovog rada. Kako je najveći deo eksperimenata urađen u Fizičko-hemijskoj laboratoriji, njima najveće hvala!

Zahvalnost dugujem i svojim roditeljima koji su uvek bili uz mene.

Posebno se zahvaljujem kćerki Srni i supruzi Elizabeti, na strpljenju, tolerantnosti, pomoći, podršci i ljubavi tokom svih ovih godina! Njima posvećujem ovaj rad!

HEMOMETRIJSKI PRISTUP U RAZVOJU HPLC/UV I HPLC/MS METODA ZA ODREĐIVANJE I ISPITIVANJE STABILNOSTI TORASEMIDA I NEČISTOĆA

Rezime

Torasemid je diuretik Henleove petlje sa sličnim dejstvom kao furosemid. Koristi se u stanjima edema udruženim sa srčanom bolešću, uključujući i plućni edem, kao i u slučajevima oboljenja bubrega i jetre. Takođe se koristi u tretmanu hipertenzije, samostalno ili u kombinaciji sa drugim antihipertenzivima. Torasemid ostvaruje dejstvo u uzlaznom, debljem kraku Henleove petlje inhibirajući tubularnu reapsorpciju natrijuma (Na^+) i hlora (Cl^-) ograničavanjem natrijum/hlorid/kalijum prenosnog sistema.

U kontroli kvaliteta farmaceutskih proizvoda testovi identifikacije i određivanja sadržaja aktivne supstance i nečistoća su veoma važni sa ciljem da se obezbedi visok kvalitet proizvoda, bez promena u hemijskim, farmakološkim ili toksikološkim karakteristikama. Prema *ICH* smernicama, sve nečistoće prisutne u farmaceutskom doziranom obliku u količini većoj od 0.1% moraju se ispitati. Za istovremeno određivanje torasemida i njegovih nečistoća razvijene su nove, osetljive i pouzdane HPLC/UV i HPLC/MS metode. Kompletno hromatografsko ponašanje ispitivanih supstanci i pronalaženje optimalnih hromatografskih uslova ostvareno je uz upotrebu eksperimentalnog dizajna. Frakcioni faktorski dizajn je korišćen za izbor varijabli koji značajno utiču na hromatografsko razdvajanje. Puni faktorski dizajn je korišćen za optimizaciju tih varijabli kako bi se postiglo zadovoljavajuće razdvajanje između ispitivanih supstanci u najkraćem mogućem vremenu trajanja analize. Nakon toga, obe metode su uspešno validirane u skladu sa *ICH* smernicama i primenjene za ispitivanje farmaceutskog doziranog oblika, torasemid tableta.

Kako u literaturi postoji nedostatak informacija o degradacionom mehanizmu torasemida, to su aktivna farmaceutska supstanca torasemid i farmaceutski dozirani oblik (torasemid tablete) podvrgnuti studijama forsirane degradacije sa ciljem da se identifikuju potencijalni degradacioni proizvodi i ustanovi mogući degradacioni put i sveukupna stabilnost torasemida. Studija je sprovedena u skladu sa *ICH* smernicama, a uzorci su izlagani uslovima hidrolize (kisele, bazne i neutralne), oksidacije, fotolize i termalne degradacije. Za karakterizaciju nastalih degradacionih proizvoda primenjene

su HPLC/UV i HPLC/MSⁿ tehnike. Kvadrupolni i jonski trap maseni analizatori su korišćeni da se ustanovi način fragmentacije degradacionih proizvoda. Glavni degradacioni proizvod koji je dobijen ovim studijama označen je kao degradacioni proizvod R2. Pod ekstremnim uslovima oksidacije dodatno se grade i degradacioni proizvodi okarakterisani kao torasemid N-oksid i R2-N-oksid. Deo studije bio je i cilj da se predloži verovatni degradacioni put torasemida pod različitim eksperimentalnim uslovima.

Studije forsirane degradacije omogućile su razvoj selektivne, validirane *stability-indicating* HPLC/UV metode. Razvoj i optimizacija metode koja će se koristiti za ispitivanje stabilnosti torasemida urađena je uz pomoć metodologije multikriterijumskog odlučivanja i eksperimentalnog dizajna. Na kraju, metoda je uspešno validirana u skladu sa *ICH* smernicama, a primenljivost metode je ispitana na tabletama torasemida.

Ključne reči

Torasemid, Tečna hromatografija, Masena spektroskopija, Validacija metode, Frakcioni faktorski dizajn, Puni faktorski dizajn, Centralni kompozicioni dizajn, Deringerova funkcija poželjnih odgovora, Forsirana degradacija, Degradacioni proizvodi

Naučna oblast

Farmaceutske nauke

Uža naučna oblast

Analitika lekova

CHEMOMETRIC APPROACH TO THE DEVELOPMENT OF HPLC/UV AND HPLC/MS METHODS FOR DETERMINATION AND STABILITY TESTING OF TORASEMIDE AND ITS IMPURITIES

Abstract

Toraseamide is a loop diuretic with actions similar to those of furosemide. Toraseamide is used for edema associated with heart failure, including pulmonary edema, and with renal and hepatic disorders. It is also used in the treatment of hypertension, either alone or with other antihypertensives. It acts in the ascending limb of the loop of Henle by inhibiting tubular reabsorption of sodium and chloride and interacting with the sodium/chloride/potassium co-transport system.

In the quality control of pharmaceutical products identification and quantification of the active ingredient and its impurities is very important in order to achieve a high quality of the product, without change in chemical, pharmacological and toxicological properties. According to *ICH* guidelines, determination of impurities present in pharmaceutical dosage forms above 0.1% is necessary. A new, sensitive and reliable HPLC/UV and HPLC/MS methods for simultaneous determination of toraseamide and its impurities were developed. The complete chromatographic behavior and optimal chromatographic conditions were evaluated with the assistance of experimental design. The fractional factorial design was used for selection of variables which significantly influence the chromatographic separation of the investigated substances. Full factorial design was used for optimization of these variables in order to achieve satisfactory resolution between all investigated substances with the shortest possible analysis time. Afterwards, both analytical methods were successfully validated in accordance with *ICH* guidelines and the applicability of the proposed methods on the toraseamide tablet dosage form has been demonstrated.

As the degradation mechanism of toraseamide has been lacking in the literature, toraseamide active pharmaceutical ingredient and toraseamide tablets drug product were subjected to forced degradation studies in order to identify the potential degradation products and establish the possible degradation pathways and intrinsic stability of the drug. The study was performed according to *ICH* guidelines and samples were exposed

to hydrolysis (acid, base and neutral), oxidation, photolysis and thermal degradation. To characterize the arisen degradation products, HPLC/UV and HPLC/MSⁿ methods were applied. Using single quadrupole and ion trap mass analyzers, a mass fragmentation pattern of degradation products was established. The major degradation product which was formed corresponds to degradation product R2. Under the extreme oxidative stress conditions two degradation products were formed and are proposed to be torasemide N-oxide and degradation product R2-N-oxide. An integral aim of the study was to postulate possible degradation pathway of the drug in different experimental conditions.

Forced degradation studies enabled a development of selective and validated *stability-indicating* HPLC/UV method. A multicriterion evaluation methodology in combination with experimental design was employed for development and optimization of the method that is intended to be used for stability investigation. Finally, the method was successfully validated in accordance with *ICH* guidelines and the applicability of the proposed method was tested on the torasemide tablet dosage form.

Keywords

Torasemide, Liquid chromatography, Mass spectroscopy, Method validation, Fractional factorial design, Full factorial design, Central composite design, Derringer's desirability function, Forced degradation, Degradation products

Scientific field

Pharmaceutical sciences

Scientific discipline

Drug analysis

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Osnovne karakteristike torasemida.....	2
1.1.1. Farmakološke osobine.....	2
1.1.2. Fizičko-hemijske osobine.....	4
1.1.3. Sinteza torasemida i potencijalne nečistoće.....	6
1.1.4. Pregled literaturnih podataka.....	9
1.2. Metode farmaceutске analize.....	13
1.2.1. Tečna hromatografija pod visokim pritiskom.....	14
1.2.2. Masena spektroskopija.....	15
1.2.3. Sprega tečne hromatografije i masene spektroskopije.....	19
1.3. Hemometrijski pristup u razvoju analitičkih metoda.....	20
1.3.1. Teorijske osnove hemometrije.....	20
1.3.2. Eksperimentalni dizajn.....	23
1.3.2.1. Pun faktorski dizajn.....	24
1.3.2.2. Frakcioni faktorski dizajn.....	26
1.3.2.3. Metodologija površine odgovora.....	28
1.4. Studije forsirane degradacije.....	28
2. CILJ RADA.....	32
3. EKSPERIMENTALNI DEO.....	34
3.1. Aparati i pribor.....	35
3.1.1. Tečni hromatograf sa masenim detektorom.....	35
3.1.2. Maseni spektrometar.....	35
3.1.3. Statistički programi.....	35
3.1.4. Ostala oprema i pribor.....	35
3.1.5. Rastvarači i reagensi.....	36
3.1.6. Standardne supstance i farmaceutski dozirani oblik.....	36
3.1.7. Komponente placeba.....	37

3.2. Priprema rastvora za razvoj i optimizaciju HPLC metoda za određivanje torasemida i nečistoća.....	37
3.2.1. Priprema mobilnih faza.....	37
3.2.2. Priprema osnovnih rastvora standardnih supstanci.....	37
3.2.3. Priprema radnog rastvora standardnih supstanci za razvoj i optimizaciju metoda.....	38
3.3. Priprema rastvora za validaciju HPLC/UV i HPLC/MS metoda.....	38
3.3.1. Priprema mobilne faze.....	38
3.3.2. Priprema rastvora za ispitivanje selektivnosti metoda.....	39
3.3.3. Priprema rastvora za ispitivanje linearnosti metoda.....	39
3.3.4. Priprema rastvora za ispitivanje preciznosti i tačnosti metoda.....	40
3.3.5. Priprema rastvora za ispitivanje limita detekcije i kvantifikacije.....	40
3.3.6. Priprema mobilnih faza za ispitivanje robustnosti.....	41
3.3.7. Priprema rastvora uzorka.....	41
3.4. Priprema rastvora za studiju forsirane degradacije.....	42
3.4.1. Priprema rastvora stres agenasa.....	42
3.4.2. Priprema uzoraka za studiju forsirane degradacije.....	42
3.5. Priprema rastvora za razvoj i optimizaciju <i>stability-indicating</i> metode.....	43
3.5.1. Priprema mobilnih faza.....	43
3.5.2. Priprema radnog rastvora za razvoj i optimizaciju <i>stability-indicating</i> metode.....	44
3.6. Priprema rastvora za validaciju <i>stability-indicating</i> metode.....	44
3.6.1. Priprema mobilne faze.....	44
3.6.2. Priprema rastvora za ispitivanje selektivnosti <i>stability-indicating</i> metode.....	45
3.6.3. Priprema rastvora za ispitivanje linearnosti <i>stability-indicating</i> metode.....	45
3.6.4. Priprema rastvora za ispitivanje preciznosti i tačnosti <i>stability-indicating</i> metode.....	45
3.6.5. Priprema rastvora za ispitivanje limita detekcije i kvantifikacije <i>stability-indicating</i> metode.....	46
3.6.6. Priprema rastvora uzorka.....	46

3.7. Hromatografska analiza.....	47
3.7.1. Postupak rada.....	47
3.7.2. HPLC/UV analiza.....	47
3.7.3. HPLC/MS analiza.....	48
3.7.4. HPLC/MS/MS analiza.....	48
3.7.5. HPLC/UV analiza (<i>stability-indicating</i> metoda).....	49
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	50
4.1. Hemometrijski pristup optimizaciji metoda za određivanje torasemida i nečistoća.....	51
4.1.1. Preliminarna ispitivanja hromatografskih uslova.....	51
4.1.2. Preliminarna ispitivanja uslova masene analize.....	56
4.1.3. Primena <i>screening</i> eksperimentalnog dizajna u optimizaciji hromatografskih uslova.....	60
4.1.4. Primena optimizacionog eksperimentalnog dizajna.....	63
4.2. Validacija metoda za određivanje torasemida i nečistoća.....	67
4.2.1. Validacija HPLC/UV metode.....	67
4.2.1.1. Ispitivanje selektivnosti.....	67
4.2.1.2. Ispitivanje linearnosti i opsega metode.....	68
4.2.1.3. Ispitivanje preciznosti metode.....	71
4.2.1.4. Ispitivanje tačnosti metode.....	72
4.2.1.5. Ispitivanje limita detekcije i kvantifikacije.....	73
4.2.1.6. Ispitivanje robustnosti metode.....	73
4.2.2. Validacija HPLC/MS metode.....	74
4.2.2.1. Ispitivanje selektivnosti.....	74
4.2.2.2. Ispitivanje linearnosti i opsega metode.....	77
4.2.2.3. Ispitivanje preciznosti metode.....	80
4.2.2.4. Ispitivanje tačnosti metode.....	81
4.2.2.5. Ispitivanje limita detekcije i kvantifikacije.....	82
4.3. Kvalitativna i kvantitativna analiza torasemid tableta.....	82
4.4. Studija forsirane degradacije.....	85
4.4.1. Hidroliza i termodegradacija.....	87

4.4.2. Fotodegradacija.....	88
4.4.3. Oksidacija.....	89
4.4.4. Fragmentacija torasemida i degradacionog proizvoda R2.....	92
4.4.5. Predloženi put degradacije za torasemid.....	93
4.5. Razvoj i optimizacija <i>stability-indicating</i> metode za torasemid.....	94
4.5.1. <i>Screening</i> faza eksperimenta.....	94
4.5.2. Primena centralnog kompozicionog dizajna u optimizacionoj fazi eksperimenta.....	97
4.5.3. Primena metodologije multikriterijumskog odlučivanja.....	101
4.6. Validacija <i>stability-indicating</i> metode za torasemid.....	105
4.6.1. Ispitivanje selektivnosti.....	105
4.6.2. Ispitivanje linearnosti i opsega metode.....	107
4.6.3. Ispitivanje preciznosti metode.....	108
4.6.4. Ispitivanje tačnosti metode.....	109
4.6.5. Ispitivanje limita detekcije i kvantifikacije.....	109
4.7. Kvalitativna i kvantitativna analiza torasemid tableta <i>stability-indicating</i> metodom.....	109
5. ZAKLJUČAK.....	112
LITERATURA.....	117
PRILOZI	

LISTA SKRAĆENICA KORIŠĆENIH U RADU

adj. – *Adjusted* – Korigovan

ANOVA – *Analysis of variance* – Analiza varijanse

APCI – *Atmospheric pressure chemical ionization* – Hemijska jonizacija pod atmosferskim pritiskom

BP – *British Pharmacopoeia* – Britanska farmakopeja

CE – *Capillary electrophoresis* – Kapilarna elektroforeza

CI – *Chemical ionization* – Hemijska jonizacija

CID – *Collision induced dissociation* – Koliziono aktivirana disocijacija

D – *Desirability function* – Funkcija poželjnih odgovora

EI – *Electron ionization* – Jonizacija elektronima

ESI – *Electrospray ionization* – Elektrosprej jonizacija

FAB – *Fast atom bombardment* – Bombardovanje brzim atomima

FIA – *Flow injection analysis* – Metoda automatskog unosa uzorka u maseni analizator

GC – *Gas chromatography* – Gasna hromatografija

HPLC – *High pressure liquid chromatography* – Tečna hromatografija pod visokim pritiskom

HPLC/MS – *High pressure liquid chromatography/Mass spectroscopy* – Tečna hromatografija pod visokim pritiskom/Masena spektroskopija

HPLC/UV – *High pressure liquid chromatography/Ultraviolet* – Tečna hromatografija pod visokim pritiskom/UV detekcija

ICH – *International Conference on Harmonization* – Međunarodna Konferencija o Harmonizaciji

IR – *Infrared* – Infracrveno

LOD – *Limit of detection* – Limit detekcije

LOQ – *Limit of quantification* – Limit kvantifikacije

MALDI – *Matrix-assisted laser desorption/ionization* – Desorpcija laserom iz matriksa

MEKC – *Micellar electrokinetic chromatography* – Micelarna elektrokinetička hromatografija

MS – *Mass spectroscopy* – Masena spektroskopija

m/z – *Mass to charge ratio* – Odnos mase i naelektrisanja

n – Broj određivanja

NMR – *Nuclear magnetic resonance* – Nuklearna magnetna rezonanca

NP-HPLC – *Normal phase high pressure liquid chromatography* – Normalno-fazna tečna hromatografija pod visokim pritiskom

PDA – *Photodiode-array* – PDA detektor

Ph. Eur. – *European Pharmacopoeia* – Evropska farmakopeja

RP-HPLC – *Reverse phase high pressure liquid chromatography* – Reverzno-fazna tečna hromatografija pod visokim pritiskom

RRt – *Relative retention time* – Relativno retenciono vreme

RSD – *Relative standard deviation* – Relativna standardna devijacija

RSM – *Response surface methodology* – Metodologija površine odgovora

SD – *Standard deviation* – Standardna devijacija

SIM – *Selected ion monitoring* – Praćenje odabranog jona

SPE – *Solid phase extraction* – Čvrsto-tečna ekstrakcija

TLC – *Thin layer chromatography* – Tankoslojna hromatografija

TOF – *Time-of-flight* – Vreme preleta

UPLC – *Ultra performance liquid chromatography* – Tečna hromatografija ultravisokih performansi

UV/VIS – *Ultraviolet/Visible* – Ultraljubičasto/Vidljivo

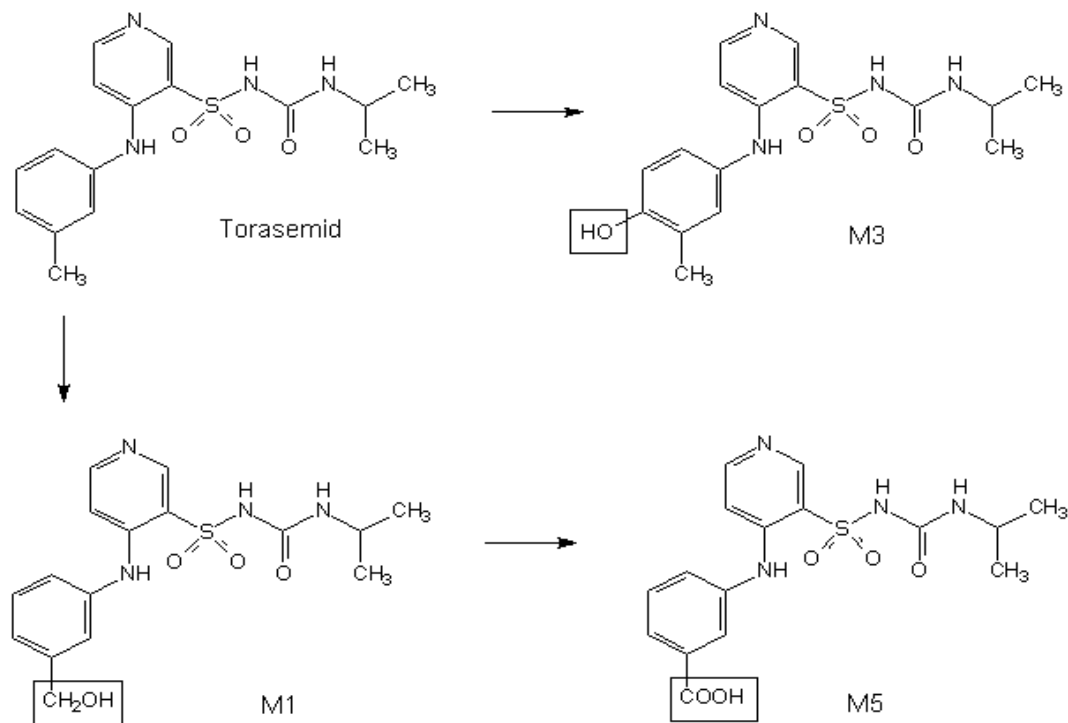
1. UVOD

1.1. OSNOVNE KARAKTERISTIKE TORASEMIDA

1.1.1. Farmakološke osobine

Torasemid je diuretik Henleove petlje i pripada grupi lekova koji povećavaju izlučivanje mokraćne. Torasemid inhibira reapsorpciju natrijuma (Na^+) i hlora (Cl^-) u uzlaznom, debljem kraku Henleove petlje, ograničavanjem $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ prenosnog sistema. Blokodom ovog sistema dolazi do povećanog izlučivanja ovih jona, ali i jona magnezijuma i kalcijuma. Takođe, blokira prelazak hlorida sa peritubularne površine nefrona. Izraziti diuretički efekat uzrokovan je blokodom velikog reapsorptivnog kapaciteta ovog dela tubula [1, 2].

Torasemid se dobro apsorbuje iz gastrointestinalnog trakta. Apsorpcija leka je posle oralne primene dobra, efekat počinje 1 sat po primeni. Primenjen intravenski, efekat se javlja posle 10 minuta. Lek se metaboliše u jetri, pa insuficijencija bubrega ne utiče na eliminaciju iz organizma. Torasemid se metaboliše posredstvom izoenzima citohrom P450 CYP2C9 [3]. Biotransformacijom nastaju tri metabolita: M1, M3 i M5 (slika 1).



Slika 1. Metabolički putevi torasemida i nastanak metabolita M1, M3 i M5

Hidroksilacija metil grupe na benzolovom prstenu torasemida daje metabolit M1 koji se dalje metaboliše oksidacijom do karboksilne kiseline, dajući metabolit M5. Hidroksilacijom benzolovog prstena nastaje metabolit M3. Kod normalne bubrežne funkcije, 10% od doze se izlučuje kao metabolit M1, 44% kao metabolit M5 i 2% kao metabolit M3. Studije pokazuju da metaboliti M1 i M3 mogu imati diuretički efekat, dok je M5 neaktivan metabolit [4].

Bioraspoloživost torasemida je oko 80%, sa malim interindividualnim odstupanjima. Istovremeno uzimanje hrane usporava postizanje maksimalne koncentracije leka za oko 30 minuta, ali bioraspoloživost i aktivnost su nepromenjeni. Bubrežna ili jetrena insuficijencija ne utiču na apsorpciju. Više od 99% torasemida vezuje se za proteine plazme. U odnosu na ostale diuretike Henleove petlje ima duže poluvreme eliminacije (do 4 sata) i veću dužinu delovanja (oko 8 sati) [1].

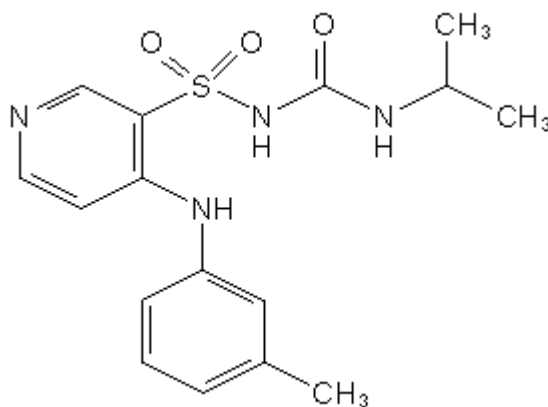
Torasemid je efikasan diuretik za lečenje akutnog edema pluća, za eliminaciju viška tečnosti kod bolesnika sa srčanom i bubrežnom insuficijencijom. Takođe se koristi u tretmanu hipertenzije, sam ili u kombinaciji sa ostalim antihipertenzivnim lekovima. Uobičajena oralna doza je 5 do 10 mg dnevno. Veće doze torasemida aplikuju se kod edema bubrežnog porekla (do 200 mg dnevno) i kod pacijenata sa cirozom jetre, kada dnevna doza ne bi trebalo da bude veća od 40 mg [5, 6].

Neželjena dejstva primene torasemida mogu biti hiponatrijemija, hipovolemija, hipotenzija, cirkulatorni kolaps, aktivacija sistema renin-angiotenzin sa posledicom povećanog izlučivanja jona K^+ i H^+ . U slučaju nedovoljnog unosa kalijuma hranom, postoji rizik od hipokalijemije i poremećaja srčanog ritma. Povećano izlučivanje magnezijuma takođe nosi rizik od aritmija, a moguća je i hipokalcijemija. Ototoksičnost, hiperurikemija, dislipidemija, fotosenzitivne reakcije, depresija koštane srži i gastrointestinalni poremećaji takođe spadaju u moguća neželjena dejstva primene torasemida. Kontraindikacije za primenu su teška hiponatrijemija, hipovolemija i anurija koja ne reaguje na test doze diuretika Henleove petlje.

S obzirom da enzim P450 CYP2C9 igra važnu ulogu u metabolizmu torasemida, treba biti oprezan kada se ovaj lek primjenjuje sa drugim lekovima koji su ili induktori ili inhibitori ovog enzima. Istovremena primena sa aminoglikozidima može pojačati

ototoksičnost, a sa antikoagulansima povećati antikoagulantnu aktivnost. Potreban je oprez i kod istovremene primene litijuma i torasemida zbog smanjenog klirensa litijuma i povećanja njegove toksičnosti. Primena sa preparatima digitalisa može dovesti do pojave aritmija, dok primena sa nesteroidnim antiinflamatornim lekovima i probenecidom može dovesti do smanjenja diuretskog efekta torasemida i drugih diuretika Henleove petlje [2].

1.1.2. Fizičko-hemijske osobine

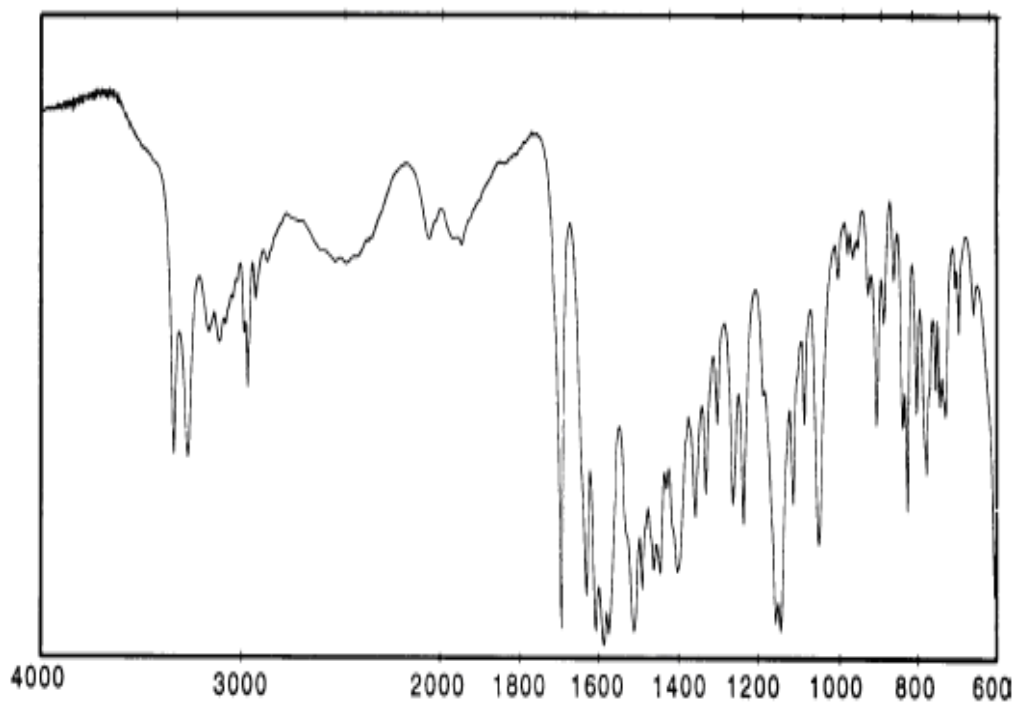


Slika 2. Strukturna formula torasemida

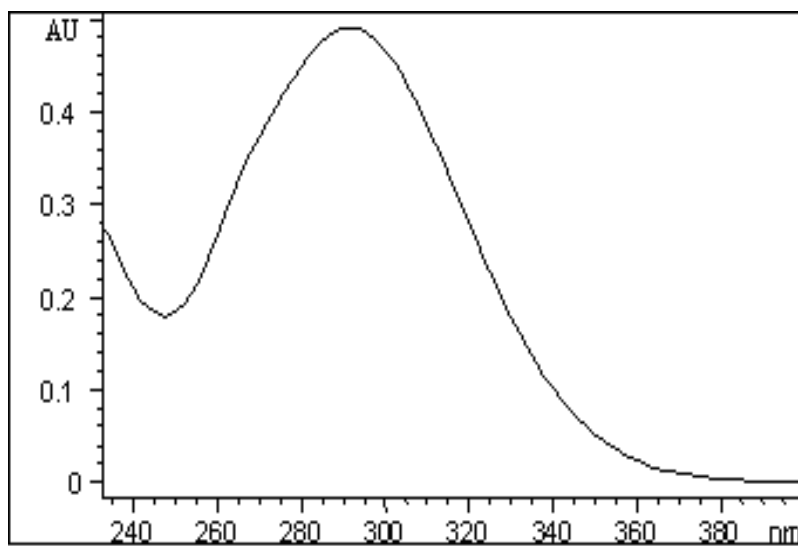
1-(1-metiletil)-3-[[4-[(3-metilfenil)amino]piridin-3-il]sulfonil]urea

Hemijska struktura torasemida se može dokazati snimanjem njegovih spektara različitim tehnikama, kao što su infracrvena apsorpciona spektroskopija (IR), ultraljubičasta apsorpciona spektrofotometrija (UV) i masena spektroskopija (MS).

IR spektar torasemida snimljen tehnikom KBr-diska pokazuje apsorpcione trake koje potiču od karakterističnih funkcionalnih grupa N–H, C–H, CO–NH, C=C, SO₂ (slika 3), a UV spektar daje karakteristični apsorpcioni maksimum na 290 nm (slika 4).

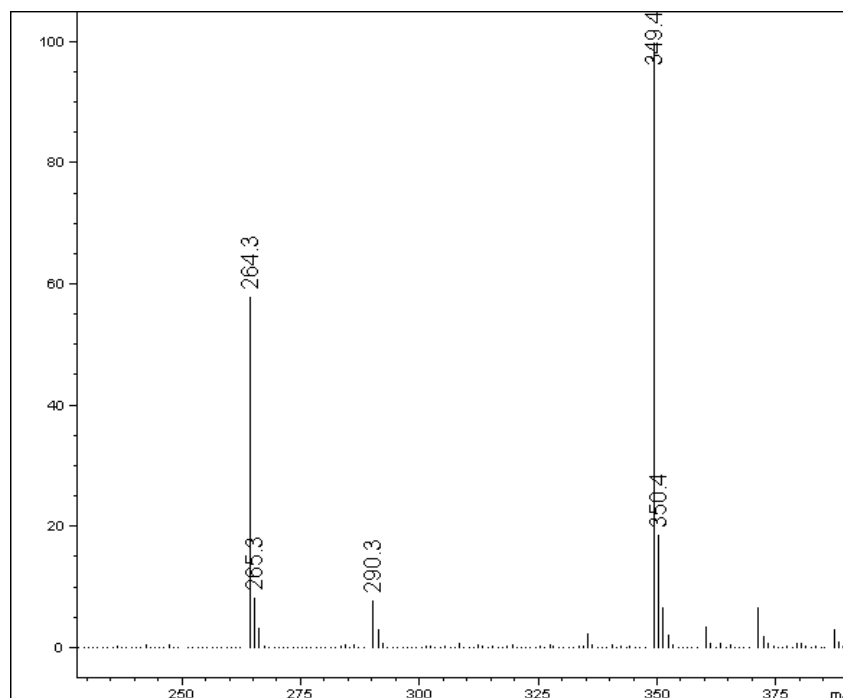


Slika 3. IR spektar torasemida (cm⁻¹)



Slika 4. UV spektar torasemida

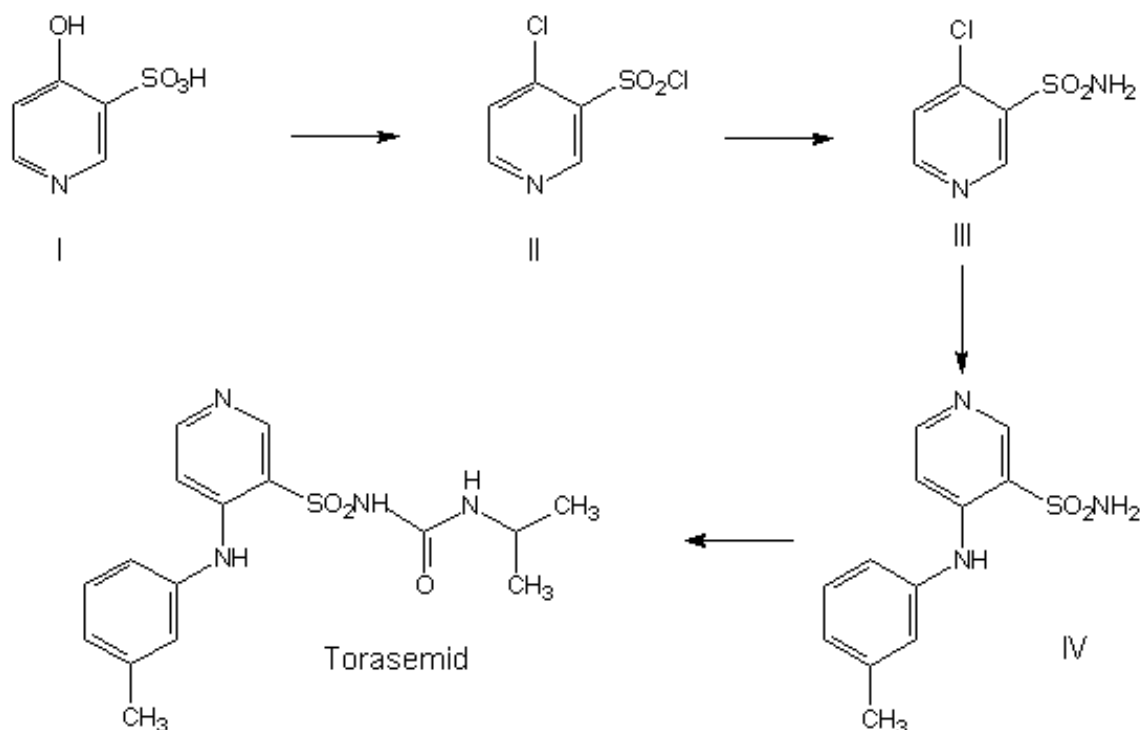
Maseni spekter torasemida snimljen tehnikom elektrosprej jonizacije (ESI, analiza pozitivnih jona) pokazuje molekulski jon (m/z 349) i fragment jone (m/z 290 i 264), prikazano na slici 5.



Slika 5. Maseni spektar torasemida

1.1.3. Sinteza torasemida i potencijalne nečistoće

Sinteza torasemida se odvija nizom hemijskih reakcija počevši od 4-hidroksi-3-piridinsulfonske kiseline (I). U reakciji sa fosfor pentahloridom stvara se 4-hloro-3-piridinsulfohlorid (II), a uvođenjem amonijum hidroksida nastaje jedinjenje 4-hloro-3-piridinsulfonamid (III). U drugom koraku, uvođenjem u reakciju m-toluidina nastaje 4-(3-metilfenilamino)-3-piridinsulfonamid (IV). Ovaj intermedijer u reakciji sa izopropil-izocijanatom daje torasemid, 1-(1-metiletil)-3-[[4-[(3-metilfenil)amino]piridin-3-il]sulfonil]urea. Ključni intermedijeri u ovom procesu su 4-hloro-3-piridinsulfonamid i 4-(3-metilfenilamino)-3-piridinsulfonamid. Sinteza torasemida je prikazana na slici 6 [7].



Slika 6. Šema sinteze torasemida

Kod torasemida se mogu pojaviti četiri potencijalne nečistoće koje su označene kao R2, R3, R4 i R6 i potiču iz procesa sinteze.

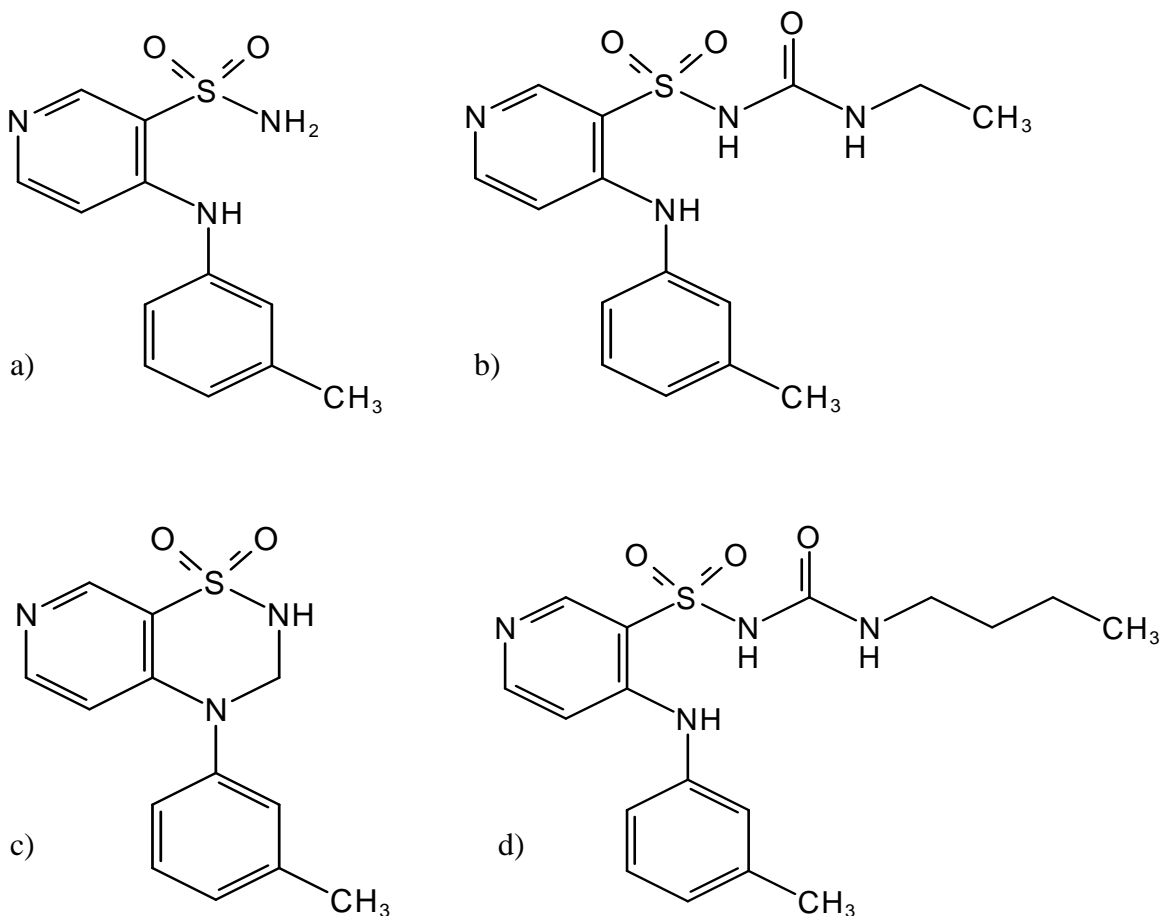
Nečistoća R2, hemijski predstavlja 4-[(3-metilfenil)amino]piridin-3-sulfonamid, pojavljuje se kao intermedijer u sintetskom procesu i potencijalna je degradaciona nečistoća.

Nečistoća R3, 1-etil-3-[[4-[(3-metilfenil)amino]piridin-3-il]sulfonil]urea, može nastati tokom sinteze torasemida, reakcijom između 4-[(3-metilfenil)amino]piridin-3-sulfonamida i etil-izocijanata (koji može biti prisutan u izopropil-izocijanatu).

Nečistoća R4, 3,4-dihidro-4-(3-metilfenil)-2H-pirido[4,3-e]-1,2,4-tiadiazin-1,1-dioksid, može nastati razgradnjom intermedijera 4-[(3-metilfenil)amino]piridin-3-sulfonamida [7].

Nečistoća R6, 1-butil-3-[[4-[(3-metilfenil)amino]piridin-3-il]sulfonil]urea, može nastati tokom sinteze torasemida, reakcijom između 4-[(3-metilfenil)amino]piridin-3-sulfonamida i etil-izocijanata (koji može biti prisutan u izopropil-izocijanatu).

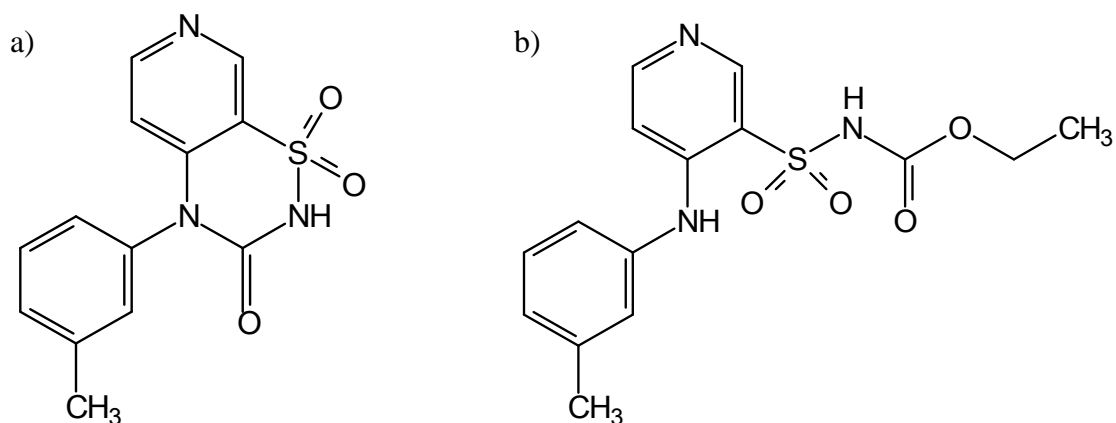
Hemijske strukture ovih nečistoća prikazane su na slici 7.



Slika 7. Hemijske strukture potencijalnih nečistoća torasemida: a) R2, b) R3, c) R4 i d) R6

Oficinalne monografije torasemida u Ph. Eur. 7 [8] i BP 2012 [9] specificiraju 5 nečistoća torasemida. Osim nečistoća R2 (nečistoća B), R3 (nečistoća C) i R6 (nečistoća D) oficinalne su i sledeće nečistoće:

- Nečistoća A, 4-(3-metilfenil)-2H-pirido[4,3-e]-1,2,4-tiadiazin-3(4H)-on-1,1-dioksid (slika 8a)
- Nečistoća E, etil[[4-[(3-metilfenil)amino]piridin-3-il]sulfonil]karbamat (slika 8b)



Slika 8. Hemijske strukture: a) nečistoća A i b) nečistoća E

1.1.4. Pregled literaturnih podataka

Na osnovu detaljnog izučavanja postojeće literature o analitici torasemida, uočeno je da se najveći broj radova odnosi na analizu uzoraka iz bioloških materijala (plazme i urina), tehnikama tečne hromatografije (HPLC) i tečno-masene spektroskopije (HPLC/MS). Osetljiva i brza HPLC metoda za određivanje torasemida iz plazme sprovedena je korišćenjem monolitne silika kolone koja je omogućila kratko trajanje analize (oko 3 minuta) i dobro razdvajanje torasemida od internog standarda furosemida. Analiziranju prethodi tečno-tečna ekstrakcija iz uzoraka plazme, sa etil acetatom uz 0.1 M HCl. Mobilna faza je smeša acetonitrila i amonijum acetatnog pufera (25:75, v/v), pH 4.0. Detekcija se vrši na 290 nm, pri protoku od 2 ml/minuti. Validacija metode je dokazala da je moguća primena metode u farmakokinetičkim studijama torasemida [10].

Torasemid i metaboliti M1, M3 i M5 iz uzoraka plazme određivani su HPLC metodom nakon čvrsto-tečne ekstrakcije (SPE). Prečišćavanje uzorka postignuto je sa C₂ kertridžima uz eluent smeše metanola i vode (75:25, v/v). Separacija komponenti je postignuta na cijano koloni (125 x 4 mm, 5 µm) sa mobilnom fazom sastavljenom od smeše 0.02 M perhlorne kiseline (pH vrednosti 2.5) i acetonitrila (90:10 v/v) pri protoku od 1.5 ml/minuti, a detekcija je izvršena na 290 nm. HPLC analiza ispitivanih komponenti traje 16 minuta [11]. Razdvajanje torasemida od metabolita nakon čvrsto-tečne ekstrakcije moguće

je i na C₁₈ koloni, gradijentnog eluiranja i protoka od 1.5 ml/minuti sa mobilnom fazom koja se sastoji iz smeše acetonitrila i fosfatnog pufera (pH vrednosti 4.5) [12].

HPLC metoda sa elektro-hemijskom detekcijom korišćena je za analiziranje torasemida iz uzoraka urina, na koloni C₁₈ Bondapak pošto je prethodno primenjena čvrsto-tečna ekstrakcija. Mobilna faza je bila smeša vode i metanola (80:20, v/v, pH 3.0) [13], odnosno vode i acetonitrila (65:35 v/v, pH 5.3) [14]. Upotreba elektro-hemijskog detektora doprinela je većoj osetljivosti metode, sa limitom kvantifikacije od 8 ng/ml.

Veliki broj metoda opisuje upotrebu tečno-masene spektroskopije u analitici torasemida, često i u prisustvu drugih lekova iz biološkog materijala. Kvalitativna detekcija torasemida iz urina, u smeši diuretika i drugih supstanci koje se smatraju doping agensima (ukupno 42), izvršena je sa HPLC/MS sistemom sa analitičkom kolonom C₁₈ (50 x 2.1 mm, 3.5 μm). Mobilna faza se sastojala od vode i metanola, sa gradijentnim eluiranjem i protokom od 0.3 ml/minuti ka masenom spektrometru opremljenom sa ESI izvorom. Primena masene spektroskopije omogućila je istovremeno analiziranje velikog broja komponenti u smeši, veću osetljivost metode i njenu praktičnu primenu u rutinskoj anti-doping kontroli [15].

HPLC/MS/MS je korišćena za analizu torasemida u smeši 18 diuretika i probenecida, u uzorcima urina. Priprema uzorka je izvršena tečno-tečnom ekstrakcijom sa etil acetatom. Hromatografski uslovi obuhvataju analitičku kolonu C₁₈ (100 x 3 mm, 5 μm), sa mobilnom fazom 1% sirćetna kiselina (A) i acetonitril (B) u gradijentnom modu: 85%A 2 minuta, linearni gradijent 45%A za 10 minuta, 35%A za 8 minuta, sa protokom od 0.3 ml/minuti. Ukupno vreme trajanja analize je 30 minuta. Jonizacija analita je postignuta sa ESI, sa većom osetljivošću u odnosu na hemijsku jonizaciju pod atmosferskim pritiskom (APCI). Metoda je primenjiva za detektovanje analita u periodu do 4 dana nakon oralnog unosa [16]. Ova metoda je proširena i na određivanje torasemida u prisustvu beta-blokatora dajući limit detekcije torasemida od 25 ng/ml [17]. Optimizovanjem metode i pronalaženjem najboljih parametara za jonizaciju analita moguće je postići najveću moguću osetljivost tehnikom elektrosprej jonizacije, koja za torasemid iznosi 3 ng/ml [18]. Kvantitativno određivanje torasemida u smeši diuretika u urinu moguće je postići i sa HPLC/MS/MS, tehnikom APCI [19].

Za potrebe anti-doping kontrole razvijena je SPE–HPLC/MS/MS metoda za analizu diuretika u smeši od 36 supstanci među kojima je i torasemid. Ekstrakcija analita iz urina urađena je SPE metodom, koja je zamenila tečno-tečnu ekstrakciju sa etil acetatom zbog moguće oksidacije diuretika koji poseduju sulfidne grupe. Optimizacija metode za svaki analit pojedinačno je pokazala da se najveća efikasnost jonizacije dobija sa APCI, a najbolji oblik hromatografskih pikova ako mobilnu fazu čini smeša mravlje kiseline i acetonitrila, na koloni C₁₈ (50 x 2.1 mm, 3 μm). Sve supstance su detektovane u niskim koncentracijama, sa prinosom većim od 80% [20].

Optimizacija SPE metode za analizu 34 diuretika iz uzorka urina je urađena na bazi poznavanja fizičko-hemijskih osobina svakog od diuretika i njihovoj podeli na klase, te odabirom reprezentativnog analita iz svake klase na kome se primenjivao SPE protokol do pronalaženja optimalnih uslova. Diuretici podeljeni u klase dalje su podvrgavani ekstrakciji na različitim SPE kolonama, sa različitim eluentima, a nakon toga analizirani HPLC/MS tehnikom. Ovaj pristup značajno skraćuje vreme potrebno za razvoj metode [21].

Torasemid u urinu je moguće kvantifikovati i gasnom hromatografijom spregnutom sa masenom detekcijom, u kom slučaju je nakon tečno-tečne ekstrakcije sa etil acetatom potrebno izvršiti i derivatizaciju uzorka sa 3-metilanilinijum hidroksidom (0.2 M u metanolu). Hromatografska kolona je kapilarna, DB-1701 (30 m x 0.25mm x 0.25 μm). Temperaturni gradijent je u intervalu od 40 do 300 °C (porast 20 °C/minuti). Metoda je selektivna, sa dobrom tačnošću i ponovljivošću, i limitom kvantifikacije za torasemid od 25 ng/ml [22].

Pregledom literature pronađene su i dve metode kapilarne elektroforeze (CE) za separaciju torasemida i njegovih metabolita M1, M3 i M5 [23], odnosno za određivanje torasemida u smeši diuretika [24]. Kapilarna elektroforeza ima svoju primenu u separaciji komponenti kao i konvencionalne hromatografske metode. Njene prednosti u bioanalizi su visoka rezolucija i kratko vreme analize, minimalni troškovi, jednostavna priprema uzorka i mogućnost injektovanja bioloških uzoraka (urin i serum) direktno u instrument. Optimalna separacija torasemida i metabolita je postignuta za 6.5 minuta sa 60 mM boratnim puferom, pH vrednosti 8.0. Primenjena je voltaža od 30 kV, na temperaturi od 20 °C, sa kapilalom dimenzija 50 cm x 50 μm [23].

Manji broj radova je pronađen u literaturi koji se odnosi na određivanje torasemida u aktivnoj supstanci i farmaceutskim doziranim oblicima. Spektrofotometrijsko određivanje torasemida u tabletama se zasniva na principu reakcije sa *Folin-Ciocalteu* reagensom, u prisustvu natrijum hidroksida i stvaranjem plavo obojenog hromogena čija se apsorbancija meri na 760 nm. Obojenje se razvija 5 minuta po dodavanju reaktanata i stabilno je narednih 30 minuta. Validacija metode je pokazala dobru linearnost (koeficijent korelacije veći od 0.9999), u opsegu od 30–150 µg/ml [25]. Kolorimetrijsko određivanje torasemida u aktivnoj supstanci i tabletama sprovedeno je metodom koja je zasnovana na oksidaciji torasemida gvožđe (III)-hloridom u prisustvu o-fenantrolina, 2,2-bipiridila ili kalijum fericianida, a formirani obojeni kompleksi su mereni na 510, 525 i 710 nm. Metoda je pokazala linearnost u opsegu od 1.5–25 µg/ml [26].

HPLC metoda za određivanje torasemida u aktivnoj supstanci i tabletama je razvijena na analitičkoj koloni C₁₈ (250 x 4.6 mm, 5 µm). Mobilna faza je smeša acetonitrila i fosfatnog pufera (40:60, v/v, pH 3.0), sa protokom od 1.5 ml/minuti i detekcijom na 288 nm. Metanol je korišćen kao rastvarač, za pripremu standardnih rastvora i uzoraka radnih koncentracija 0.1 mg/ml. Validacija metode je pokazala da je koeficijent korelacije veći od 0.9998, da je linearnost postignuta u opsegu 0.2–25 µg/ml sa dobrom tačnošću i preciznošću, bez interferencija sa ekscipijensima iz matriksa i potencijalnim degradacionim proizvodima (torasemid je podvrgnut stres studiji, kiseloj hidrolizi tokom koje je stvoren jedan degradacioni proizvod). Prednost metode je kratko vreme analize torasemida (oko 4 minuta), a može biti primenjena u rutinskoj kontroli kvaliteta aktivne supstance i farmaceutskih doziranih oblika [27].

Određivanje torasemida prikazano je i na koloni C₁₈, sa izokratskim eluiranjem i mobilnom fazom koja se sastojala iz metanola i vode (75:25, v/v, pH 2.5) sa protokom od 1 ml/minuti. Detekcija je izvršena na 214 nm, a kalibraciona kriva je pokazala linearnost u opsegu od 0.1–50 µg/ml [28].

U literaturi je pronađena samo jedna UPLC metoda (tečna hromatografija ultravisokih performansi) za istovremeno određivanje torasemida i nečistoća u tabletama. Hromatografsko razdvajanje je postignuto na koloni C₁₈ (50 x 4.6 mm, 1.8 µm) u gradijentnom sistemu, sa detekcijom analita na 288 nm. Pogodnost metode za analizu

torasemida i tri nečistoće (R2, R3 i R6) je dokazana validacijom. Specifičnost metode je testirana stres studijama (hidroliza, oksidacija, fotoliza i termalna degradacija) kojima je podvrgnuta aktivna supstanca. Koeficijent korelacije kalibracione krive za sve analite je bio bolji od 0.999. Opseg ispitivanja za nečistoće torasemida je bio od 0.025–1.0%. Primena UPLC metode u odnosu na konvencionalni HPLC sistem omogućila je dobro razdvajanje svih komponenti u kratkom vremenu trajanja analize (oko 5 minuta), sa minimalnim utroškom organskih rastvarača potrebnih za pripremu mobilne faze [29].

1.2. METODE FARMACEUTSKE ANALIZE

Metode farmaceutske analize koje treba da omoguće identifikaciju i određivanje aktivnih farmaceutskih supstanci i/ili nečistoća mogu se podeliti u dve grupe: spektroskopske metode i separacione metode. Spektroskopske metode su: spektrofotometrija u ultraljubičastom i vidljivom delu spektra (UV/VIS), spektroskopija u infracrvenoj oblasti spektra (IR), masena spektroskopija (MS) i nuklearna magnetna rezonantna spektroskopija (NMR). Separacione metode su: tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC), gasna hromatografija (GC), tankoslojna hromatografija (TLC), kapilarna elektroforeza (CE) i micelarna elektrokinetička hromatografija (MEKC).

Hromatografske metode kao separacione imaju prednost zbog mogućnosti razdvajanja višekomponentnih uzoraka, zbog visoke tačnosti i osetljivosti, a dominantna primena im je u kvantitativnoj analizi. Masena spektroskopija, sa druge strane, snimanjem masenih spektara svakog analita omogućava nedvosmislenu identifikaciju, čak i u smešama gde nije postignuto potpuno razdvajanje. Kombinacija HPLC sa masenom detekcijom je danas široko korišćena metoda farmaceutske analize u kontroli kvaliteta farmaceutskih proizvoda [30].

Kako je svrha svake analitičke metode da se njenom primenom dobiju dosledni, pouzdani i tačni rezultati, to ona mora biti i validirana. Regulatorna i standardi kvaliteta koji se primenjuju u analitičkim laboratorijama sadrže delove u kojima se bliže definiše oblast validacije analitičkih metoda [31, 32]. Koji će se parametri razmatrati tokom validacije metoda zavisi od vrste metode i namene, odnosno od vrste uzorka koji se

analizira, od količine ispitivane supstance u uzorku i od vrste ispitivanja koje se sprovodi (identifikacija, određivanje sadržaja, limit test itd...).

1.2.1. Tečna hromatografija pod visokim pritiskom

Tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC) je separaciona metoda kod koje je mobilna faza tečnost, a stacionarna faza (kojom je napunjena kolona) je fino usitnjena čvrsta materija ili tečnost naneta na čvrst nosač koji je hemijski modifikovan uvođenjem organskih grupa. Tečna hromatografija se zasniva na mehanizmima raspodele između dve faze (čvrsto-tečne i tečno-tečne), izmene jona ili raspodele po veličini mase.

U tečnoj hromatografiji normalnih faza (NP-HPLC) stacionarna faza je polarna, a mobilna faza nepolarna i koristi se za razdvajanje polarnih supstanci. Razdvajanje se zasniva na stvaranju vodoničnih veza ili polarnim interakcijama supstance i stacionarne faze.

U hromatografiji reverznih faza (RP-HPLC), stacionarna faza je nepolarna a mobilna faza polarna i koristi se za razdvajanje nepolarnih ili slabo polarnih supstanci. Razdvajanje se zasniva na hidrofobnim interakcijama supstance sa nepolarnom, najčešće ugljovodoničnom stacionarnom fazom. Nepolarne komponente ostvaruju jače veze sa stacionarnom fazom, pa se sa kolone eluiraju kasnije od polarnih [33–36]. Osim hidrofobnih interakcija supstance sa nepolarnom stacionarnom fazom, prisutne su i specifične interakcije sa molekulima rastvarača. Voda kao izrazito polarni rastvarač u kombinaciji sa drugim manje polarnim organskim rastvaračima (metanol, acetonitril, tetrahidrofuran) predstavlja najčešće korišćene mobilne faze. Kao modifikatori mobilne faze dodaju se kiseline (fosforna), baze (trietilamin), puferi (fosfatni) ili jon-par reagensi (tetrabutilamonijum-sulfat). Uloga modifikatora je suzbijanje jonizacije ispitivanih supstanci jer molekulska forma ostvaruje bolju interakciju sa kolonom, pa se dobijaju pikovi sa boljom simetrijom. Dodavanje pufera u mobilnu fazu utiče na stepen jonizacije i održava pH vrednost mobilne faze konstantnom. Analiti koji predstavljaju slabe kiseline najbolje će se razdvajati pri pH vrednostima mobilne faze manje od 3. Slabe baze se određuju pri pH vrednosti 5 do 7, a jake baze na pH vrednosti većoj od 8. Izbor pufera i molaritet zavisice od njegovog kapaciteta, UV apsorpcije, rastvorljivosti i stabilnosti [37].

Parametri koji karakterišu jedan hromatografski sistem su: retenciono vreme mobilne faze, retenciono vreme analita i relativno retenciono vreme, broj teorijskih platoa, simetrija pika.

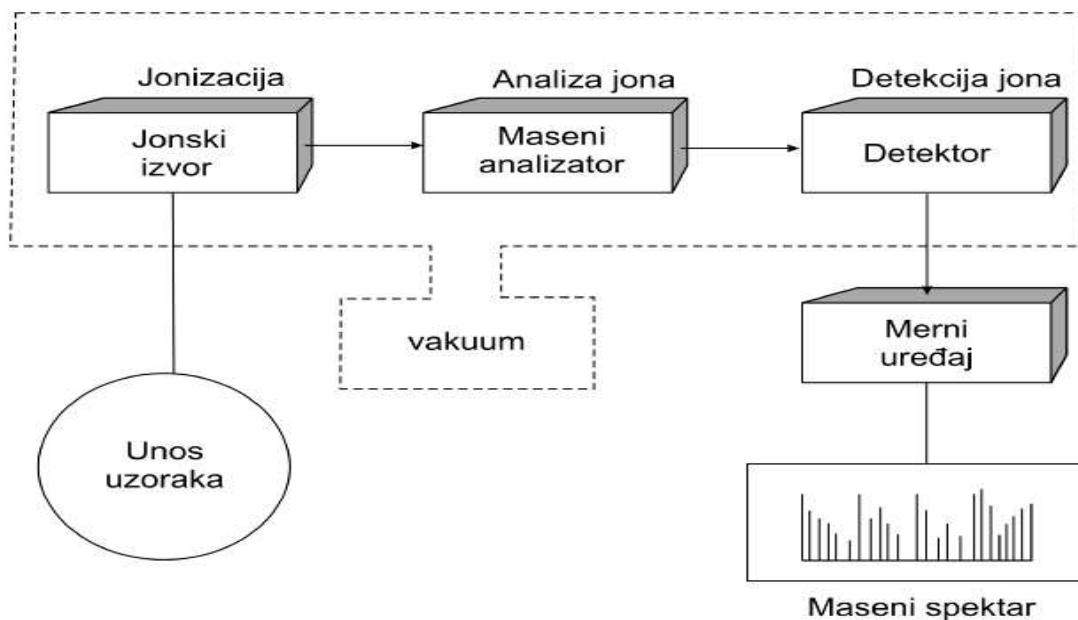
Faktor kapaciteta (ili retencioni faktor, k') je parameter dužine zadržavanja analita na koloni. Ako faktor kapaciteta analita sa najkraćim vremenom zadržavanja iznosi najmanje 1, tada je on dobro razdvojen od pika rastvarača. Vrednosti za faktor kapaciteta veće od 10 govore o većem afinitetu vezivanja za stacionarnu fazu i predugom vremenu trajanja analize. Izuzetno, za višekomponentne smeše prihvatljive su vrednosti $0.5 \leq k' \leq 20$. Za razdvajanje komponenti sa bliskim faktorima kapaciteta može biti neophodna i promena sastava mobilne faze u toku hromatografske analize, odnosno gradijentno eluiranje.

Parametri hromatografskog sistema koji karakterišu efikasnost razdvajanja dve komponente su faktor selektivnosti i faktor rezolucije. Kada je faktor selektivnosti veći od 1 smatra se da je postignuto zadovoljavajuće razdvajanje ispitivanih komponenti. Faktor rezolucije između dva pika približno iste veličine treba da je najmanje 1.5, što se smatra razdvajanjem na baznoj liniji [37].

1.2.2. Masena spektroskopija

Masena spektroskopija je analitička tehnika sa primenom u kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi, za određivanje strukture, molekulske mase i izotopskog sastava složenih organskih molekula. Molekule se analiziraju obrazovanjem naelektrisanih jona, te njihovim razdvajanjem na osnovu mase i naelektrisanja. Jonizacija molekula može biti praćena i njihovom daljom fragmentacijom tako da se identifikacija može vršiti i na osnovu karakterističnih fragmenata. Masenom spektroskopijom mogu se analizirati molekuli u smešama, a da prethodno nisu potpuno hromatografski razdvojeni. Pored selektivnosti, tehnika poseduje i veliku osetljivost (oko 1 pg).

Maseni spektrometar funkcioniše pod visokim vakuumom, a ispitivani uzorak se jonizuje. Osnovni delovi instrumenta su: sistem za unošenje uzorka, jonski izvor, maseni analizator, detektor (koji pretvara jonski signal u električni) i sistem za registraciju signala (slika 9).



Slika 9. Šema masenog spektrometra

Jonski izvor služi da se ispitivani uzorak prevede u jone. Jonizacione tehnike koje se koriste su: jonizacija elektronima (EI), hemijska jonizacija (CI), bombardovanje brzim atomima (FAB), desorpcija laserom iz matriksa (MALDI), kao i hemijska jonizacija pod atmosferskim pritiskom (APCI) i elektrosprej jonizacija (ESI) [38].

U jonizaciji elektronima (EI), analit od interesa (koji je u gasovitom stanju) se bombarduje elektronima velike energije (obično oko 70 eV). Molekuli analita apsorbuju deo ove energije pri čemu se dešava jonizacija molekula kroz odvajanje jednog elektrona. Tako nastaje katjonski radikal koji se označava kao molekulski jon (M^+), pri čemu odnos m/z odgovara molekulskoj masi analita:



Novonastali jon ima višak energije koja se može iskorisiti za njegovu fragmentaciju i koja može obezbediti dosta informacija vezanih za strukturu. Nedostatak ove tehnike jonizacije je što energije koje su prenete molekulima analita prilikom bombardovanja elektronima mogu dovesti do intenzivne fragmentacije tako da se molekulski jon uopšte ne može primetiti u masenom spektru.

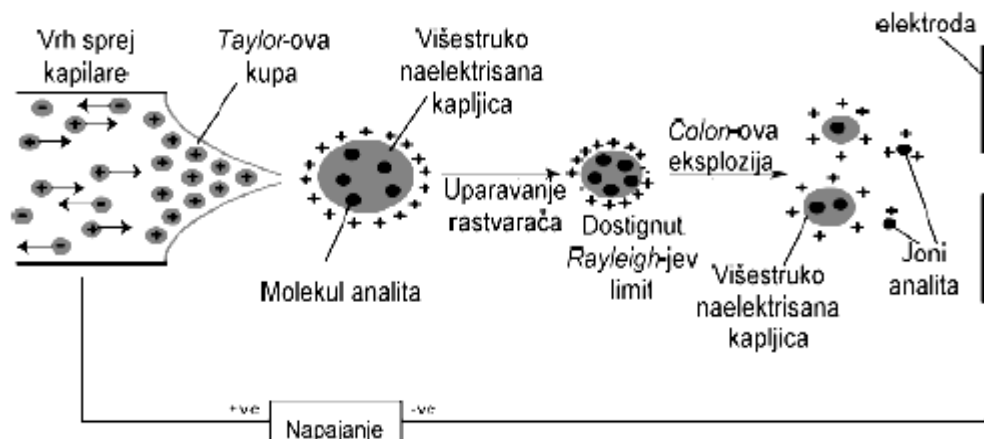
Za razliku od elektronske jonizacije, hemijska jonizacija (CI) spada u meke tehnike jonizacije koje favorizuju nastanak molekuskog jona sa malim viškom energije i bez značajne fragmentacije. Hemijska jonizacija se sprovodi sa jonima reagujućeg gasa (metan), pri čemu su proizvodi adukti reagujućeg gasa i molekul analita, pa se odnos m/z ne može direktno povezati sa molekulskom masom.

Od jonizacionih tehnika najefikasnije za analizu biomolekula velike molekulske mase su tehnika bombardovanja brzim atomima (FAB) i desorpcija laserom iz matriksa (MALDI) [39, 40].

Hemijska jonizacija pod atmosferskim pritiskom (APCI) se koristi za analizu slabo polarnih i jedinjenja male molekulske mase, do 1500 *Da*. Rastvor analita koji se može direktno injicirati ili dolazi iz tečnog hromatografa, sa protokom od 0.2–2 ml/minuti, se u raspršivaču pretvara u fini aerosol, a rastvarač uklanja uparavanjem u zagrejanom kvarcnoj tubi. Na izlazu iz tube je igla, pod visokim naponom, što uzrokuje električno pražnjenje i stvaranje jona. Joni se zatim prevode do masenog analizatora. Jonizacioni proces u APCI je sličan po količini prenete energije onom u hemijskoj jonizaciji, sa tom razlikom što se dešava pod atmosferskim pritiskom. Rezultat jonizacije je stvaranje molekulskih jona i adukt jona sa vrlo malo fragmentacije.

Kod elektosprej jonizacije (ESI) eluent sa kolone se potiskuje kroz usku kapilaru, koja je pod naponom, pri čemu se tečnost raspršuje u fine naelektrisane kapljice. Efikasno raspršivanje i jonizacija je moguća u prisustvu jakog električnog polja koje se uspostavlja između vrha kapilare i cilindrične elektrode. Ceo proces je potpomognut inertnim gasom za raspršivanje (azot). Odbijanje naelektrisanih čestica dovodi do širenja tečnosti i stvaranja *Taylor*-ove kupe. Stvorene naelektrisane kapljice dalje nosi inertni gas. Uparavanjem rastvarača naelektrisanim kapljicama se smanjuje veličina, a joni koji su relativno neisparljivi ostaju zajedno. To vodi porastu elektrostatskih sila odbijanja unutar kapljice i konačno njenom raspadu na manje čestice. Ova pojava se naziva *Colon*-ova eksplozija i do nje dolazi kada se dostigne *Rayleigh*-jev limit, odnosno kada odbijanje istoimenih naelektrisanja postane dovoljno veliko da se savlada površinski napon i dođe do cepanja kapi. Krajnji rezultat ovog procesa (slika 10) je nastanak naelektrisanih čestica ispitivane

supstance iz uzorka koje kroz konus napuštaju komoru i ulaze u maseni analizator [34, 38–41].



Slika 10. Mehanizam ESI jonizacije

Za razliku od APCI, ESI tehnika je primenljiva na polarne analite srednjih ili velikih molekularnih masa i generalno ima veću osetljivost, što je značajno za kvantitativnu analizu. Sa druge strane, APCI bolje podnosi veće koncentracije pufera i veći protok mobilne faze. Razdvajanje jona prema odnosu m/z vrši se u masenom analizatoru. Najveću primenu imaju magnetski sektor, kvadrupol, jonski trap i analizator vremena preleta (TOF).

Maseni analizatori mogu u sebi sadržavati više analizatora, u kom slučaju govorimo o tandemskoj spektroskopiji masa (MS/MS ili MS^n). Osnovna prednost tandemске spektroskopije masa je visoka selektivnost, a identifikacija ispitivanog jedinjenja se ne vrši samo na osnovu molekulske mase, već i na osnovu karakterističnih fragmenata. Najčešće se sreću kombinacije kvadrupola sa magnetskim sektorom ili TOF analizatorom, jonski trap i trostruki kvadrupol. Prvi od tri kvadrupola u seriji selektivno propušta jon karakterističan za ispitivani analit (najčešće molekularni jon), a nakon koliziono aktivirane disocijacije (CID) koja se dešava u drugom kvadrupolnom filteru, u treći kvadrupolni filter se propuštaju karakteristični joni potomci (fragmenti) [30, 38, 41].

Tandemska spektroskopija masa ima svoju primenu u praćenju stabilnosti lekova, određivanju sekvenci aminokiselina u proteinima ili metaboličkim studijama. Povezan sa tečnim hromatografom, u analizama komponenti u smešama koje prethodno nisu potpuno hromatografski razdvojene, maseni analizator može izolovati željenu komponentu iz smeše i dobiti strukturne informacije bez interference sa drugima.

1.2.3. Sprega tečne hromatografije i masene spektroskopije

Identifikacija nečistoća prisutnih u maloj količini, analiza kompleksnih smeša ili analiza nepoznatih uzoraka zahteva multidisciplinarn pristup u farmaceutskoj analizi. Sprega jedne separacione i jedne spektroskopske metode čini tečnu hromatografiju sa masenom spektroskopijom (HPLC/MS). U tečnoj hromatografiji identifikacija nepoznate supstance se zasniva na poređenju retencionih karakteristika sa referentnim materijalom. U kompleksnim smešama mogu biti supstance koje pokazuju slično hromatografsko ponašanje, što će otežati i kvalitativnu i kvantitativnu analizu. Sa druge strane, moć masene spektroskopije leži u činjenici da je maseni spektar jedinjenja dovoljno specifičan da omogući sigurnu identifikaciju sa visokom osetljivošću [30].

Određena ograničenja sprege HPLC/MS proističu iz činjenice da je mobilna faza u HPLC tečnost sa velikim udelom vode koja se pumpa kroz analitičku kolonu sa velikim protokom. Sve to predstavlja prepreku za održanje vakuuma potrebnog za rad spektrometra. Dalje, ni sve supstance koje se analiziraju HPLC sistemom nemaju dovoljnu isparljivost za MS sistem. Uloga interfejsa (eng. *interface*) između ova dva sistema je da omogući ulazak eluata sa kolone koji se isparava i u gasnoj fazi uvodi u maseni spektrometar. Osim toga, u HPLC analizi se često koriste i puferi u mobilnoj fazi (fosfatni, boratni...) koji se za rad sa MS moraju zameniti isparljivim (amonijum acetat, formijat...), a pH vrednost podesiti sa mravljom ili sirćetnom kiselinom.

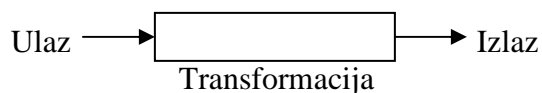
ESI i APCI jonizacija se najčešće sreću u sprezi HPLC/MS. Nepolarne mobilne faze koje se koriste u NP-HPLC su isparljive i bolje za rad sa APCI. ESI tehnika ima veću primenu u RP-HPLC. Separacione karakteristike HPLC potpomognute selektivnošću i osetljivošću masenog spektrometra daju kvalitativne i kvantitativne informacije od visokog poverenja, za širok spektar supstanci od farmaceutskog interesa.

1.3. HEMOMETRIJSKI PRISTUP U RAZVOJU ANALITIČKIH METODA

1.3.1. Teorijske osnove hemometrije

Klasičan pristup razvoju jedne hromatografske metode podrazumevao je sprovođenje velikog broja eksperimenata, pri čemu se ispitivanje jednog parametra i njegovog uticaja na ceo sistem vršilo tako što su se svi ostali parametri održavali na konstantnom nivou. Sa druge strane, savremen i napredan statistički pristup planiranja eksperimenata, njihovog broja i redosleda omogućava efikasnije istraživanje u kome će manji broj eksperimenata doneti veliki broj relevantnih podataka.

Hemometrija je naučna disciplina koja koristi matematičke, statističke, grafičke ili simboličke metode za obradu, modelovanje i multikriterijumsku procenu podataka. U osnovi hemometrije je sistem, a on se posmatra kao celina sa spoljnim ulazima (eng. *inputs*), izlazima (eng. *outputs*) i transformacijama koje se dešavaju unutar celine (slika 11) [42].



Slika 11. Šematski prikaz teorije sistema

Ulazi su kvalitativne i/ili kvantitativne veličine koje mogu, ali i ne moraju, imati uticaja na sistem. Intenzitet ulaza naziva se nivo. Ulazi mogu predstavljati varijable ili faktore. Varijable se definišu kao kvalitativne ili kvantitativne nezavisno promenljive koje mogu preuzeti jednu od beskonačnog broja ponuđenih vrednosti, a faktori kao varijable koje utiču na određeni rezultat ili proces. U početnoj fazi istraživanja vrši se ispitivanje velikog broja ulaznih varijabli kako bi se procenilo koje od njih predstavljaju faktore.

Izlazi su kvalitativne i/ili kvantitativne veličine na koje može, a ne mora, da utiče sistem. Izlazi na koje sistem ima uticaja nazivaju se odgovori sistema, a intenzitet izlaza je nivo.

Transformacija je deo sistema koji povezuje nivoe faktora i nivoe odgovora sistema.

Opis ponašanja jednog sistema predstavljen je modelom, odnosno matematičkom vezom između varijabli (nezavisno promenljivih, $x_1, x_2, x_3 \dots$) i odgovora sistema (zavisno

promenljive, y). Najjednostavniji matematički model je linearni model, ili polinom prvog reda, koji sadrži odsečak i linearne članove.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + \dots + b_nx_n + \varepsilon \quad (1)$$

pri čemu je b_0 srednja vrednost odgovora sistema, b_1, b_2, \dots, b_n su koeficijenti modela (ili parametri modela), dok ε predstavlja grešku.

Polinom drugog reda (interakcioni model) je složeniji sistem koji sadrži odsečak, linearne članove i članove interakcija.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + \dots + b_nx_n + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + \dots + b_{(n-1)n}x_{n-1}x_n + \varepsilon \quad (2)$$

pri čemu su $b_{12}x_1x_2, b_{13}x_1x_3, b_{23}x_2x_3, \dots, b_{(n-1)n}x_{n-1}x_n$ članovi interakcija.

Dva gore opisana matematička modela se najčešće koriste u početnim fazama istraživanja, skринing studijama (eng. *screening*). Treći tip modela je kvadratni model sa dve varijable koji sadrži i kvadratne članove, te može da opiše i nelinearne veze između varijabli i odgovora sistema [43].

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 + \varepsilon \quad (3)$$

Koeficijenti linearnih članova modela služe za uspostavljanje direktne veze između ispitivanih faktora i odgovora sistema, dok su koeficijenti kvadratnih članova modela odgovorni za zakrivljenost površine odgovora i pojavu minimuma i maksimuma kod optimizacionih vrsta dizajna, što omogućava određivanje optimalnih nivoa ispitivanih faktora. Koeficijenti članova interakcija govore o mogućim interakcijama između faktora, pri čemu se ne sme zanemariti ni faktor koji ne pokazuje uticaj na sistem, ukoliko je u interakciji sa drugim faktorom.

Koeficijenti modela nose pozitivan ili negativan predznak, u zavisnosti od toga da li su faktor i odgovor sistema u direktnoj ili obrnutoj srazmeri. Da bi se njihova značajnost mogla porediti, oni moraju biti na uporednoj skali. Zbog toga su nivoi faktora kodirani matematički, tako da se niži, viši i srednji nivo kodiraju oznakama -1, +1 i 0 [42, 44]. Statističke metode kojima se određuje značajnost faktora, odnosno da li on ima statistički značajan uticaj na odgovor sistema su *Student-ov t-test*, *F-test* i *grafik verovatnoće normalne raspodele*.

Koeficijenti modela (E) kod *Student*-ovog t -testa imaju statistički značajan uticaj ukoliko je vrednost efekta (E) veća od kritične vrednosti efekta ($E_{kritično}$):

$$E_{kritično} = t_{kritično} \times (SE)_e \quad (4)$$

Vrednost $t_{kritično}$ se uzima iz tablice *Student*-ovog t -testa za nivo značajnosti 0.05 i odgovarajući broj stepeni slobode. Uzima se vrednost za dvostrani test jer se posmatraju svi koeficijenti modela, i pozitivni i negativni. Interval pouzdanosti je definisan jednačinom:

$$[E - t_{kritično} \times (SE)_e ; E + t_{kritično} \times (SE)_e] \quad (5)$$

Vrednost $(SE)_e$ predstavlja standardnu grešku efekata faktora na odgovor sistema i može se izračunati iz ukupnog broja izvedenih eksperimenata N :

$$(SE)_e = (4 s^2 / N)^{1/2} \quad (6)$$

pri čemu s^2 predstavlja varijansu ukupnog broja izvedenih eksperimenata. Broj stepeni slobode za $t_{kritično}$ zavisi od broja eksperimenata na svakom faktorskom nivou, $df = n - 1$.

Varijansa, s^2 se može izračunati na osnovu ponovljenih eksperimenata u jednoj tački, najčešće centralnoj:

$$s^2 = \sum (y_i - \bar{y})^2 / (R - 1), 1 \leq i \leq R \quad (7)$$

pri čemu je y_i vrednost odgovora sistema pri svakom ponavljanju, \bar{y} je srednja vrednost odgovora sistema, R je ukupan broj ponavljanja, a broj stepeni slobode za određivanje $t_{kritično}$ je $df = R - 1$.

Za procenu značajnosti faktora koristi se i F -test. Vrednost F se računa prema jednačini:

$$F = s^2_{lof} / s^2_{pe} = (SS_{lof} / df_{lof}) / (SS_{pe} / df_{pe}) \quad (8)$$

odnosno, prema tome koliko je značajna varijansa neslaganja matematičkog modela i eksperimentalno dobijenih podataka (s^2_{lof}) u odnosu na varijansu čiste eksperimentalne neizvesnosti (s^2_{pe}). U tabelama F -raspodele mogu se naći vrednosti za različite nivoe verovatnoće i broj stepeni slobode. Ukoliko je izračunata $F > F_{tablično}$ radi se o statistički značajnom uticaju faktora ili interakcije na odgovor sistema [42, 44].

Grafik verovatnoće normalne raspodele koristi se za procenu značajnosti faktora u eksperimentu kod koga nema ponovljenih merenja. Teorija na kojoj se zasniva ovaj metod je da serija slučajno izabranih brojeva prati Gausovu krivu normalne raspodele. Kada se

vrednosti ispitivanih parametara podjednako pojavljuju na krivi normalne raspodele, zaključuje se da oni nisu statistički značajni. Parametri sa veoma velikom ili malom vrednošću govore o statistički značajnom uticaju na odgovor sistema.

Procena adekvatnosti uklapanja matematičkog modela u eksperimentalne podatke vrši se primenom analize varijanse (ANOVA). Parametri od značaja za validaciju matematičkog modela su regresija i ostatak, neslaganje matematičkog modela i eksperimentalno dobijenih podataka i čista eksperimentalna neizvesnost [42, 45].

1.3.2. Eksperimentalni dizajn

Eksperimentalni dizajn podrazumeva planiranje i izvođenje bloka eksperimenata organizovanih tako da se vrši promena više parametara eksperimenta istovremeno, sa matematičkom interpretacijom dobijenih rezultata, što omogućava definisanje uticaja svakog parametra pojedinačno i u interakciji sa ostalim parametrima. Eksperimentalni dizajn daje informacije o ključnim parametrima procesa, smanjuje njegovu varijabilnost, a istovremeno poboljšava kvalitet istraživanja. Svoju praktičnu primenu u razvoju i validaciji metoda farmaceutske analize ima tokom procesa optimizacije metode i testiranja robustnosti [45–49].

Da bi se iz malog broja eksperimenata dobilo što više značajnih informacija potrebno je definisati eksperimentalne faktore za koje se zna da imaju uticaja na željeni rezultat. U okviru eksperimentalnog dizajna, *screening* dizajn služi za određivanje faktora koji su za dalje, detaljnije ispitivanje. U ovoj fazi testiraće se veći broj faktora. Cilj je da isključimo iz eksperimenta one koji nemaju značajan uticaj na odgovor sistema, a njihove vrednosti će se u daljim istraživanjima držati konstantnim. U *screening* dizajn spadaju pun faktorski dizajn na dva nivoa i frakcioni faktorski dizajn, kojima ćemo konačno definisati faktore koji imaju uticaja na rezultat, veličinu tog uticaja i faktorske interakcije [44, 50–52].

Detaljnija analiza sistema i pronalaženje optimalnih uslova postiže se primenom optimizacionih vrsta dizajna, kod kojih se faktori od značajnog uticaja na odgovor sistema ispituju na više nivoa. U optimizacione vrste dizajna spadaju pun faktorski dizajn na tri nivoa, centralni kompozicioni, *Box–Behnken*-ov i *Doehlert*-ov, a sreću se u okviru metodologije površine odgovora (RSM) [44, 50–52].

1.3.2.1. Pun faktorski dizajn

Pun faktorski dizajn se koristi za procenu uticaja faktora na posmatrani odgovor sistema i procenu značaja interakcija među ispitivanim faktorima. Faktorski nivoi predstavljaju vrednosti faktora koje variramo, odnosno pri kojima ispitujemo uticaje datog faktora ili interakcije. Radi praćenja veličine uticaja ovi nivoi, gornji i donji, se kodiraju i obeležavaju kao +1 i -1. Svakoj kodiranoj vrednosti odgovara stvarna, realna vrednost faktora koja se određuje pre izvođenja eksperimenta.

Pun faktorski dizajn na dva nivoa se sastoji od 2^k eksperimenata, gde je k broj faktora koji ispoljavaju uticaj na neki sistem. Ukupan broj eksperimenata u ovom dizajnu je 4 (tabela 1), a model dizajna ima formulu:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 \quad (9)$$

Sa povećanjem broja ispitivanih faktora značajno se povećava i broj eksperimenata koje je potrebno izvesti. Pun faktorski dizajn sa tri faktora ima 8 eksperimenata (tabela 2), a model dizajna je:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3 \quad (10)$$

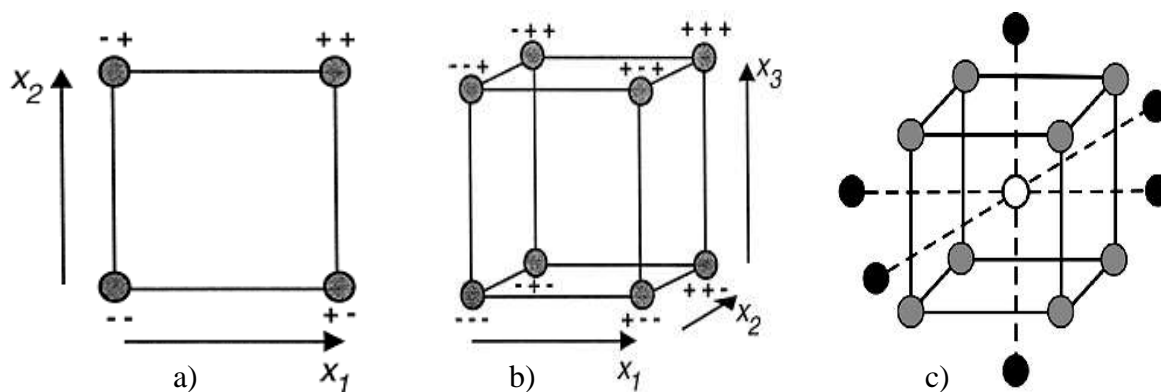
Ispitivanje uticaja dva i tri faktora na odgovor sistema, eksperimentalni domen i kombinacije faktora koje čine dizajn se mogu prikazati i grafički, kao ugao kvadrata za dva faktora (slika 12a) i uglovi kocke za tri faktora (slika 12b) [43, 44, 51].

Tabela 1. Pun faktorski dizajn sa dva faktora

Redni broj eksperimenta	Faktori	
	X_1	X_2
1.	-1	-1
2.	+1	-1
3.	-1	+1
4.	+1	+1

Tabela 2. Pun faktorski dizajn sa tri faktora

Redni broj eksperimenta	Faktori		
	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



Slika 12. Pun faktorski dizajn: a) dva faktora na dva nivoa i b) tri faktora na dva nivoa, c) centralni kompozicioni dizajn

S obzirom da se faktorski dizajn izvodi na granicama domena faktora, dodatni eksperimenti se mogu izvesti i u centralnoj tački (srednji nivo), radi smanjenja rizika nelinearnog odnosa u centru ispitivanog intervala i precizne procene eksperimentalne greške. U ovom slučaju govorimo o punom faktorskom dizajnu na tri nivoa koji se koristi kao optimizacioni dizajn (tabela 3) [44, 52].

Tabela 3. Pun faktorski dizajn sa dva faktora na tri nivoa

Redni broj eksperimenta	Faktori	
	X ₁	X ₂
1.	-1	-1
2.	-1	+1
3.	-1	0
4.	+1	-1
5.	+1	+1
6.	+1	0
7.	0	-1
8.	0	+1
9.*	0	0

* ponavljanja u centralnoj tački omogućavaju izračunavanje standardne greške

Vrsta optimizacionog dizajna je i centralni kompozicioni dizajn koji nastaje kada se na pun faktorski dizajn doda zvezdasti dizajn (slika 12c). Ukupan broj eksperimenata sa k varijabli je $2^k + 2k + C$. Prvi deo jednačine se odnosi na pun faktorski dizajn, drugi deo na zvezdasti dizajn, a treći je broj ponavljanja u centralnoj tački. Dužina grana u zvezdastom dizajnu (α) određuje izgled centralnog kompozicionog dizajna, a vrednost α zavisi od broja varijabli i može se izračunati kao $\alpha = 2^{N/4}$, gde je N broj varijabli [51].

Izbor faktorskih nivoa je izuzetno važan momenat u eksperimentu. Suviše uzan opseg može dati rezultat da je efekat faktora zanemarljiv na odgovor sistema. Sa druge strane, suviše širok opseg faktorskih nivoa može dovesti do toga da se optimalni nivo faktora potpuno promaši ili da se ispituje oblast suviše udaljena od oblasti optimalnih uslova.

1.3.2.2. Frakcioni faktorski dizajn

Frakcioni faktorski dizajn se koristi u *screening* fazi eksperimenta kada treba ispitati veći broj faktora koji mogu imati statistički značajan uticaj na posmatrani sistem. Kako puni faktorski dizajn zahteva izvođenje većeg broja eksperimenata (što često ne znači i veći broj značajnih informacija), frakcioni dizajn se nameće kao dobar kompromis između broja

eksperimenata i dobijenih informacija, uz uštedu vremena i resursa [44]. Ova vrsta eksperimentalnog dizajna se zasniva na pretpostavci da su uticaji interakcija između tri ili više faktora zanemarljivi u odnosu na uticaje samih faktora i interakcija dva faktora. Na osnovu toga se iz eksperimentalnog plana punog faktorskog dizajna izostavljaju određene kombinacije faktora, čime se smanjuje ukupan broj eksperimenata koje je potrebno izvesti. Broj eksperimenata koji se izvodi je dat jednačinom 2^{k-p} , gde je k broj faktora koji se ispituju, a p ceo broj koji ukazuje na koji način će eksperimentalni dizajn biti frakcionisan [46, 53]. Kako se ceo eksperimentalni domen ne može istražiti ograničenim brojem eksperimenata, eksperimenti se biraju na taj način da se pokrije što veća ispitivana površina. Plan eksperimenata frakcionog faktorskog dizajna 2^{4-1} , za ispitivanje uticaja četiri faktora predstavljen je u tabeli 4.

Tabela 4. Frakcioni faktorski dizajn 2^{4-1}

Redni broj eksperimenta	Faktori			
	X_1	X_2	X_3	X_4
1.	-1	-1	-1	-1
2.	+1	-1	-1	+1
3.	-1	+1	-1	+1
4.	+1	+1	-1	-1
5.	-1	-1	+1	+1
6.	+1	-1	+1	-1
7.	-1	+1	+1	-1
8.	+1	+1	+1	+1

Ponavljanje eksperimenata u centralnoj tački i izvođenje randomiziranim redosledom omogućava preciznu procenu eksperimentalne greške. Statistička značajnost svakog ispitivanog faktora određuje se primenom *Student*-ovog *t*-testa (za verovatnoću od 95%, $p = 0.05$). Izračunata *t*-vrednost za svaki od faktora upoređuje se sa kritičnom *t*-vrednošću izračunatom na osnovu zadatog nivoa značajnosti i broja stepeni slobode. Faktori čija je izračunata *t*-vrednost veća od kritične *t*-vrednosti se smatraju statistički značajnim. Grafički rezultati se mogu prikazati i u vidu *Pareto* dijagrama [52, 53].

1.3.2.3. Metodologija površine odgovora

Pun faktorski dizajn na tri nivoa, centralni kompozicioni, *Box–Behnken*-ov i *Doehlert*-ov dizajn spadaju u dizajne površine odgovora i omogućavaju uspostavljanje kvadratne funkcionalne zavisnosti između faktora i odgovora. Ovi dizajni ispituju faktore na tri nivoa (ne računajući centralnu tačku), jer je to minimalan broj tačaka potreban za procenu kvadratnog modela. Kada se ispituje uticaj promene dva faktora na odgovor sistema uspostavljanjem kvadratne zavisnosti dobija se površina odgovora (eng. *response surface*).

Po definiciji, metodologija površine odgovora je skup statističkih i matematičkih tehnika koje se koriste za optimizaciju procesa [54] i uključuje sledeće faze: izbor faktora od značaja koji će se ispitivati, izbor odgovarajućeg eksperimentalnog dizajna i sprovođenje eksperimenta, matematičko-statistička obrada dobijenih podataka, grafički prikaz i dobijanje optimalnih vrednosti za svaki ispitivani faktor [55, 56].

Površina odgovora predstavlja geometrijsku prezentaciju odgovora sistema, u okviru eksperimentalnog regiona, u funkciji jednog ili više faktora. Efekat dva faktora može biti prikazan kao površina u trodimenzionalnom prostoru, zahvaljujući čemu je moguće ispitati uticaj na odgovor sistema, a u cilju pronalaženja optimalnih uslova.

1.4. STUDIJE FORSIRANE DEGRADACIJE

Svrha ispitivanja stabilnosti je pribavljanje dokaza o promeni kvaliteta farmaceutski aktivne supstance ili farmaceutskog doziranog oblika tokom vremena, a usled uticaja temperature, vlažnosti vazduha i svetlosti. Na osnovu ovih dokaza određiće se period retestiranja farmaceutski aktivne supstance ili rok trajanja farmaceutskog doziranog oblika i dati preporuke za uslove čuvanja [57]. Studije stabilnosti mogu biti: dugoročna (eng. *long-term*), srednja (eng. *intermediate*) i ubrzana (eng. *accelerated*) ispitivanja stabilnosti i stres studije (forsirana degradacija) [57–59].

Studije forsirane degradacije se izvode sa ciljem definisanja suštinske stabilnosti aktivne supstance (čime se olakšava razvoj formulacije leka, proizvodnja i pakovanje), identifikacije potencijalnih degradacionih proizvoda i mogućih puteva degradacije leka, kao i razvoja i validacije metode za praćenje stabilnosti farmaceutski aktivne supstance ili farmaceutskog doziranog oblika [60].

Osim ICH regulative [57, 58], dodatne preporuke za sprovođenje studija forsirane degradacije u pogledu eksperimentalnih uslova date su u uputstvima i priručnicima [60, 61]. Uzorci se tokom ispitivanja izlažu ekstremnim uslovima koji uključuju rastvore jakih neorganskih kiselina i baza (u cilju procene eventualne hidrolitičke razgradnje), oksidaciona sredstva, povišenu vlagu i temperaturu i ozračavanje uzoraka UV svetlošću. Ono što prethodi eksperimentu je analiza hemijske strukture ispitivane supstance, odnosno funkcionalnih grupa unutar nje. Tako se za estre, amide ili laktone može očekivati da lako podležu hidrolizi. Funkcionalne grupe koje sadrže heteroatom (azot, sumpor), aldehidi i ketoni su osetljivi na oksidaciju. Alkeni, aromatični i heterociklični derivati su fotosenzitivni [62]. Neki od preporučenih eksperimentalnih uslova za izvođenje studija forsirane degradacije na farmaceutski aktivnoj supstanci dati su u tabeli 5 [61].

Tabela 5. Eksperimentalni uslovi za izvođenje studija forsirane degradacije

Tip stres studije	Eksperimentalni uslovi	Vreme trajanja
Kisela hidroliza	0.1–1.0 M HCl, od 25 °C do 70 °C	1–7 dana
Bazna hidroliza	0.1–1.0 M NaOH, od 25 °C do 70 °C	1–7 dana
Termalna hidroliza	vodeni rastvor, 70 °C	1–7 dana
Oksidacija	od 0.3% do 3% H ₂ O ₂ , 25 °C	1–7 dana
Foto-degradacija	>1,2 milion lux sati, UV>200 Wh/m ²	>2x ICH ¹
Temperatura	70 °C	do 14 dana
Temperatura/Vlažnost	70 °C/75% rel. vlage	do 14 dana

¹ ICH Q1B [58]

Uobičajeno se eksperimenti izvode pri koncentraciji farmaceutski aktivne supstance od 1 mg/ml, a paralelno sa uzorkom stres uslovima treba podvrgnuti i slepu probu (sadrži rastvarač i stres agens).

Studije forsirane degradacije potrebno je sprovesti i na farmaceutskom doziranom obliku, zbog moguće interakcije sa nekim od ekscipijenasa. Stres uslovi koji se u tom slučaju preporučuju su delovanje temperature, vlažnosti i foto-degradacije, u vremenu trajanja koje može biti i duplo duže od onog za farmaceutski aktivnu supstancu. Na taj način će se utvrditi i poreklo eventualnog degradacionog proizvoda, odnosno da li je on posledica nestabilnosti farmaceutski aktivne supstance ili interakcije sa ekscipijensima. Eksperimentalni uslovi moraju biti takvi da se ostvari degradacija farmaceutski aktivne supstance od 5–20%, što se smatra značajnom i reprezentativnom degradacijom [60, 63]. Zavisno od količine u kojoj nastaju, pojedinačni degradacioni proizvodi koji se dobiju tokom studija dele se na značajne (ključne) i one koji to nisu, a prema kriterijumima datim u tabeli 6 [60].

Tabela 6. Kriterijumi za odabir ključnih degradacionih proizvoda

	Preklinička ispitivanja faza 2		Registracija faza 2	
	FAS ¹	FDO ²	FAS ¹	FDO ²
% degradacionog proizvoda u odnosu na najveći degradacioni proizvod	25%	10%	10%	10%
% degradacionog proizvoda u odnosu na ukupnu degradaciju	10%	10%	10%	10%

¹ farmaceutski aktivna supstanca, ² farmaceutski dozirani oblik

Jedan od ciljeva studija forsirane degradacije je i razvoj metode koja se koristi za praćenje stabilnosti farmaceutskog proizvoda (eng. *stability-indicating method*). To je analitička metoda koja precizno kvantifikuje aktivnu komponentu u prisustvu potencijalnih degradacionih proizvoda, nečistoća iz procesa sinteze ili ekscipijenasa. Ovom metodom se mogu precizno kvantifikovati i sami degradacioni proizvodi [60].

Stability-indicating metode su najčešće zasnovane na primeni tečne hromatografije sa PDA detektorom (eng. *photodiode-array*), pomoću koga se može detektovati koeluiranje više degradacionih proizvoda ispitivanjem čistoće pika (eng. *peak purity*) i razlikovati degradacioni proizvodi istog retencionog vremena snimanjem njihovih spektara [64–66].

Danas je primena tačne hromatografije proširena i na njenu spregu sa masenom spektroskopijom (HPLC/MS ili HPLC/MS/MS), čime se omogućava brza, sigurna i potpuna karakterizacija degradacionih proizvoda sa ciljem da se predvide mogući putevi degradacije leka [67–70].

2. CILJ RADA

- Razvoj i optimizacija HPLC/UV i HPLC/MS metoda za određivanje torasemida i njegovih nečistoća primenom *screening* i optimizacionih vrsta eksperimentalnog dizajna.
- Validacija predloženih HPLC/UV i HPLC/MS metoda i potvrda njihove primenljivosti za određivanje sadržaja torasemida i njegovih nečistoća u torasemid tabletama.
- Sprovođenje studije forsirane degradacije i ispitivanje stabilnosti torasemida pri različitim ekstremnim uslovima (pH, temperatura, svetlost, oksidacija) prema preporukama *ICH* regulative.
- Identifikacija nastalih degradacionih proizvoda torasemida primenom HPLC metode sa UV i masenom detekcijom.
- Definisanje puteva degradacije torasemida.
- Razvoj i optimizacija *stability-indicating* metode za razdvajanje torasemida i svih njegovih potencijalnih degradacionih proizvoda.
- Validacija predložene *stability-indicating* metode u cilju potvrde njene primenljivosti.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. APARATI I PRIBOR

3.1.1. Tečni hromatograf sa masenim detektorom: *Agilent 1100 LC/MSD*

(Agilent Technologies, Nemačka)

Binarna pumpa: G1312A

Degaser: Agilent 1100

Autosampler: G1330B

Termostat za kolonu: G1316A

Detektor: PDA G1315B, maseni analizator 1946D

Integracija: *Chemstation* softver

Kolona: Zorbax SB C₁₈, 250 x 4.6 mm, 5 μm

3.1.2. Maseni spektrometar: *LCQ Advantage* spregnut sa tečnim hromatografom

Surveyor (Thermo Fischer Scientific, SAD)

Kvaternarna pumpa: Thermo

Autosampler: Thermo

Termostat za kolonu: Thermo

Detektori: PDA, *LCQ Advantage* jonski trap

Integracija: *Xcalibur*® 1.3 softver

Kolona: Zorbax SB C₁₈, 250 x 4.6 mm, 5 μm

3.1.3. Statistički programi

Statistica 8.0 (StatSoft, SAD)

Design-Expert 7.0 softver (*StatEase, SAD*)

Excel 2003 (Microsoft, SAD)

3.1.4. Ostala oprema i pribor

Elektronska analitička vaga: *Mettler*, tip XP-205 DR (*Mettler-Toledo AG, Švajcarska*)

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

Komora za ispitivanje fotostabilnosti: *Sanyo PSC022.AHA.C (Sanyo Gallenkamp PLC, Engleska)*

Inkubator: *StabiliTherm EB1-53 (Thermo Electron Industries, Francuska)*

Sistem za prečišćavanje vode: *EasyPure RF (Barnstead, SAD)*

Ultrazvučno kupatilo: *USK 12 (EI Niš, Srbija)*

Sistem za filtriranje mobilne faze: *Millipore Nylon Membrane, 0.45 µm (Millipore, Irska)*

Sistem za filtriranje uzoraka: *Millex Syringe Driven Filter Unit, Nylon Membrane, 0.45 µm (Millipore, SAD)*

3.1.5. Rastvarači i reagensi

Acetonitril, *gradient grade (Merck, Nemačka)*

Metanol, *gradient grade (Merck, Nemačka)*

Amonijum formijat, *HPLC grade (Fluka, Nemačka)*

Mravlja kiselina, *HPLC grade (Merck, Nemačka)*

Amonijum acetat, *HPLC grade (Merck, Nemačka)*

Sirćetna kiselina, *HPLC grade (Merck, Nemačka)*

Hlorovodonična kiselina 1 M, p.a. (*Merck, Nemačka*)

Natrijum hidroksid 1 M, p.a. (*Merck, Nemačka*)

Vodonik peroksid (*Lach Ner, Češka Republika*)

Voda, *HPLC grade*

3.1.6. Standardne supstance i farmaceutski dozirani oblik

Torasemid, radni standard (*Pliva, Hrvatska*)

Nečistoća R2, radni standard (*Pliva, Hrvatska*)

Nečistoća R3, radni standard (*Pliva, Hrvatska*)

Nečistoća R4, radni standard (*Pliva, Hrvatska*)

Nečistoća R6, radni standard (*Pliva, Hrvatska*)

Diuver® tablete (*Pliva, Hrvatska*), jedna tableta sadrži 10 mg torasemida

3.1.7. Komponente placeba

U sastav Diuver® tableta ulaze sledeći ekscipijensi (u zagradi su navedeni proizvođači ekscipijensa korišćenih u ovom istraživanju):

Laktoza monihidrat (*Zorka*, Srbija)

Kukuruzni skrob (*Roquette*, Francuska)

Natrijum skrob glikolat (*Merck*, Nemačka)

Silicijum dioksid, koloidni (*Degussa*, Nemačka)

Magnezijum stearat (*Merck*, Nemačka)

3.2. PRIPREMA RASTVORA ZA RAZVOJ I OPTIMIZACIJU HPLC METODA ZA ODREĐIVANJE TORASEMIDA I NEČISTOĆA

3.2.1. Priprema mobilnih faza

Mobilne faze korišćene u razvoju i optimizaciji metoda pripremane su prema planu eksperimenata, za frakcioni faktorski dizajn i puni faktorski dizajn na tri nivoa.

Amonijum formijat, 10 mM pripreman je rastvaranjem 630 mg supstance u 1 liter (l) vode. Vrednosti pH pufera (2.0, 2.5 i 3.0) podešavane su mravljom kiselinom.

Acetonitril i pufer (ili voda) su mešani prema planu eksperimenata u sledećim zapreminskim odnosima: 20:80 i 60:40.

Pripremljene mobilne faze su pre upotrebe profiltrirane kroz membranski filter (0.45 µm).

3.2.2. Priprema osnovnih rastvora standardnih supstanci

Osnovni rastvori torasemida i nečistoća R2, R3, R4 i R6 pripremani su pojedinačno tačnim odmeravanjem svake od supstanci.

Za pripremu osnovnog rastvora torasemida odmeri se 10 mg standardne supstance torasemida u odmernom sudu od 10 ml, rastvori u smeši acetonitrila i vode (50:50, v/v) i odmerni sud dopuni do propisane zapremine. Radna koncentracija torasemida je 1 mg/ml. Za pripremu osnovnih rastvora nečistoća R2, R3, R4 i R6 tačno se odmeri po 10 mg svake od njih u odmernim sudovima od po 100 ml, rastvori u smeši acetonitrila i vode (50:50, v/v)

i odmerni sud dopuni do propisane zapremine. Radna koncentracija svake od nečistoća je 0.1 mg/ml.

3.2.3. Priprema radnog rastvora standardnih supstanci za razvoj i optimizaciju metoda

Radni rastvor za razvoj i optimizaciju metoda pripremljen je pipetiranjem po 1 ml osnovnog rastvora torasemida i po 0.1 ml osnovnog rastvora svake od nečistoća u odmernom sudu od 10 ml, a odmerni sud je zatim dopunjen do propisane zapremine smešom acetonitril–10 mM amonijum formijat pH 2.5 (50:50, v/v). Radna koncentracija torasemida je 0.1 mg/ml, a nečistoća R2, R3, R4 i R6 0.001 mg/ml.

3.3. PRIPREMA RASTVORA ZA VALIDACIJU HPLC/UV i HPLC/MS METODA

Osnovni rastvori standardnih supstanci korišćenih za validaciju metoda pripremani su na isti način kao osnovni standardni rastvori za razvoj i optimizaciju metoda. Dodatno, od pojedinačnih osnovnih rastvora nečistoća (koncentracija 0.1 mg/ml) pripremljen je i *mix* rastvor nečistoća: po 1 ml svake od nečistoća iz osnovnih rastvora odpipetira se u odmerni sud od 100 ml i dopuni smešom acetonitrila i vode (50:50, v/v), dajući radne koncentracije 0.001 mg/ml. Radni standardni rastvori za validaciju metoda pripremani su neposredno pre upotrebe, razblaživanjem osnovnih standardnih rastvora i *mix* rastvora nečistoća sa smešom acetonitril–10 mM amonijum formijat pH 2.5 (50:50, v/v).

3.3.1. Priprema mobilne faze

Amonijum formijat, koncentracije 10 mM pripreman je rastvaranjem 630 mg supstance u 1 litar vode. Vrednost pH 2.5 podešena je sa mravljom kiselinom (mobilna faza A). Organski deo mobilne faze činio je acetonitril (mobilna faza B). Pripremljene mobilne faze su pre upotrebe profiltrirane kroz membranski filter (0.45 µm).

3.3.2. Priprema rastvora za ispitivanje selektivnosti metoda

Za procenu selektivnosti predloženih metoda pripremljena je smeša koja je sadržala komponente placeba (ekscipijense) u odnosu u kome su zastupljeni u tabletama. Rastvor placeba je pripremljen tačnim odmeravanjem 150 mg placeba u odmernom sudu od 50 ml. U odmerni sud je dodato oko 35 ml smeše acetonitrila i vode (50:50, v/v), rastvor je tretiran 15 minuta na ultrasoničnom kupatilu, nakon čega je dopunjen do propisane zapremine i profiltriran kroz membranski filter (0.45 μm). Za HPLC/UV metodu, 5 ml ovog rastvora je dalje razblaženo u odmernom sudu od 10 ml sa smešom acetonitril–10 mM amonijum formijat pH 2.5 (50:50, v/v). Dobijeni rastvor je sa istom smešom razblažen još 10 puta, za ispitivanje selektivnosti HPLC/MS metodom.

Radni rastvor standardnih supstanci za ispitivanje selektivnosti HPLC/UV metodom sadržavao je torasemid u koncentraciji 0.1 mg/ml, a nečistoće u koncentraciji 0.001 mg/ml. Za HPLC/MS metodu radni rastvor je razblažen još 10 puta, sa smešom acetonitril–10 mM amonijum formijat pH 2.5 (50:50, v/v).

3.3.3. Priprema rastvora za ispitivanje linearnosti metoda

Radni rastvori za ispitivanje linearnosti su pripremljeni u sedam odmernih sudova od po 10 ml. U prva tri odmerna suda odpipetirano je po 0.7, 0.8 i 0.9 ml osnovnog rastvora torasemida i 1.0, 2.0 i 5.0 ml *mix* rastvora nečistoća. U preostala četiri odmerna suda odpipetirano je po 1.0, 1.1, 1.2 i 1.3 ml osnovnog rastvora torasemida i 0.1, 0.2, 0.5 i 1.0 ml osnovnog rastvora nečistoća. Svi odmerni sudovi su dopunjeni do propisane zapremine smešom acetonitril–10 mM amonijum formijat pH 2.5 (50:50, v/v). Tako pripremljeni rastvori za ispitivanje linearnosti HPLC/UV metodom imali su koncentracije:

- 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130 $\mu\text{g/ml}$ za torasemid
- 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 $\mu\text{g/ml}$ za nečistoće R2, R3, R4 i R6

Za ispitivanje linearnosti HPLC/MS metodom dobijeni rastvori su dalje razblaživani smešom acetonitril–10 mM amonijum formijat pH 2.5 (50:50, v/v) do koncentracija:

- 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3 $\mu\text{g/ml}$ za torasemid
- 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 $\mu\text{g/ml}$ za nečistoće R2, R3, R4 i R6

3.3.4. Priprema rastvora za ispitivanje preciznosti i tačnosti metoda

Radni rastvori za ispitivanje preciznosti i tačnosti su pripremljeni u tri odmerni suda od po 10 ml. U prvi je odpipetirano 0.7 ml osnovnog rastvora torasemida i 1.0 ml *mix* rastvora nečistoća. U drugi i treći je odpipetirano po 1.0 ml osnovnog rastvora torasemida i 0.1 ml osnovnog rastvora nečistoća, odnosno po 1.3 ml osnovnog rastvora torasemida i 1.0 ml osnovnog rastvora nečistoća. U svaki odmerni sud je dodato po 15 mg placeba (što odgovara odnosu komponenti u tabletama), sud je tretiran na ultrasoničnom kupatilu tokom 15 minuta i nakon toga dopunjen do oznake smešom acetonitril–10 mM amonijum formijat pH 2.5 (50:50, v/v) i filtriran kroz membranski filter (0.45 µm). Tako dobijeni rastvori za ispitivanje preciznosti i tačnosti HPLC/UV metodom su imali koncentracije:

- 70, 100, 130 µg/ml za torasemid
- 0.1, 1.0, 10.0 µg/ml za nečistoće R2, R3, R4 i R6

Za ispitivanje preciznosti i tačnosti HPLC/MS metodom dobijeni rastvori su dalje razblaživani smešom acetonitril–10 mM amonijum formijat pH 2.5 (50:50, v/v) do koncentracija:

- 0.7, 1.0, 1.3 µg/ml za torasemid
- 0.01, 0.1, 1.0 µg/ml za nečistoće R2, R3, R4 i R6

Za svaki koncentracioni nivo napravljena su po tri rastvora.

3.3.5. Priprema rastvora za ispitivanje limita detekcije i kvantifikacije

Radni rastvori za ispitivanje limita detekcije i limita kvantifikacije HPLC/UV metodom pripremani razblaživanjem sa smešom acetonitril–10 mM amonijum formijat pH 2.5 (50:50, v/v) imali su koncentracije:

- 0.03, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 µg/ml za torasemid
- 0.02, 0.03, 0.06, 0.1, 0.2 µg/ml za nečistoće R2, R3, R4 i R6

odnosno, za HPLC/MS metodu:

- 0.0002, 0.0006, 0.001, 0.002, 0.005 µg/ml za torasemid
- 0.0002, 0.0004, 0.0006, 0.0012, 0.0025 µg/ml za nečistoće R2, R3, R4 i R6

3.3.6. Priprema mobilnih faza za ispitivanje robustnosti

9 mM rastvor amonijum formijata pripremljen je rastvaranjem 570 mg supstance u 1 litar vode. Vrednost pH 2.5 podešena je sa mravljom kiselinom (mobilna faza A). Acetonitril je činio mobilnu fazu B.

11 mM rastvor amonijum formijata pripremljen je rastvaranjem 700 mg supstance u 1 litar vode. Vrednost pH 2.5 podešena je sa mravljom kiselinom (mobilna faza A). Acetonitril je činio mobilnu fazu B.

10 mM rastvor amonijum formijata, pH vrednosti 2.3 dobijen je podešavanjem pH rastvora sa mravljom kiselinom (mobilna faza A). Organski deo mobilne faze činio je acetonitril (mobilna faza B).

10 mM rastvor amonijum formijata, pH vrednosti 2.7 dobijen je podešavanjem pH rastvora sa mravljom kiselinom (mobilna faza A). Organski deo mobilne faze činio je acetonitril (mobilna faza B).

Pripremljene mobilne faze su pre upotrebe profiltrirane kroz membranski filter (0.45 μm).

3.3.7. Priprema rastvora uzorka

Rastvori tableta za ispitivanje pripremani su u triplikatu neposredno pre upotrebe.

Na analitičkoj vagi je odmereno 10 tableta i izračunata je prosečna masa tablete (oko 150 mg). Tablete su sprasene u tarioniku, a tabletna masa je homogenizovana mešanjem. Na analitičkoj vagi je tačno odmerena količina tabletne mase koja odgovara jednoj prosečnoj masi tablete i kvantitativno prenetu u odmerni sud od 50 ml. U sud je dodato oko 35 ml smeše acetonitrila i vode (50:50, v/v), rastvor je tretiran 15 minuta na ultrasoničnom kupatilu, nakon čega je dopunjen do propisane zapremine i profiltriran kroz membranski filter (0.45 μm).

Za HPLC/UV metodu, 5 ml ovog rastvora je dalje razblaženo u odmernom sudu od 10 ml sa smešom acetonitril–10 mM amonijum formijat pH 2.5 (50:50, v/v) dajući očekivanu koncentraciju torasemida 0.1 mg/ml.

Za ispitivanje uzorka HPLC/MS metodom dobijeni rastvor je dalje razblaživan smešom acetonitril–10 mmol/l amonijum formijat pH 2.5 (50:50, v/v):

- 10 puta za ispitivanje stepena čistoće (očekivana koncentracija torasemida 0.01 mg/ml)
- 100 puta za određivanje torasemida (očekivana koncentracija torasemida 1 µg/ml)

3.4. PRIPREMA RASTVORA ZA STUDIJU FORSIRANE DEGRADACIJE

3.4.1. Priprema rastvora stres agenasa

Stres agensi koji su korišćeni u studiji forsirane degradacije su hlorovodonična kiselina, natrijum hidroksid i vodonik peroksid.

Od komercijalno dostupnih i pripremljenih rastvora 1 M hlorovodonične kiseline i 1 M natrijum hidroksida razblaživanjem sa prečišćenom vodom napravljeni su rastvori 0.1, 0.5 i 1.0 M.

Rastvori vodonik peroksida 3% i 10% dobijeni su razblaživanjem 30% rastvora vodonik peroksida prečišćenom vodom.

3.4.2. Priprema uzoraka za studiju forsirane degradacije

Osnovni rastvor torasemida pripremljen je rastvaranjem 10 mg supstance u odmernom sudu od 10 ml sa smešom acetonitrila i vode (50:50, v/v) dajući koncentraciju torasemida od 1 mg/ml.

Rastvori za ispitivanje stabilnosti torasemida u uslovima kisele, bazne i neutralne hidrolize dobijeni su mešanjem 1 ml osnovnog rastvora torasemida sa 1 ml:

- 0.1, 0.5 i 1.0 M hlorovodonične kiseline
- 0.1, 0.5 i 1.0 M natrijum hidroksida
- destilovane vode

Rastvori podvrgnuti kiseloj i baznoj hidrolizi su pre izvođenja hromatografske analize neutralisani, a zatim kao i uzorak podvrgnut neutralnoj hidrolizi razblaženi smešom acetonitril–10 mM amonijum formijat pH 2.5 (50:50, v/v) do finalnih koncentracija torasemida: 0.1 mg/ml za HPLC/UV analizu i 0.01 mg/ml za HPLC/MS analizu.

Rastvori podvrgnuti oksidativnoj stres studiji dobijeni su mešanjem 1 ml osnovnog rastvora torasemida sa 1 ml:

- 3% i 10% vodonik peroksida

Nakon vremena predviđenog za oksidativnu stres studiju, dalja priprema ovih rastvora (razblaženja i finalne koncentracije torasemida) je ista kao i za uzorke podvrgnute hidrolizi.

Ispitivanja fotodegradacije (>1.2 milion lux sati, $UV > 200 \text{ Wh/m}^2$) i termodegradacije ($70 \text{ }^\circ\text{C}$) vršena su na farmaceutskoj aktivnoj supstanci, farmaceutskoj aktivnoj supstanci u rastvoru (osnovni rastvor torasemida, koncentracije 1 mg/ml) i farmaceutskom doziranom obliku (torasemid tablete). Nakon izlaganja uslovima eksperimenta, farmaceutski aktivna supstanca i tablete torasemida su dalje pripremane za hromatografsku analizu na već opisan način za pripremu rastvora standardnih supstanci, odnosno uzorka, do finalnih koncentracija torasemida: 0.1 mg/ml za HPLC/UV analizu i 0.01 mg/ml za HPLC/MS analizu.

Uporedo, sa uzorcima podvrgnutim stres studiji, a radi poređenja sa stresiranim uzorcima, postavljeno je i nekoliko kontrolnih uzoraka:

- blank rastvor
- blank rastvor podvrgnut stres studiji na isti način kao i uzorci
- radni standardni rastvor torasemida, koncentracija 0.1 mg/ml za HPLC/UV analizu i 0.01 mg/ml za HPLC/MS analizu (pripremljen neposredno pre upotrebe)
- tamna kontrola (rastvor uzorka čuvan u frižideru i zaštićen od svetlosti), za studiju fotodegradacije
- placebo rastvor (blank rastvor za farmaceutski dozirani oblik)

3.5. PRIPREMA RASTVORA ZA RAZVOJ I OPTIMIZACIJU *STABILITY-INDICATING* METODE

3.5.1. Priprema mobilnih faza

Mobilne faze korišćene u razvoju i optimizaciji *stability-indicating* metode pripremane su prema planu eksperimenata, za frakcioni faktorski dizajn i centralni kompozicioni dizajn.

Amonijum formijat, koncentracija 5 i 10 mM pripreman je rastvaranjem 315 , odnosno 630 mg supstance u 1 litar vode. Vrednosti pH pufera (2.0 , 2.4 , 3.0 , 3.6 i 4.0) podešavane su mravljom kiselinom.

Acetonitril i pufer (ili voda) su mešani prema planu eksperimenata u sledećim zapreminskim odnosima: 30:70, 36.1:63.9, 45:55, 53.9:46.1 i 60:40.

Pripremljene mobilne faze su pre upotrebe profiltrirane kroz membranski filter (0.45 μm).

3.5.2. Priprema radnog rastvora za razvoj i optimizaciju *stability-indicating* metode

Radni rastvor za razvoj i optimizaciju *stability-indicating* metode je sadržavao smešu torasemida i degradacionih proizvoda, a dobijen je mešanjem jednakih zapremina stresiranih uzoraka koji su nastali oksidativnom degradacijom i kiselim hidrolizom (opisano u sekciji 3.4.2.).

3.6. PRIPREMA RASTVORA ZA VALIDACIJU *STABILITY-INDICATING* METODE

Osnovni rastvori standardnih supstanci torasemida i nečistoće R2, korišćenih za validaciju *stability-indicating* metode, pripremani su odmeravanjem po 10 mg torasemida, odnosno nečistoće R2 u odmernim sudovima od 10 ml, rastvoreni u smeši acetonitrila i vode (50:50, v/v), i odmerni sudovi dopunjeni do propisane zapremine. Radna koncentracija osnovnih rastvora je 1 mg/ml. Dodatno, od pojedinačnih osnovnih rastvora pripremljen je i *mix* rastvor torasemida i nečistoće R2: po 1 ml svake od supstanci iz osnovnih rastvora odpipetira se u odmerni sud od 100 ml i dopuni smešom acetonitrila i vode (50:50, v/v) dajući radne koncentracije 0.01 mg/ml. Radni standardni rastvori za validaciju metode pripremani su neposredno pre upotrebe, razblaživanjem osnovnog standardnog rastvora torasemida i *mix* rastvora torasemida i nečistoće R2 sa smešom acetonitril–10 mM amonijum formijat pH 3.2 (37.4:62.6, v/v).

3.6.1. Priprema mobilne faze

Amonijum formijat, 10 mM pripreman je rastvaranjem 630 mg supstance u 1 litar vode. Vrednost pH 3.2 podešena je sa mravljom kiselinom (mobilna faza B). Organski deo mobilne faze činio je acetonitril (mobilna faza A). Pripremljene mobilne faze su pre upotrebe profiltrirane kroz membranski filter (0.45 μm).

3.6.2. Priprema rastvora za ispitivanje selektivnosti *stability-indicating* metode

Za procenu selektivnosti pripremljena je smeša koja je sadržala komponente placeba (ekscipijense) u odnosu u kome su zastupljeni u tabletama. Rastvor placeba je pripremljen tačnim odmeravanjem 150 mg placeba u odmernom sudu od 50 ml. U odmerni sud je dodato oko 35 ml smeše acetonitrila i vode (50:50, v/v), rastvor je tretiran 15 minuta na ultrasoničnom kupatilu i nakon toga je dopunjen do propisane zapremine i profiltriran kroz membranski filter (0.45 μm). Dalje, 5 ml ovog rastvora je razblaženo u odmernom sudu od 10 ml sa smešom acetonitril–10 mM amonijum formijat pH 3.2 (37.4:62.6, v/v).

Radni rastvor standardnih supstanci za ispitivanje selektivnosti sadržavao je torasemid i nečistoću R2 u koncentraciji 0.001 mg/ml, a pripremljen je od *mix* rastvora torasemida i nečistoće R2 razblaženjem sa smešom acetonitril–10 mM amonijum formijat pH 3.2 (37.4:62.6, v/v).

3.6.3. Priprema rastvora za ispitivanje linearnosti *stability-indicating* metode

Radni rastvori za ispitivanje linearnosti su pripremljeni u pet odmernih sudova od po 10 ml. Za određivanje sadržaja torasemida, od osnovnog rastvora torasemida koncentracije 1 mg/ml odpipetirano je po 0.8, 0.9, 1.0, 1.1 i 1.2 ml. Odmerni sudovi od 10 ml su dopunjeni do propisane zapremine smešom acetonitril–10 mM amonijum formijat pH 3.2 (37.4:62.6, v/v). Tako pripremljeni rastvori su imali koncentracije:

- 80, 90, 100, 110, 120 $\mu\text{g/ml}$ torasemida

Za ispitivanje stepena čistoće, od *mix* rastvora torasemida i nečistoće R2 koncentracija 0.01 mg/ml, odpipetirano je po 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 i 1.0 ml u odmerne sudove od 10 ml i dopunjeno do propisane zapremine smešom acetonitril–10 mM amonijum formijat pH 3.2 (37.4:62.6, v/v). Tako pripremljeni rastvori su imali koncentracije:

- 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 $\mu\text{g/ml}$ torasemida i nečistoće R2

3.6.4. Priprema rastvora za ispitivanje preciznosti i tačnosti *stability-indicating* metode

Radni rastvori za ispitivanje preciznosti i tačnosti su pripremljeni u tri odmerne suda od po 10 ml. Od osnovnog rastvora torasemida odpipetirano je po 0.8, 1.0 i 1.2 ml u

odmerne sudove. U svaki je dodato po 15 mg placebo (što odgovara odnosu komponenti u tabletama), sudovi su tretirani na ultrasoničnom kupatilu tokom 15 minuta i nakon toga dopunjeni do oznake smešom acetonitril–10 mM amonijum formijat pH 3.2 (37.4:62.6, v/v) i filtrirani kroz membranski filter (0.45 μm). Tako dobijeni rastvori za ispitivanje preciznosti i tačnosti su imali koncentracije:

- 80, 100, 120 $\mu\text{g/ml}$ torasemida

Od *mix* rastvora torasemida i nečistoće R2, odpipetirano je po 0.1, 0.5 i 1.0 ml u odmerne sudove od 10 ml. U svaki je dodato po 15 mg placebo (što odgovara odnosu komponenti u tabletama), sudovi su tretirani na ultrasoničnom kupatilu tokom 15 minuta i nakon toga dopunjeni do oznake smešom acetonitril–10 mM amonijum formijat pH 3.2 (37.4:62.6, v/v) i filtrirani kroz membranski filter (0.45 μm). Tako dobijeni rastvori za ispitivanje preciznosti i tačnosti su imali koncentracije:

- 0.1, 0.5, 1.0 $\mu\text{g/ml}$ torasemida i nečistoće R2

Za svaki koncentracioni nivo napravljena su po tri rastvora.

3.6.5. Priprema rastvora za ispitivanje limita detekcije i kvantifikacije *stability-indicating* metode

Radni rastvori za ispitivanje limita detekcije i limita kvantifikacije *stability-indicating* metode pripremani razblaživanjem sa smešom acetonitril–10 mM amonijum formijat pH 3.2 (37.4:62.6, v/v) imali su koncentracije:

- 0.02, 0.03, 0.06, 0.1, 0.2 $\mu\text{g/ml}$ torasemida i nečistoće R2

3.6.6. Priprema rastvora uzorka

Rastvori tableta za ispitivanje pripremani su u triplicatu, neposredno pre upotrebe.

Na analitičkoj vagi je odmereno 10 tableta i izračunata je prosečna masa tablete (oko 150 mg). Tablete su sprašene u tarioniku, a tabletna masa je homogenizovana mešanjem. Na analitičkoj vagi je tačno odmerena količina tabletna mase koja odgovara jednoj prosečnoj masi tablete i kvantitativno preneti u odmerni sud od 50 ml. U sud je dodato oko 35 ml smeše acetonitrila i vode (50:50, v/v), rastvor je tretiran 15 minuta na ultrasoničnom kupatilu i nakon toga je dopunjen do propisane zapremine i profiltriran kroz membranski

filter (0.45 μm). Dalje, 5 ml ovog rastvora je razblaženo u odmernom sudu od 10 ml sa smešom acetonitril–10 mM amonijum formijat pH 3.2 (37.4:62.6, v/v) dajući očekivanu koncentraciju torasemida 0.1 mg/ml.

3.7. HROMATOGRAFSKA ANALIZA

3.7.1. Postupak rada

Hromatografski sistem, koji je podešen u skladu sa optimalnim uslovima (navedenim u sekcijama 3.7.2. do 3.7.5.), ispiran je mobilnom fazom do postizanja stabilne bazne linije. Podešenost sistema proverena je ponovljenim injektovanjem radnih standardnih rastvora torasemida i njegovih nečistoća do postizanja ujednačenosti površina hromatografskih pikova, za tri uzastopna injektovanja.

U svrhu identifikacije, vršilo se pojedinačno injektovanje monokomponentnih rastvora torasemida i nečistoća R2, R3, R4 i R6, kao i radnog standardnog rastvora smeše torasemida i nečistoća R2, R3, R4 i R6. Identifikacija pikova je izvršena prema retencionom vremenu i UV spektru na PDA detektoru, odnosno preko karakterističnih molekulskih jona i fragmenata ispitivanih supstanci dobijenih MS analizom.

Injektovanjem svih rastvora u triplikatu i izračunatim srednjim vrednostima površina pikova metodom eksternog standarda (za HPLC/UV i HPLC/MS metode) određeni su: parametri koji karakterišu kalibracione krive, preciznost i tačnost metoda, limiti detekcije i kvantifikacije, određen je sadržaj torasemida i ispitan stepen čistoće iz torasemid tableta.

Za identifikaciju mogućih degradacionih proizvoda nastalih tokom studija forsirane degradacije primenjena je i HPLC/MS/MS analiza.

3.7.2. HPLC/UV analiza

- kolona: Zorbax SB C₁₈, 250 x 4.6 mm, 5 μm
- mobilna faza (A): 10 mM vodeni rastvor amonijum formijata, pH 2.5 podešen sa mravljom kiselinom
- mobilna faza (B): acetonitril
- gradijentni program: 0 minuta B30%, 11.2 minuta B60%, 11.3 minuta B30%, 21.0 minut B30%

- temperatura kolone: 25 °C
- protok: 1 ml/minuti
- talasna dužina detekcije: 290 nm
- rastvarač: acetonitril–10 mM amonijum formijat pH 2.5 (50:50, v/v)
- volumen injiciranja: 30 µl

3.7.3. HPLC/MS analiza

- hromatografski uslovi opisani su u sekciji 3.7.2. (sa volumenom injiciranja od 10 µl)
- jonski izvor: ESI, analiza pozitivnih jona
- maseni analizator: kvadrupol
- protok gasa za sušenje (azot): 12.0 l/minuti
- pritisak gasa za raspršivanje: 60 psig
- temperatura: 350 °C
- napon kapilare: 3000 V
- kvantifikacija torasemida i nečistoća izvršena je tehnikom praćenja odabranog jona (SIM), za protonovane molekulske jone $[M+H]^+$, m/z: 349 (torasemid), 264 (nečistoća R2), 276 (nečistoća R4), 335 (nečistoća R3), 363 (nečistoća R6)

3.7.4. HPLC/MS/MS analiza

- jonski izvor: ESI, analiza pozitivnih jona
- maseni analizator: jonski trap
- temperatura kapilare: 200 °C
- napon kapilare: 4500 V
- protok gasa za sušenje (azot): 20.0 l/minuti
- protok gasa za raspršivanje: 60.0 l/minuti
- volumen injiciranja: 5 µl

3.7.5. HPLC/UV analiza (*stability-indicating* metoda)

- kolona: Zorbax SB C₁₈, 250 x 4.6 mm, 5 μm
- mobilna faza (A): acetonitril, mobilna faza (B): 10 mM vodeni rastvor amonijum formijata, pH 3.2 podešen sa mravljom kiselinom (37.4:62.6, v/v)
- temperatura kolone: 40 °C
- protok: 1 ml/minuti
- talasna dužina detekcije: 290 nm
- rastvarač: acetonitril–10 mM amonijum formijat pH 3.2 (37.4:62.6, v/v)
- volumen injiciranja: 30 μl

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. HEMOMETRIJSKI PRISUP OPTIMIZACIJI METODA ZA ODREĐIVANJE TORASEMIDA I NEČISTOĆA

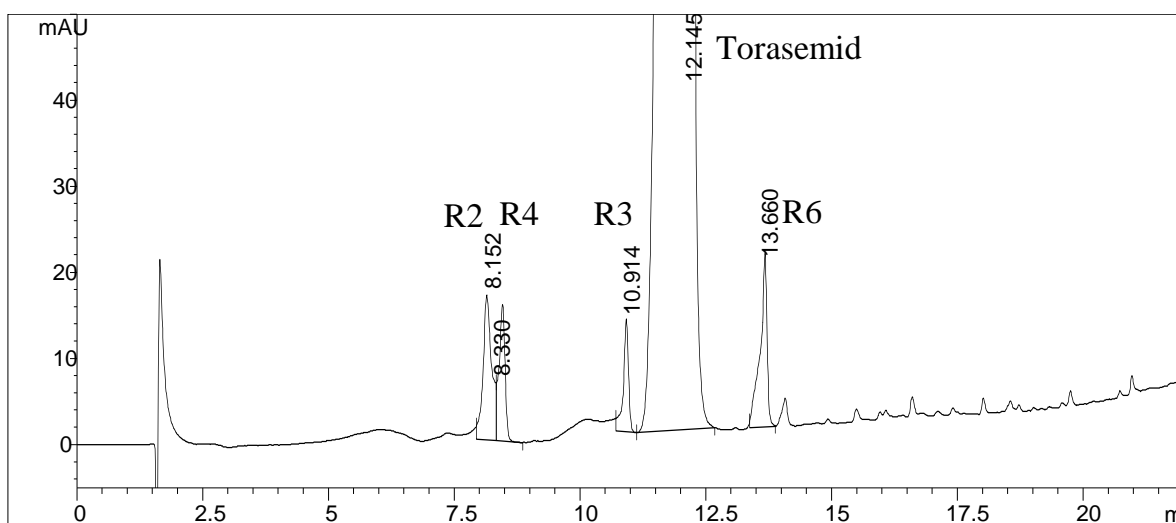
4.1.1. Preliminarna ispitivanja hromatografskih uslova

Tečna hromatografija se primarno zasniva na separacionim mehanizmima analita između stacionarne i mobilne faze, koji su uslovljeni njihovim fizičko–hemijskim osobinama, sastavom i pH vrednošću mobilne faze i prirodom stacionarne faze [71]. Razvoj i optimizacija hromatografske metode zahteva određivanje optimalnih eksperimentalnih uslova koji će omogućiti dobro razdvajanje ispitivanih supstanci i njihovo određivanje, u prihvatljivom vremenu trajanja analize [52]. Preliminarna ispitivanja su prvi korak u zadatku razdvajanja smeše aktivne farmaceutske supstance i nečistoća koje mogu biti prisutne u farmaceutskom doziranom obliku. Ovaj zadatak može biti vrlo zahtevan zbog sličnih osobina i sličnog hromatografskog ponašanja analita, kao i vrlo velike razlike u količini u smešama.

Torasemid i nečistoće R2, R3, R4 i R6 imaju $\log P$ vrednosti 1.97, 1.31, 1.55, 1.70 i 2.52. Shodno lipofilnoj prirodi ispitivanih supstanci, za preliminarna ispitivanja izabrane su nepolarne C_{18} kolone, različitih tipova stacionarnih faza: klasična silika, hibridna stacionarna faza, monolitne kolone (Zorbax Extend, Xterra, Chromolith i Zorbax SB). Zorbax Extend kolone sadrže endkapovanu (eng. *endcapped*) siliku kao stacionarnu fazu i pogodnije su za rad na višim pH vrednostima. Sa druge strane, Xterra kolone sadrže neorganski deo (silika) i organsku komponentu siloksane. Hibridna tehnologija omogućava visoku efikasnost razdvajanja analita i poboljšanu pH stabilnost, u poređenju sa klasičnim silika kolonama. Hromolitna kolona je proizvod novije tehnologije, sa monolitnom strukturom koja doprinosi brzom i efikasnoj separaciji, u oblasti pH 2–7. Kolona omogućava rad sa visokim protocima i malim pritiskom (produžava radni vek trajanja). Zorbax SB je klasična silika kolona izgrađena od sferičnih mikročestica visoke moći razdvajanja. Kolona je kompatibilna za rad sa masenim detektorom i isparljivim mobilnim fazama koje se koriste u HPLC/MS analizi.

Izabrana talasna dužina za sve analite je 290 nm, sve ispitivane supstance dobro apsorbuju na toj talasnoj dužini. Upotrebljeni PDA detektor omogućio je i snimanje spektara analita u svrhu identifikacije i procene čistoće pika na hromatogramu, pošto varijacije u izgledu spektra mogu ukazivati na koeluiranje komponenata smeše.

U izboru organskog rastvarača koji će ući u sastav mobilne faze razmatrani su metanol i acetonitril. Pokazalo se da mobilne faze sa acetonitrilom daju bolju simetriju pika i kraće vreme trajanja analize. Dodatak modifikatora koji će suzbiti jonizaciju ispitivanih supstanci i omogućiti molekulskoj formi da ostvari bolju interakciju sa kolonom je bio neophodan (slika 13). Kako je tokom dalje analize bila planirana i upotreba masenog detektora, to je ispitivanje obuhvatilo modifikatore podesne za masenu analizu (amonijum formijat, amonijum acetat i trifluorsirćetna kiselina, u koncentracijama 5 i 10 mM). Više koncentracije modifikatora nisu istraživane jer se ne preporučuju za rad sa masenim detektorom. Amonijum acetat se pokazao zadovoljavajućim za HPLC/UV analizu, ali je u HPLC/MS analizi ostvarena slaba preciznost metode. Optimalni odnos efikasnosti jonizacije i oblika hromatografskih pikova ostvaren je sa 10 mM amonijum formijata.



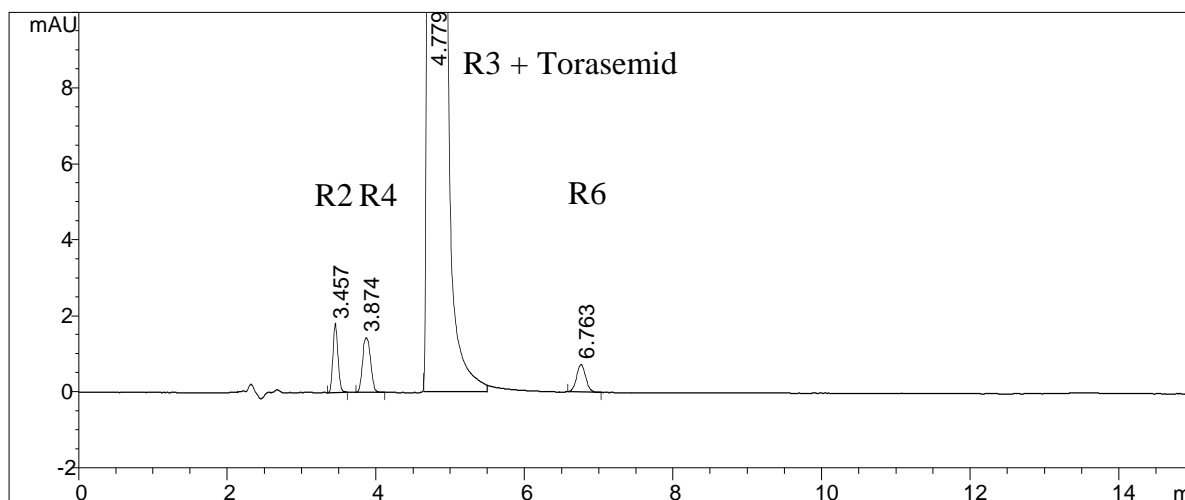
Slika 13. Radni standardni rastvor torasemida i nečistoća na koloni Chromolith (100 x 4.6 mm), mobilna faza bez modifikatora (metanol–voda, pH 3.0), gradijentni program: 0 minuta A0%, 20 minuta A100%

Sve ispitivane supstance su amfoliti sa dve pK_a vrednosti. Prva je ista za sve i potiče od baznih osobina supstanci (4.20), a druga pK_a vrednost potiče od kiselih osobina i razlikuje se među supstancama: za torasemid i nečistoće R3 i R6 iznosi 5.92, za nečistoću R2 9.62 i R4 9.46. Zbog svega toga je bilo očekivano da će pH mobilne faze imati značajan

uticaj na retenciono ponašanje ispitivanih amfolita. Ova pretpostavka je i potvrđena tokom preliminarnog ispitivanja, tokom kojeg su sve mobilne faze sa pH vrednošću većom od 3 isključene iz daljeg istraživanja zbog loše rezolucije između torasemida i nečistoća R3 i R4 (preklapanje pikova).

Povećanje temperature kolone smanjuje viskoznost mobilne faze i povećava energiju molekula analita što za posledicu ima smanjenje retencije, ali i moguću ugroženost faktora separacije analita. Uobičajene temperature u hromatografskoj analizi su do 40 °C, a u okviru preliminarnih ispitivanja temperatura kolone je varirana u opsegu 15–35 °C.

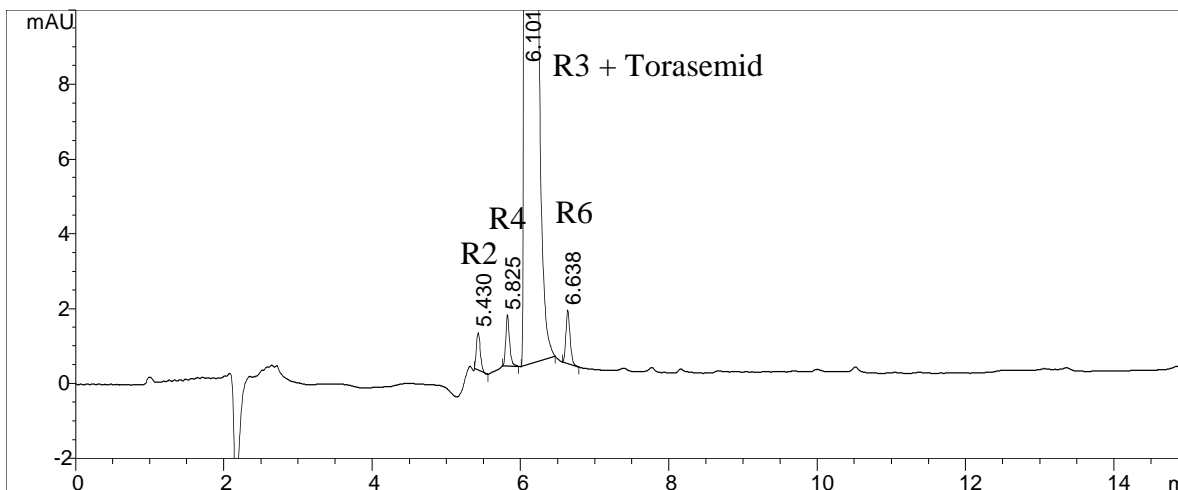
Izokratsko eluiranje se smatra poželjnim u HPLC analizi, ali u smešama aktivne farmaceutske supstance i nečistoća često nije moguće, jer ne daje dobru separaciju između analita ili značajno produžava vreme trajanja analize. Na slici 14 je prikazan radni standardni rastvor torasemida i nečistoća u izokratskom sistemu eluiranja (pik nečistoće R3 se spojio sa pikom torasemida). Iz ovoga je zaključeno da se dobra rezolucija između analita i kratko vreme analize mogu ostvariti upotrebom gradijentnog eluiranja.



Slika 14. Kolona Zorbax SB C₁₈ (250 x 4.6 mm, 5µm), mobilna faza acetonitril–10 mM amonijum acetat, pH 2.5 (40:60, v/v)

Mobilne faze koje su činili acetonitril i 10 mM amonijum formijat, pH 2.5 ispitivane su na kolonama Chromolith, Zorbax Extend i Xterra, u gradijentnom programu. Kolona Chromolith (slika 15) ne omogućava razdvajanje nečistoće R3 od pika aktivne farmaceutske

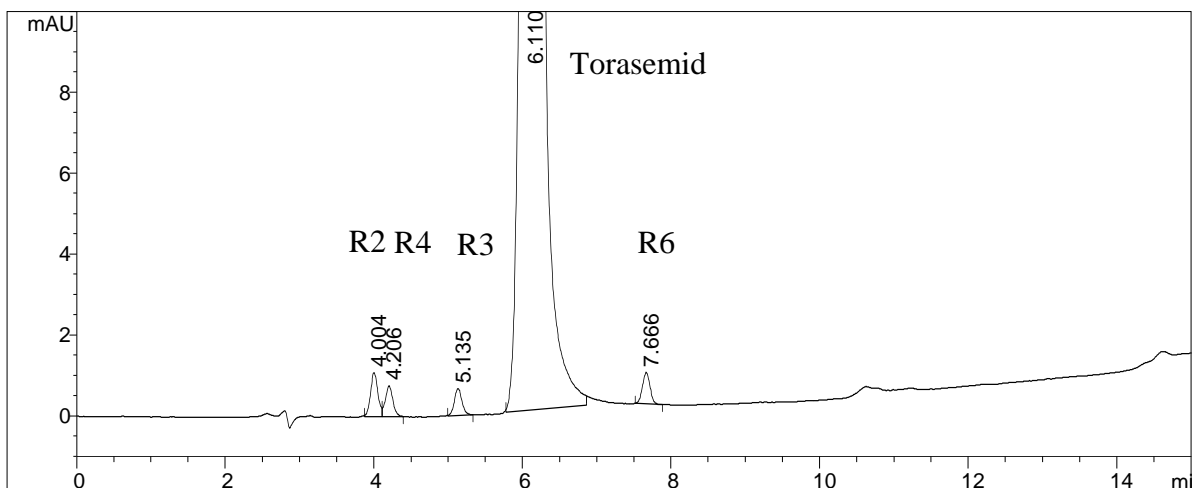
supstance. Takođe, rezolucija između torasemida i nečistoće R6 nije dovoljna imajući u vidu planirana ispitivanja stabilnosti i moguću pojavu novih, degradacionih nečistoća.



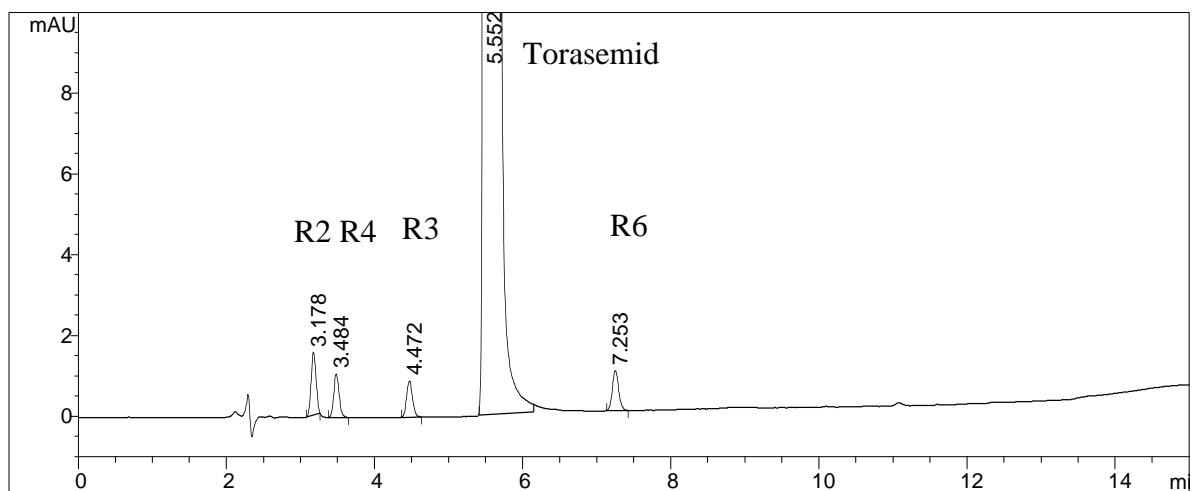
Slika 15. Hromatogram smeše torasemida i nečistoća R2, R3, R4 i R6, kolona Chromolith (100 x 4.6 mm), mobilna faza (A): 10 mM amonijum formijat, pH 2.5, mobilna faza (B): acetonitril, gradijentni program: 0 minuta B30%, 15 minuta B70%

Isti hromatografski uslovi na koloni Xterra ne daju dovoljno dobro razdvajanje nečistoća R2 i R4, koje imaju slično hromatografsko ponašanje i blisko retenciono vreme (slika 16).

Bolje razdvajanje ovih pikova, na baznoj liniji, ostvareno je na koloni Zorbax Extend sa retencionim faktorom za prvi pik 0.8 (slika 17).



Slika 16. Hromatogram smeše torasemida i nečistoća R2, R3, R4 i R6, kolona Xterra (250 x 4.6 mm, 5 μ m), mobilna faza (A): 10 mM amonijum formijat, pH 2.5, mobilna faza (B): acetonitril, gradijentni program: 0 minuta B30%, 15 minuta B70%



Slika 17. Hromatogram smeše torasemida i nečistoća R2, R3, R4 i R6, kolona Zorbax Extend (250 x 4.6 mm, 5 μ m), mobilna faza (A): 10 mM amonijum formijat, pH 2.5, mobilna faza (B): acetonitril, gradijentni program: 0 minuta B30%, 15 minuta B70%

Brzina protoka mobilne faze je takođe značajan faktor od uticaja na razdvajanje ispitivanih supstanci i dužinu trajanja analize. Kod svih hromatografskih uslova koji su ispitivani tokom preliminarne faze, protok od 0.5 ml/minuti se nije pokazao adekvatnim zbog predugog trajanja analize (poslednja komponenta izlazi u 17-om minutu), uprkos

gradijentnom eluiranju. Protok od 1.0 ml/minuti se nametnuo kao optimalan, jer veći protoci od toga osim što smanjuju rezoluciju između nečistoća R2 i R4, nisu ni pogodni za rad sa masenim detektorom.

4.1.2. Preliminarna ispitivanja uslova masene analize

Dve jonizacione tehnike, ESI i APCI, za HPLC/MS analizu torasemida i nečistoća R2, R3, R4 i R6 su bile predmet preliminarnih ispitivanja.

Pregledom literature za određivanje torasemida masenom analizom utvrđeno je da se i ESI i APCI mogu primeniti za analizu pozitivnih i negativnih jona torasemida [16, 17, 19, 20]. S obzirom da se stvaranje pozitivnih jona favorizuje pri kiselim pH vrednostima (koje su razmatrane tokom preliminarnih ispitivanja hromatografskih uslova), u daljem radu su analizirani pozitivni joni. Sa mobilnom fazom koja se sastoji od amonijum formijata (pH podešen mravljom kiselinom) i acetonitrila dolazi do stvaranja $[M+H]^+$ jona i mogućih adukt jona kao što su: $[M+NH_4]^+$, $[M+H+ACN]^+$, $[M+NH_4+ACN]^+$ [18]. Adukt joni slabog intenziteta uočeni su tokom preliminarnih ispitivanja.

Za pronalaženje optimalnih uslova masene analize primenjena je FIA (sa rastvorima torasemida i nečistoća koncentracija 10 $\mu\text{g/ml}$). Optimizovani su parametri: temperatura isparavanja, struja igle, napon kapilare, pritisak gasa za raspršivanje, temperatura i protok gasa za sušenje.

Temperatura isparavanja za APCI je varirana u opsegu od 250 do 450 °C. Maksimalni intenzitet protonovanih molekulskih jona za torasemid i nečistoće R2, R3, R4 i R6 postignut je na 450 °C.

Struja igle je varirana u opsegu od 2 do 10 μA , a optimalna vrednost za sve supstance iznosila je 8 μA . Napon kapilare je ispitivan u oblasti od 2000 do 4000 V, a nešto veća osetljivost je postignuta pri 3000 V.

Protok gasa za sušenje je optimizovan u oblasti od 3 do 9 l/minuti, sa optimalnom vrednošću 6.0 l/minuti. Pritisak gasa za raspršivanje u oblasti od 30 do 60 psig nije imao veći uticaj na odgovor, pa je podešen na 60 psig. Suprotno tome, povećanje temperature gasa imalo je pozitivan uticaj na odgovor svih supstanci, a vrednost od 350 °C je nađena kao idealna (varirana u opsegu od 200 do 350 °C).

Za ESI, uslovi napona kapilare, pritisak gasa za raspršivanje i temperatura gasa za sušenje varirani su u istom opsegu kao i za APCI. Ispitivanja su pokazala da su optimalne vrednosti ovih parametara: 3000 V za napon kapilare, 60 psig za pritisak gasa za raspršivanje i 350 °C za temperaturu gasa za sušenje. Zbog brzine protoka mobilne faze (1 ml/minuti), protok gasa za sušenje podešen je na 12.0 l/minuti.

Tokom preliminarnih ispitivanja, a u svrhu dobijanja maksimalnih kvalitativnih informacija, FIA analizom optimizovan je i napon ubrzanja jona koji će indukovati fragmentaciju prisutnih jona (tabela 7).

I APCI i ESI analiza pozitivnih jona su omogućili stvaranje protonovanih molekulskih jona $[M+H]^+$, na m/z: 349 (torasemid), 264 (nečistoća R2), 276 (nečistoća R4), 335 (nečistoća R3), 363 (nečistoća R6), kao i karakterističnih fragment jona.

Fragmentacija torasemida i nečistoća R3, R4 i R6 dala je između ostalih i fragment jon na m/z 264, što odgovara protonovanom molekulskom jonu nečistoće R2. Dalje, torasemid i nečistoće R3 i R6 imaju isti fragment jon na m/z 290 zahvaljujući sličnoj hemijskoj strukturi. Generalno gledano, više fragment jona ispitivanih supstanci dobijeno je sa APCI, što je važno sa stanovišta identifikacije (sa ESI nečistoća R4 pokazala je slabu fragmentaciju, samo jedan fragment jon je pronađen na m/z 183). Sa druge strane, efikasnost jonizacije sa ESI je bila veća i pogodnija za kvantitativnu primenu.

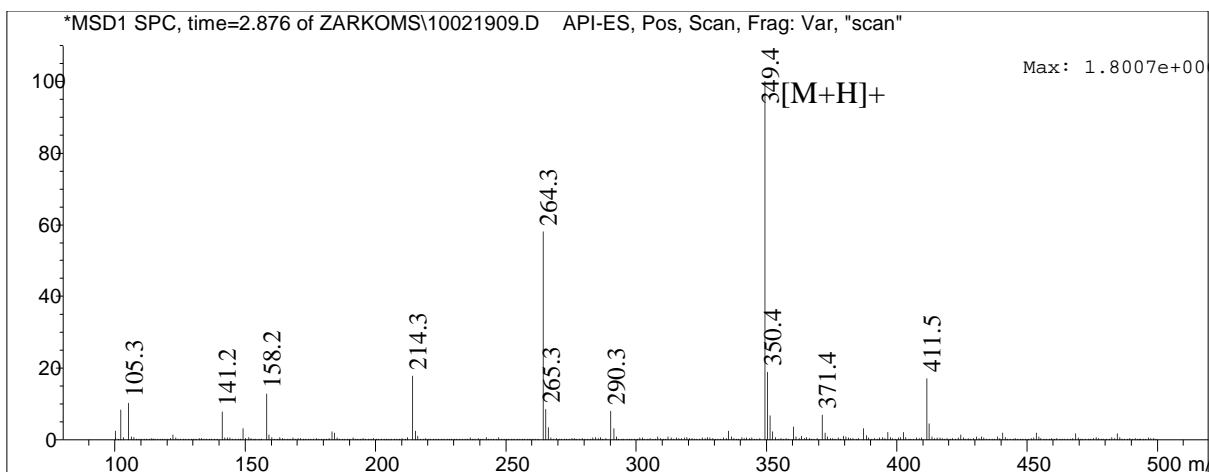
Razmatrajući prednosti i nedostatke, i jedne i druge jonizacione tehnike, za dalju masenu analizu torasemida i nečistoća izabrana je ESI analiza pozitivnih jona (ESI^+). Tehnika praćenja odabranog jona (SIM) korišćena je za kvantifikaciju, a maseni spektri za identifikaciju pikova.

U tabeli 7 predstavljeni su protonovani molekulski joni i fragment joni torasemida i nečistoća dobijeni ESI analizom pozitivnih jona. Maseni spektri su prikazani na slikama 18, 19, 20, 21 i 22.

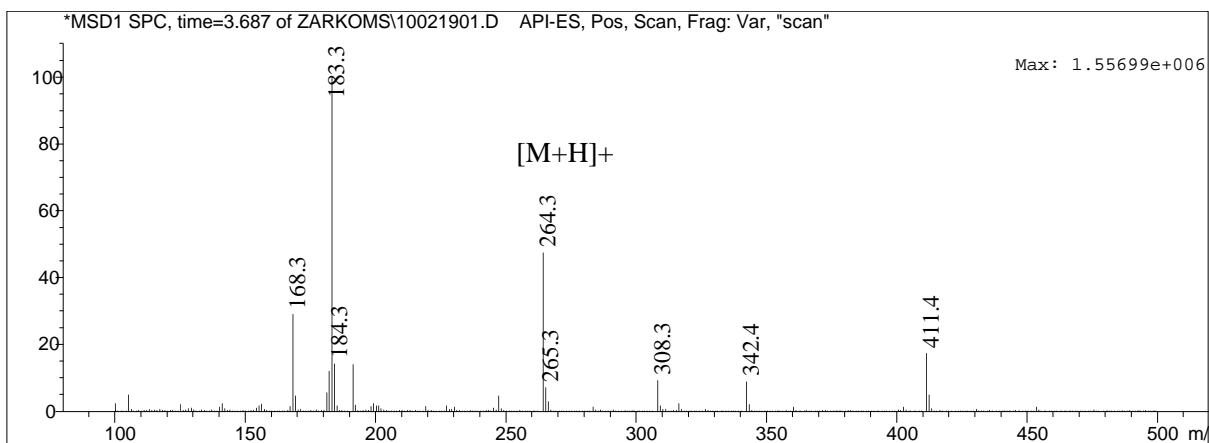
Tabela 7. Protonovani molekularni joni i fragment joni torasemida i nečistoća, ESI⁺ sa optimalnim naponom ubrzanja jona

Supstanca	Molekulska masa	Protonovani molekularni jon, m/z	Fragment joni, m/z	Napon ¹ (V)	Napon ² (V)
R2	263	264	183/168	120	240
R4	275	276	183	160	200
R3	334	335	290/264	70	160
Torasemid	348	349	290/264	70	170
R6	362	363	290/264	100	180

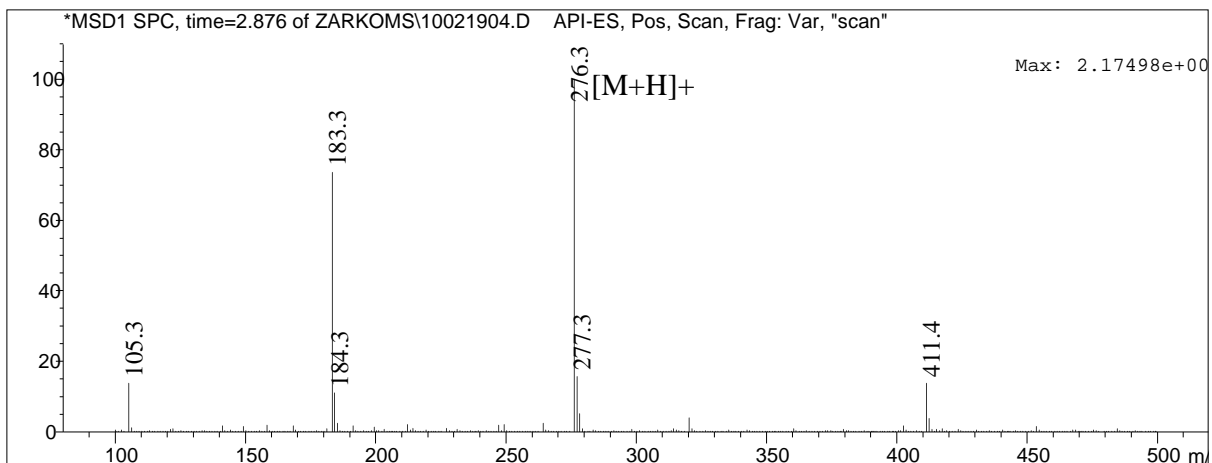
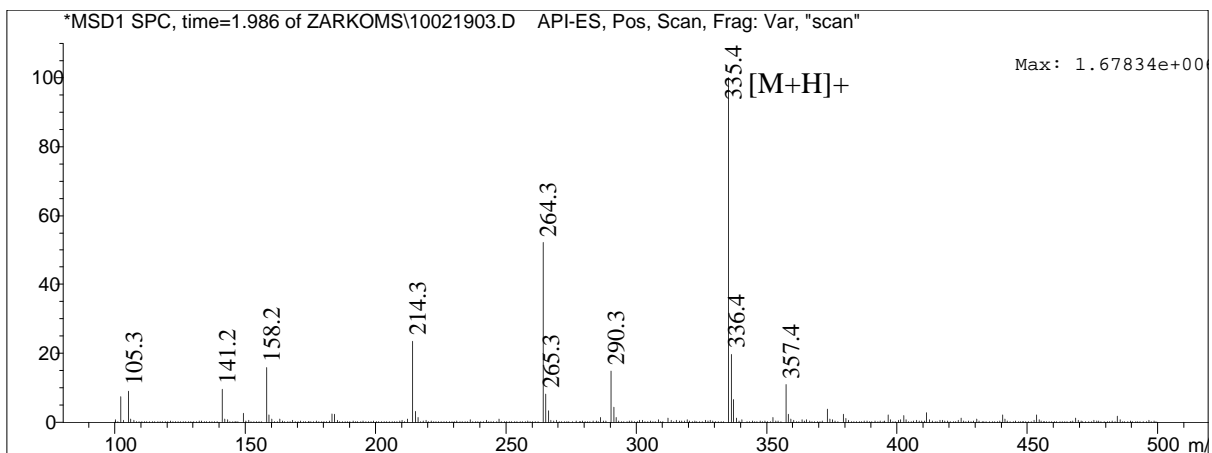
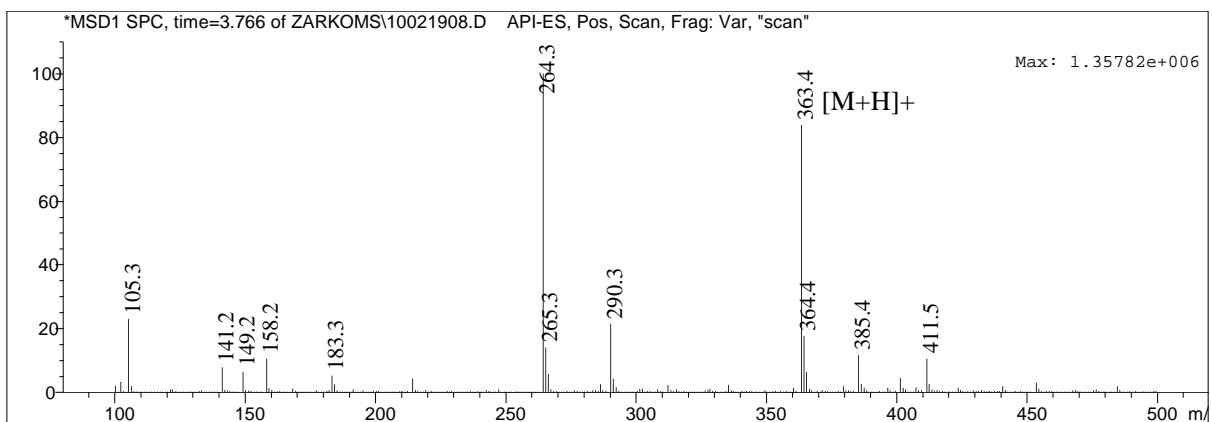
¹ napon ubrzanja jona za protonovani molekularni jon, ² napon ubrzanja jona za fragment jone



Slika 18. Maseni spektar torasemida, ESI⁺, molekularni jon m/z 349 i fragment joni 290 i 264



Slika 19. Maseni spektar R2, ESI⁺, molekularni jon m/z 264 i fragment joni 183 i 168

Slika 20. Maseni spektar R4, ESI⁺, molekularni jon m/z 276 i fragment jon 183Slika 21. Maseni spektar R3, ESI⁺, molekularni jon m/z 335 i fragment joni 290 i 264Slika 22. Maseni spektar R6, ESI⁺, molekularni jon m/z 363 i fragment joni 290 i 264

4.1.3. Primena *screening* eksperimentalnog dizajna u optimizaciji hromatografskih uslova

Preliminarnim eksperimentima definisani su hromatografski parametri i njihov opseg ispitivanja. Kroz eksperimentalni dizajn, svaki hromatografski parametar se dalje može ispitivati izvođenjem serije eksperimenata u kojima se prati njegov uticaj pojedinačno i u interakciji sa drugim parametrima metode. U ovoj fazi optimizacije, koristi se *screening* dizajn čiji je cilj da kroz ograničen broj eksperimenata grubo proceni značajnost određenih varijabli na hromatografsko ponašanje sistema.

Kao *screening* dizajn izabran je frakcioni faktorski dizajn (FFD) 2^{4-1} , za ispitivanje uticaja četiri varijable: procenta acetonitrila u mobilnoj fazi, pH vrednosti mobilne faze, temperature kolone i jačine pufera amonijum formijata (mM). Viši i niži nivoi svake od varijabli su definisani tokom preliminarnih ispitivanja i kodirani oznakama +1 i -1. Sve ostale varijable, kao što su protok mobilne faze (1 ml/minuti), talasna dužina detekcije (290 nm) i volumen injiciranja (30 μ l) su održavane konstantnim. Frakcioni faktorski dizajn 2^{4-1} rezultovao je sa osam eksperimenata izvedenih randomiziranim redosledom bez ponavljanja, a posmatrani odgovori su bili retencioni faktori (k') ispitivanih supstanci. U tabelama 8 i 9 date su ispitivane varijable i njihovi nivoi, odnosno dobijeni retencioni faktori za torasemid i nečistoće.

Tabela 8. FFD 2^{4-1} , ispitivane varijable i nivoi

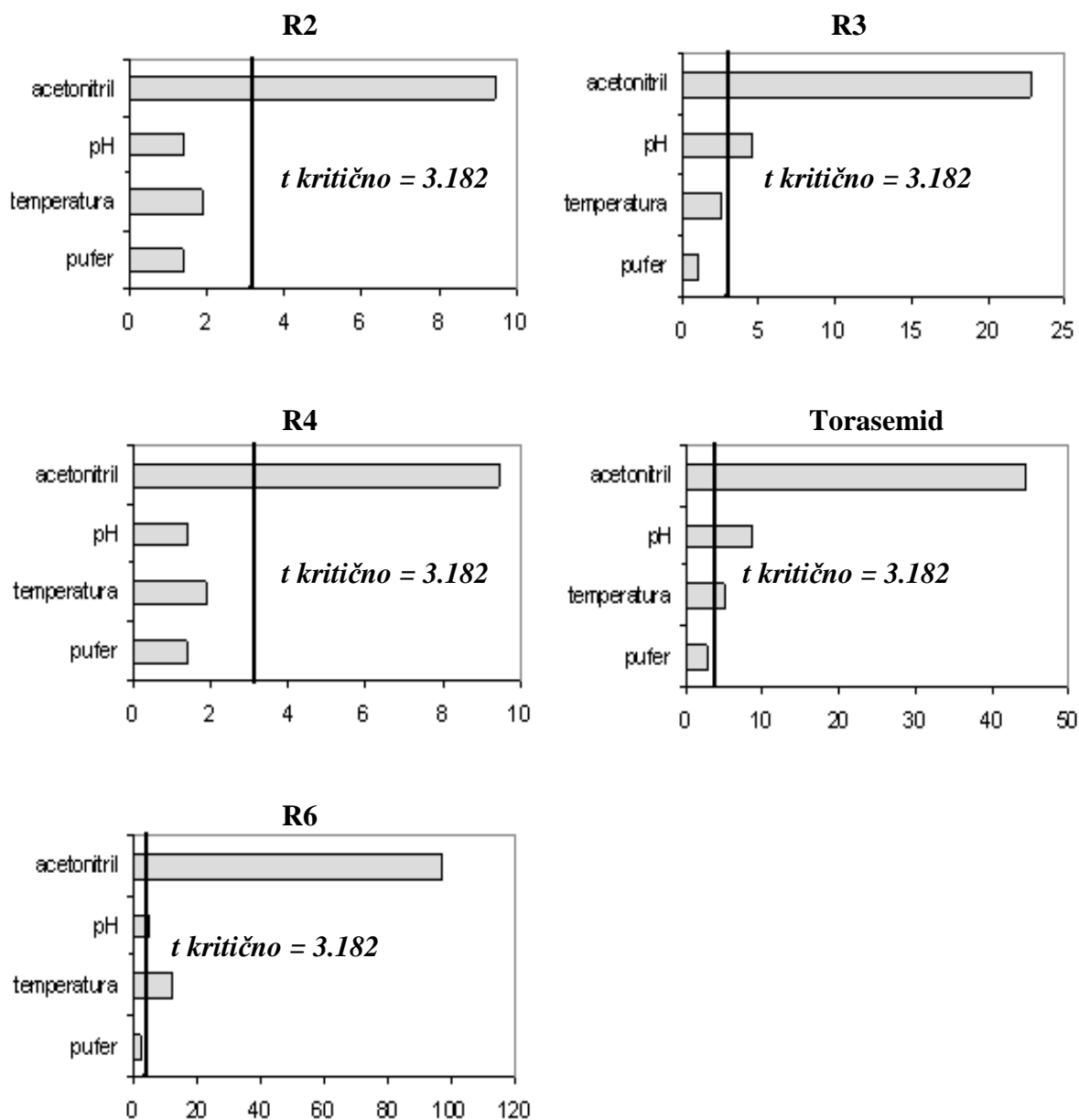
Redni broj eksperimenta	Ispitivane varijable			
	Acetonitril (%)	pH	Temperatura (°C)	Pufer (mM)
1.	20	2	15	0
2.	60	2	15	10
3.	20	3	15	10
4.	60	3	15	0
5.	20	2	35	10
6.	60	2	35	0
7.	20	3	35	0
8.	60	3	35	10

Tabela 9. Retencioni faktori torasemida i nečistoća (posmatrani odgovori sistema FFD 2⁴⁻¹)

Redni broj eksperimenta	Retencioni faktori				
	R2	R4	R3	Torasemid	R6
1.	2.70	3.18	9.43	18.11	36.64
2.	0.18	0.25	0.25	0.37	0.66
3.	3.56	4.71	7.21	14.46	34.89
4.	0.21	0.21	0.21	0.21	0.44
5.	2.34	2.66	8.57	16.68	30.19
6.	0.09	0.13	0.17	0.23	0.44
7.	1.91	2.70	5.00	9.43	25.89
8.	0.19	0.39	0.10	0.19	0.35

Izvođenje ponovljenih eksperimenata u centralnoj tački (srednji nivo svake od varijabli) je omogućilo izračunavanje standardne greške. Koeficijenti modela, odnosno procenjeni efekti varijabli podeljeni sa standardnom greškom dali su standardizovane efekte. Na osnovu eksperimentalne greške i apsolutnih vrednosti standardizovanih efekata procenjena je statistička značajnost koeficijenata modela putem *Student*-ovog *t*-testa.

Rezultati eksperimenata izvedenih u okviru frakcionog faktorskog dizajna predstavljeni su *Pareto* dijagramima (slika 23) i pokazuju uticaj ispitivanih varijabli na retencione faktore ispitivanih supstanci.



Slika 23. Pareto dijagrami standardizovanih efekata (apsolutne vrednosti), dobijenih frakcionim faktorskim dizajnom, za torasemid i nečistoće R2, R3, R4 i R6, pokazuju uticaj ispitivanih varijabli na retencione faktore

Dužina pravougaonika u *Pareto* dijagramu je proporcionalna apsolutnoj vrednosti standardizovanih efekata, a linija označava graničnu vrednost za test koja odgovara p vrednosti od 0.05 i iznosi $t_{kritično} = 3.182$, za tri stepena slobode. Svi faktori čije su apsolutne vrednosti standardizovanih efekata iznad kritične t vrednosti su statistički značajni, a što su vrednosti veće odgovarajući faktor ima veći uticaj na odgovor sistema. Pozitivan ili negativan predznak ispred vrednosti standardizovanog efekta govori o tome da su vrednosti ispitivanog faktora i odgovora sistema u direktnoj ili obrnutoj srazmeri. Na osnovu *Pareto* dijagrama, procenat acetonitrila u mobilnoj fazi ima najveći uticaj na retenciju svih ispitivanih supstanci. Statistički značajan uticaj ispoljavaju i temperatura kolone i pH mobilne faze (izuzev za nečistoću R2), dok koncentracija pufera nema statistički značajan uticaj na retencione faktore. Prva tri faktora su dalje ispitivana primenom optimizacionog dizajna.

4.1.4. Primena optimizacionog eksperimentalnog dizajna

Pun faktorski dizajn na tri nivoa je korišćen u toku postupka optimizacije da se detaljnije ispita uticaj izabranih faktora na hromatografski sistem. Slične strukture i hromatografsko ponašanje svih pet ispitivanih supstanci nametnulo je problem određivanja udela acetonitrila u sastavu mobilne faze koji bi doneo zadovoljavajuće razdvajanje analita i prihvatljivo vreme trajanja analize. Zbog toga je bilo neophodno ustanoviti sistem gradijentnog eluiranja. Dva preostala faktora od značajnog uticaja na hromatografski sistem (pH mobilne faze i temperatura kolone) su dalje ispitivani do nivoa optimalnih vrednosti upotrebom 3^2 punog faktorskog dizajna. Koncentracija pufera (amonijum formijat, 10 mM) je pri tome držana konstantnom, a svi eksperimenti su izvedeni randomiziranim redosledom.

Odgovori sistema koji su praćeni su retencioni faktori torasemida i nečistoća, kao i rezolucija između kritičnog para. Kritični par su činile nečistoće R2 i R4, koje prve eluiraju i čija se separacija još tokom preliminarnih ispitivanja pokazala kritičnom. Dobijeni odgovori sistema za svaki eksperiment prikazani su u tabeli 10.

Tabela 10. Plan eksperimenata u 3^2 punom faktorskom dizajnu i dobijeni odgovori sistema (retencioni faktori i rezolucija kritičnog para) za torasemid i nečistoće

Redni broj eksperimenta	Faktori		Retencioni faktori					Rezolucija R2/R4
	pH	T(°C)	R2	R4	R3	Torasemid	R6	
1.	2.0	15	0.93	1.06	1.69	2.24	3.20	1.87
2.	2.0	35	0.76	0.86	1.48	2.00	2.88	1.71
3.	2.0	25	0.84	0.95	1.58	2.12	3.04	1.79
4.	3.0	15	1.39	1.54	1.91	2.10	2.95	2.22
5.	3.0	35	1.21	1.41	1.74	1.98	2.78	3.36
6.	3.0	25	1.29	1.48	1.82	2.04	2.86	2.88
7.	2.5	15	1.03	1.25	1.61	2.18	3.09	3.28
8.	2.5	35	0.86	1.07	1.44	1.98	2.82	3.49
9.*	2.5	25	0.94	1.16	1.53	2.09	2.96	3.49

* četiri ponavljanja u centralnoj tački

Na osnovu rezultata eksperimenata izračunati su matematički modeli površina odgovora sistema:

$$y = 0.94 + 0.23x_1 - 0.087x_2 - 0.0025x_1 x_2 + 0.13x_1^2 + 0.0067x_2^2 \quad (11)$$

gde y predstavlja retencioni faktor nečistoće R2,

$$y = 1.16 + 0.26x_1 - 0.085x_2 + 0.017x_1 x_2 + 0.057x_1^2 + 0.0017x_2^2 \quad (12)$$

gde y predstavlja retencioni faktor nečistoće R4,

$$y = 1.53 + 0.12x_1 - 0.092x_2 + 0.01x_1 x_2 + 0.18x_1^2 + 0.0017x_2^2 \quad (13)$$

gde y predstavlja retencioni faktor nečistoće R3,

$$y = 2.09 - 0.04x_1 - 0.093x_2 + 0.03x_1 x_2 - 0.003x_1^2 - 0.003x_2^2 \quad (14)$$

gde y predstavlja retencioni faktor torasemida,

$$y = 2.96 - 0.08x_1 - 0.13x_2 + 0.037x_1 x_2 - 0.005x_1^2 \quad (15)$$

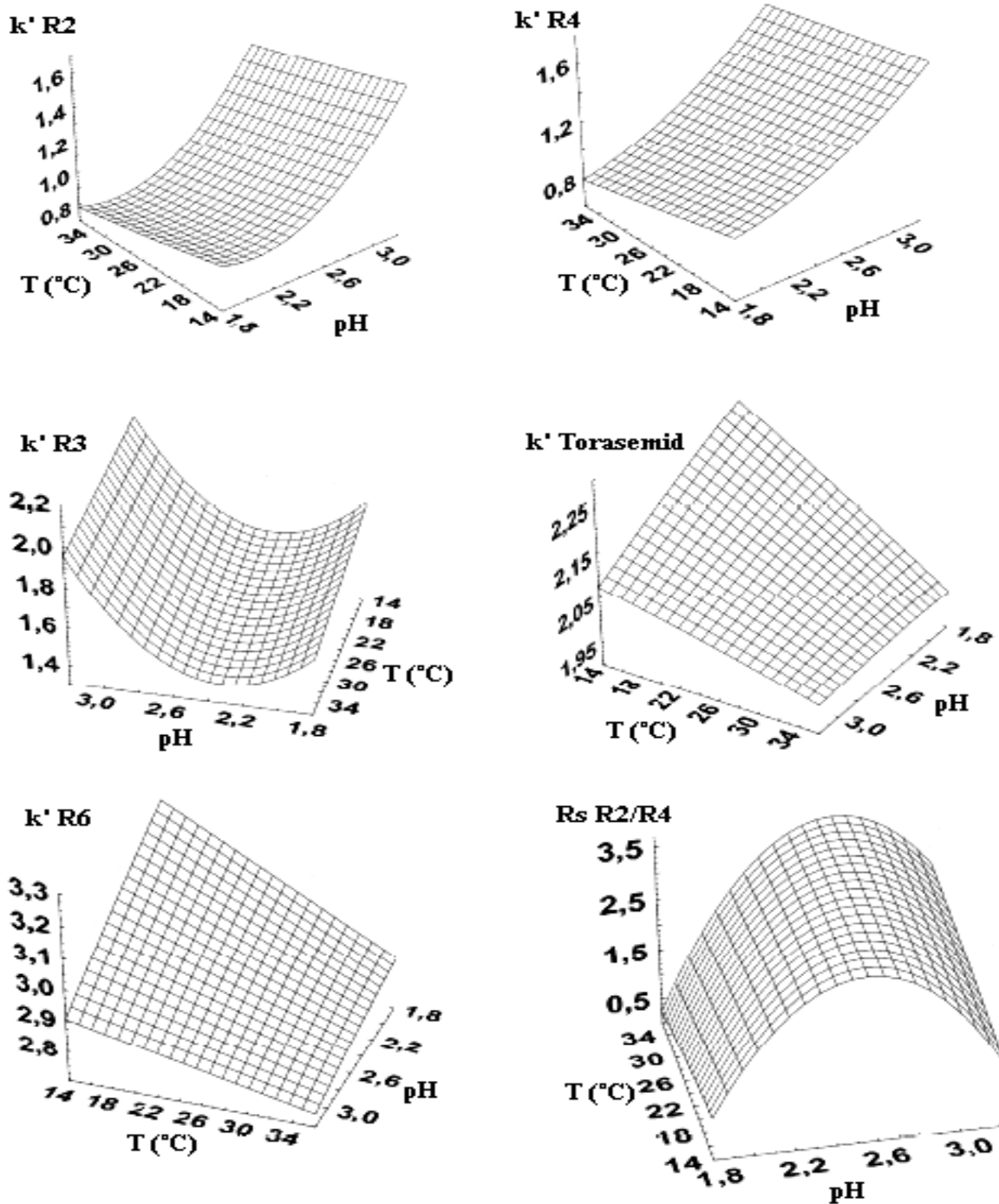
gde y predstavlja retencioni faktor nečistoće R6,

$$y = 3.41 + 0.52x_1 + 0.2x_2 + 0.32x_1 x_2 - 1.08x_1^2 - 0.035x_2^2 \quad (16)$$

gde y predstavlja rezoluciju između kritičnog para (nečistoće R2 i R4),

x_1 predstavlja pH mobilne faze, a x_2 temperaturu kolone.

Dobijeni rezultati se mogu predstaviti grafički (slika 24).



Slika 24. 3-D grafici površina odgovora za retencione faktore (k') torasemida i nečistoća i rezolucioni faktor (R_s) nečistoća R2 i R4, u funkciji pH mobilne faze i temperature kolone

Trodimenzionalne površine odgovora predstavljaju vizuelne prezentacije hromatografskog ponašanja supstanci radi lakšeg i bržeg odabira optimalnih eksperimentalnih uslova, a pokazuju uticaj dva faktora na izabrani odgovor sistema [55]. Iz dobijenih polinoma i 3-D grafika se uočava da povećanje pH vrednosti mobilne faze dovodi do povećanja svih ispitivanih odgovora sistema, osim retencionih faktora torasemida i nečistoće R6, kod kojih povećanje pH ima suprotan efekat. Sa druge strane, temperatura ima negativan efekat na ispitivane odgovore sistema, osim na rezoluciju kritičnog para gde povećanje temperature povećava rezoluciju. Veći uticaj na ovaj odgovor sistema ima pH vrednost mobilne faze. Na osnovu svega, može se zaključiti da se optimalna separacija analita i prihvatljivo vreme trajanja analize postižu pri temperaturi od 25 °C i pH vrednosti 2.5.

Analiza varijanse (ANOVA) je primenjena u cilju provere koliko izabrani matematički model odgovara eksperimentalno dobijenim podacima. Ponašanje sistema najbolje opisuju kvadratni modeli za sve ispitivane odgovore sistema, što pokazuju vrednosti koeficijenata korelacije R^2 i $adj. R^2$, koji su prikazani u tabeli 11.

Tabela 11. Vrednosti koeficijenata korelacije R^2 i $adj. R^2$

Odgovor sistema	R^2	$adj. R^2$
k' R2	0.9999	0.9999
k' R4	0.9997	0.9991
k' R3	0.9991	0.9976
k' Torasemid	0.9973	0.9928
k' R6	0.9984	0.9957
Rs R2/R4	0.9937	0.9832

Imajući u vidu da su za sve odgovore sistema odgovarajuće R^2 i $adj. R^2$ vrednosti vrlo bliske vrednosti 1 dokazano je da izabrani matematički modeli adekvatno opisuju eksperimentalne podatke.

Na ovaj način su optimizovani hromatografski parametri HPLC/UV i HPLC/MS metoda (čiji su optimalni uslovi za analizu dati u sekcijama 3.7.2. i 3.7.3.). Metode su dalje validirane da bi se potvrdila mogućnost njihove primene u ispitivanju kvaliteta farmaceutskog doziranog oblika torasemida.

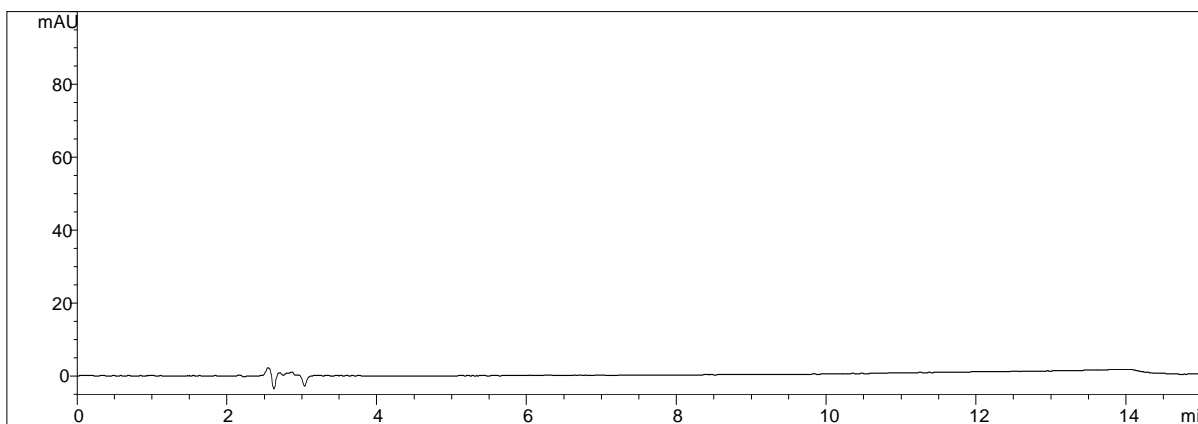
4.2. VALIDACIJA METODA ZA ODREĐIVANJE TORASEMIDA I NEČISTOĆA

Validacija HPLC/UV i HPLC/MS metoda za određivanje torasemida i nečistoća R2, R3, R4 i R6 izvršena je u skladu sa zahtevima *ICH* regulative [31], a ispitivani su parametri metoda: selektivnost, linearnost i opseg, preciznost, tačnost, limiti detekcije i kvantifikacije i robustnost.

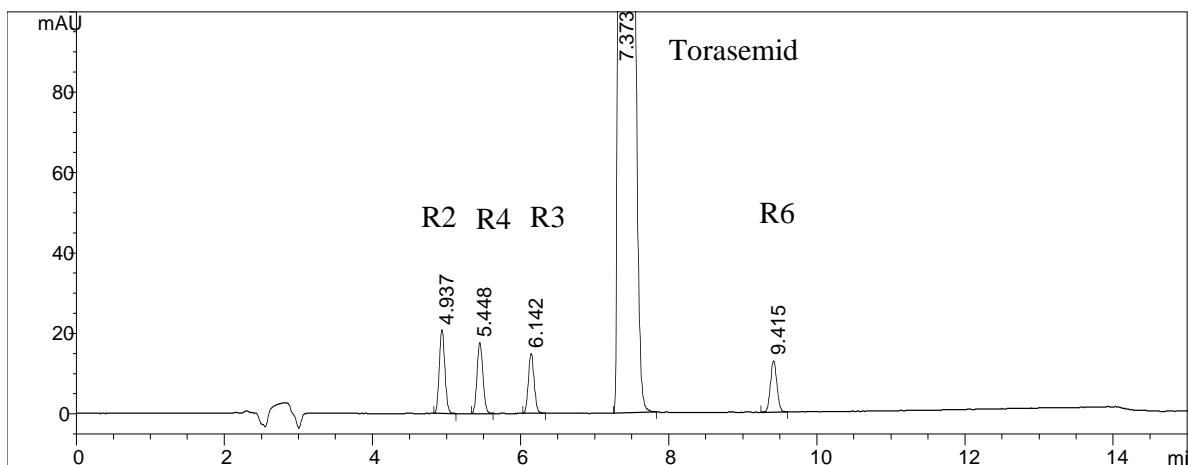
4.2.1. Validacija HPLC/UV metode

4.2.1.1. Ispitivanje selektivnosti

Selektivnost metode je ispitana injiciranjem rastvora placeba, rastvora uzorka i radnog rastvora standardnih supstanci koji sadrži torasemid i nečistoće R2, R3, R4 i R6 u koncentracijama: 0.1 mg/ml i 0.001 mg/ml, redom. Selektivnost se potvrđuje ukoliko nema interferencija od strane komponenata placeba, odnosno ukoliko na hromatogramu rastvora placeba nema pikova čija retencionna vremena odgovaraju retencionim vremenima za torasemid i nečistoće. Hromatogrami rastvora placeba i radnog rastvora standardnih supstanci za ispitivanje selektivnosti su prikazani na slikama 25 i 26.



Slika 25. Hromatogram rastvora placeba



Slika 26. Hromatogram rastvora standardnih supstanci za ispitivanje selektivnosti

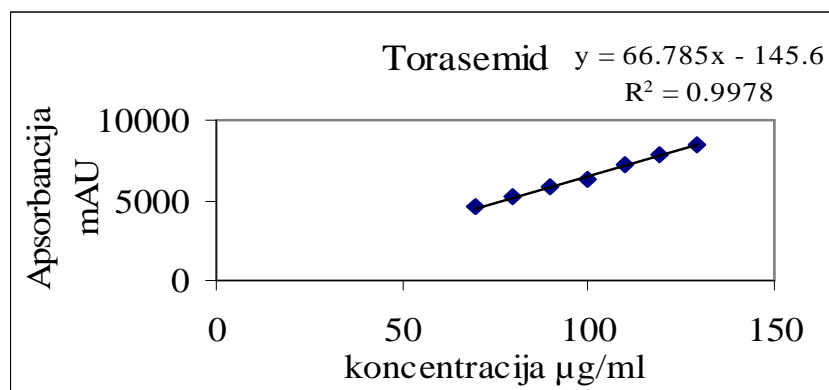
Čistoća svih eluiranih pikova je praćena upotrebom PDA detektora i dokazano je da je čistoća svih pikova bila veća od 99%. Selektivnost metode je potvrđena jer na hromatogramu rastvora placebo nema pikova čija retencionna vremena odgovaraju retencionim vremenima za torasemid i nečistoće.

4.2.1.2. Ispitivanje linearnosti i opsega metode

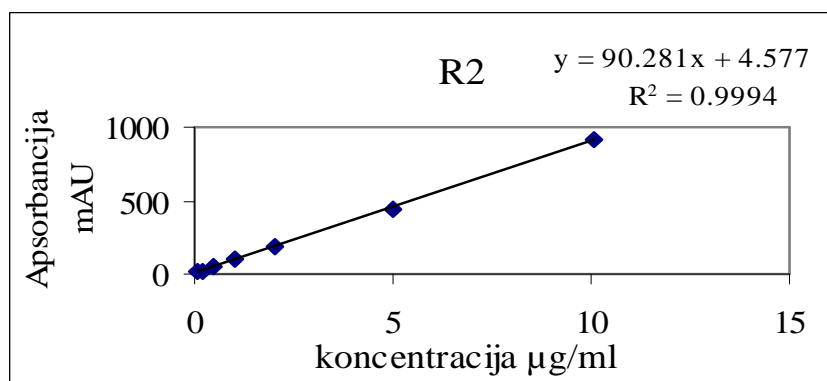
Ispitivanje linearnosti izvršeno je na sedam standardnih rastvora različitih koncentracija za torasemid i nečistoće R2, R3, R4 i R6. Ispitivani opseg koncentracija određen je u skladu sa *ICH* regulativom [31, 72]: od 70–130% za torasemid i 0.1–10% za nečistoće, u odnosu na radnu koncentraciju torasemida u rastvoru uzorka. Analizirana je zavisnost površine pikova (apsorbancije) ispitivanih supstanci u funkciji koncentracije. Kalibracione krive su konstruisane metodom najmanjih kvadrata, a svaka tačka kalibracione krive dobijena je kao srednja vrednost tri injektovanja odgovarajućih rastvora.

Regresiona analiza dobijenih podataka pokazala je da je metoda linearna u ispitivanom opsegu koncentracija, jer su koeficijenti linearnosti za sve kalibracione krive bili veći od 0.9978 (postavljeni zahtevi su bili da koeficijent linearnosti bude veći od 0.995).

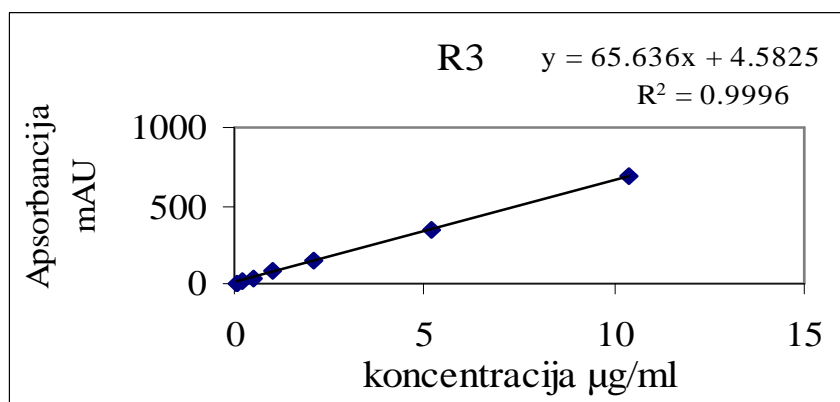
Kalibracione krive torasemida i nečistoća prikazane su na slikama 27, 28, 29, 30 i 31.



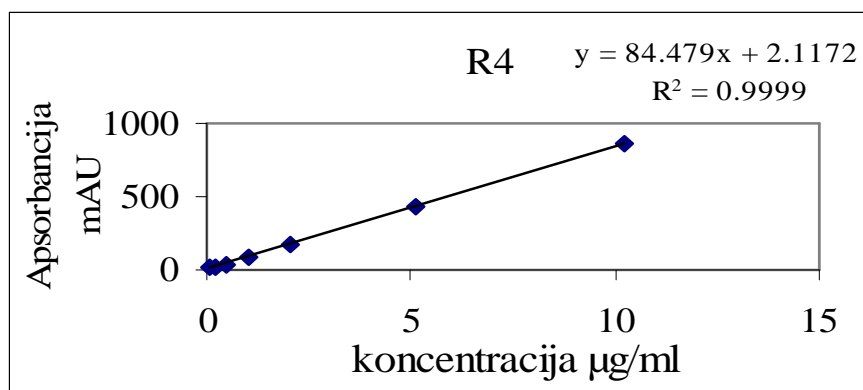
Slika 27. Kalibraciona kriva torasemida



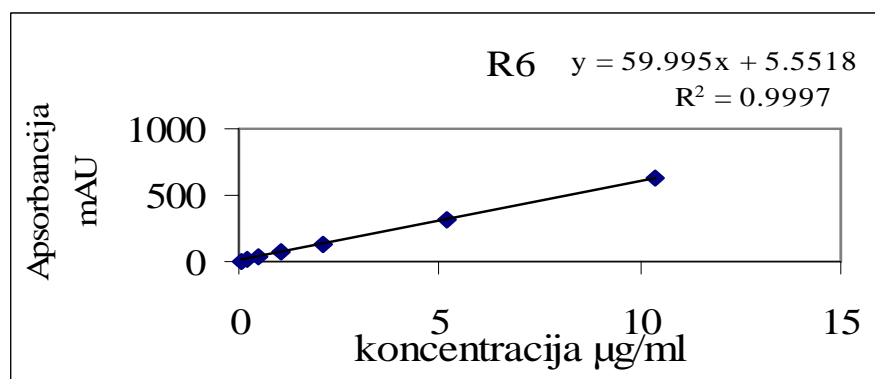
Slika 28. Kalibraciona kriva nečistoće R2



Slika 29. Kalibraciona kriva nečistoće R3



Slika 30. Kalibraciona kriva nečistoće R4



Slika 31. Kalibraciona kriva nečistoće R6

Uz pomoć *Student*-ovog *t*-testa je izvršena analiza značajnosti odsečka na *y* – osi. Zaključeno je da odsečki na *y* – osi nisu statistički značajno različiti od nule, jer su za sve kalibracione krive izračunate *t*-vrednosti (t_b) manje od tabelarne *t*-vrednosti ($t_{\text{tab}} = 4.032$, $p = 0.01$).

Parametri regresione analize prikazani su u tabeli 12.

Tabela 12. Parametri regresione analize

Supstanca	Opseg koncentracija ($\mu\text{g/ml}$)	Kalibraciona kriva $y = ax + b$	R^2	S_a	S_b	t_b
Torasemid	70 – 130	$y = 66.785x - 145.6$	0.9978	1.41	142.94	1.02
R2	0.1 – 10	$y = 90.281x + 4.577$	0.9994	0.97	4.18	1.09
R3	0.1 – 10	$y = 65.636x + 4.582$	0.9996	0.57	2.54	1.80
R4	0.1 – 10	$y = 84.479x + 2.117$	0.9999	0.34	1.50	1.41
R6	0.1 – 10	$y = 59.995x + 5.552$	0.9997	0.46	2.04	2.71

a nagib kalibracione krive, b odsečak, R^2 koeficijent linearosti, S_a standardna devijacija nagiba, S_b standardna devijacija odsečka, t_b izračunata t -vrednost za odsečak, tabelarna t vrednost ($t_{\text{tab}} = 4.032$, $p = 0.01$)

4.2.1.3. Ispitivanje preciznosti metode

Preciznost analitičke metode predstavlja stepen rasipanja (ili međusobnog slaganja) individualnih rezultata dobijenih iz paralelnih određivanja, iz više nezavisno pripremljenih uzoraka pod istim uslovima. Ponovljivost je preciznost procenjena pod istim uslovima u kratkom vremenskom periodu, izražena najčešće kao relativna standardna devijacija (RSD) [31].

Preciznost, odnosno ponovljivost metode je ispitana analizom laboratorijske smeše radnih standardnih rastvora za ispitivanje preciznosti i tačnosti. Rastvori su sadržavali torasemid u koncentracijama 70, 100 i 130 $\mu\text{g/ml}$ i nečistoće R2, R3, R4 i R6 u koncentracijama 0.1, 1.0 i 10.0 $\mu\text{g/ml}$, kao i komponente placebo u odnosu koji odgovara sastavu pomoćnih komponenti u uzorku. Za svaki koncentracioni nivo napravljena su po tri rastvora koji su injicirani u hromatografski sistem po tri puta.

Izračunate standardne devijacije (SD) i relativne standardne devijacije (RSD), za sve ispitivane supstance i sve koncentracije, potvrdile su dobru preciznost metode u ispitivanom opsegu (kao zahtev za ponovljena određivanja torasemida postavljeno je da RSD vrednost bude manja od 2%, a za nečistoće manja od 5%). Statistički parametri koji opisuju preciznost metode prikazani su u tabeli 13.

4.2.1.4. Ispitivanje tačnosti metode

Slaganje referentne vrednosti i rezultata dobijenog određivanjem pod propisanim uslovima naziva se tačnost metode, a izražava se kao procenat prinosa (eng. *recovery*) od poznate, dodate količine analita u uzorak. Ispitivanje tačnosti metode izvršeno je sa standardnim rastvorima torasemida i nečistoća korišćenih za ispitivanje preciznosti metode. Izračunavanjem procenta prinosa, odnosno *recovery* vrednosti (kao zahtev je postavljeno da *recovery* vrednost za torasemid bude između 97.5–102.5%, a za nečistoće između 95–105%) potvrđena je dobra tačnost metode u ispitivanom opsegu. Statističkom analizom izračunati su parametri koji prikazuju tačnost metode i dati su u tabeli 13.

Tabela 13. Rezultati ispitivanja preciznosti i tačnosti metode

Supstanca	Pripremljena koncentracija (µg/ml)	Nađena koncentracija±SD ¹ (µg/ml)	<i>Recovery</i> (%)	RSD (%)
Torasemid	69.650	70.570±0.160	101.32	0.23
	99.500	101.663±0.161	102.17	0.16
	129.350	129.915±0.727	100.44	0.56
R2	0.100	0.105±0.002	104.10	1.92
	1.004	0.990±0.005	98.56	0.55
	10.040	9.999±0.050	99.60	0.50
R3	0.104	0.109±0.001	104.92	0.96
	1.036	1.046±0.001	100.96	0.13
	10.360	10.457±0.056	100.93	0.54
R4	0.102	0.104±0.001	101.49	0.71
	1.020	1.034±0.002	101.32	0.21
	10.200	10.128±0.057	99.29	0.56
R6	0.103	0.106±0.002	102.33	1.92
	1.034	0.999±0.001	96.57	0.12
	10.340	10.310±0.055	99.71	0.53

¹ standardna devijacija ($n = 9$)

4.2.1.5. Ispitivanje limita detekcije i kvantifikacije

Limiti detekcije i kvantifikacije određeni su eksperimentalno i procenom odnosa signal/šum. Rastvori koncentracija 0.03, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 $\mu\text{g/ml}$ za torasemid i 0.02, 0.03, 0.06, 0.1 i 0.2 $\mu\text{g/ml}$ za nečistoće injicirani su u hromatografski sistem i izračunate su vrednosti odnosa signal/šum. Limiti detekcije (*LOD*) i kvantifikacije (*LOQ*) ispitivanih supstanci su koncentracije koje su dale odnos signal/šum najmanje 3:1, odnosno 10:1. Vrednosti *LOD* i *LOQ* za torasemid i nečistoće prikazane su u tabeli 14.

Tabela 14. Limiti detekcije (*LOD*) i kvantifikacije (*LOQ*) za ispitivane supstance

Supstanca	<i>LOD</i> ($\mu\text{g/ml}$)	<i>LOQ</i> ($\mu\text{g/ml}$)
Torasemid	0.035	0.100
R2	0.020	0.060
R3	0.030	0.090
R4	0.025	0.075
R6	0.030	0.090

4.2.1.6. Ispitivanje robustnosti metode

Robustnost analitičke metode definiše se kao sposobnost metode da se odupre malim, namernim promenama parametara metode: promeni pH mobilne faze, promeni sastava mobilne faze, promeni protoka, promeni temperature kolone i tipa kolone. Jedan od načina procene robustnosti je praćenje rezolucije kritičnog para [31].

Imajući u vidu da je za određivanje torasemida i nečistoća tokom preliminarnih ispitivanja ustanovljen gradijentni sistem eluiranja, promene udela organskog rastvarača u mobilnoj fazi i promene protoka svakako će imati veliki uticaj na ponašanje hromatografskog sistema i nisu razmatrane sa stanovišta procene robustnosti metode. Preliminarnim ispitivanjima je pokazano da na razdvajanje ispitivanih supstanci presudan uticaj ostvaruje i izbor odgovarajuće stacionarne faze, pa ova ispitivanja nisu mogla biti rađena sa različitim analitičkim kolonama. Robustnost metode je ispitana variranjem

vrednosti parametara: temperature analitičke kolone, koncentracije soli u mobilnoj fazi i pH vrednosti mobilne faze.

Uticaj temperature kolone je ispitan na 20 °C i 30 °C (± 5 °C od optimalne vrednosti). Uticaj koncentracije soli amonijum formijata u mobilnoj fazi na stabilnost sistema ispitan je variranjem procenta soli $\pm 10\%$ u odnosu na optimalnu vrednost (10 mM), dok je pH vrednost mobilne faze menjana ± 0.2 pH jedinice od optimalne vrednosti (2.5). Procena robustnosti metode je izvršena praćenjem rezolucije kritičnog para nečistoća R2 i R4, a rezultati su prikazani u tabeli 15.

Tabela 15. Rezultati ispitivanja robustnosti

Faktor	Varijacije	Rezolucija R2/R4
Koncentracija amonijum formijata u mobilnoj fazi	9 mM	3.50
	11 mM	4.45
pH vrednost mobilne faze	pH 2.3	2.88
	pH 2.7	3.41
Temperatura kolone	20 °C	3.31
	30 °C	3.45

Praćenjem rezolucije kritičnog para nečistoća R2 i R4, sa promenama hromatografskih faktora u propisanim opsezima, pokazana je dobra robustnost metode (postavljeni zahtev je bio da rezolucija ne bude manja od 1.5) [37].

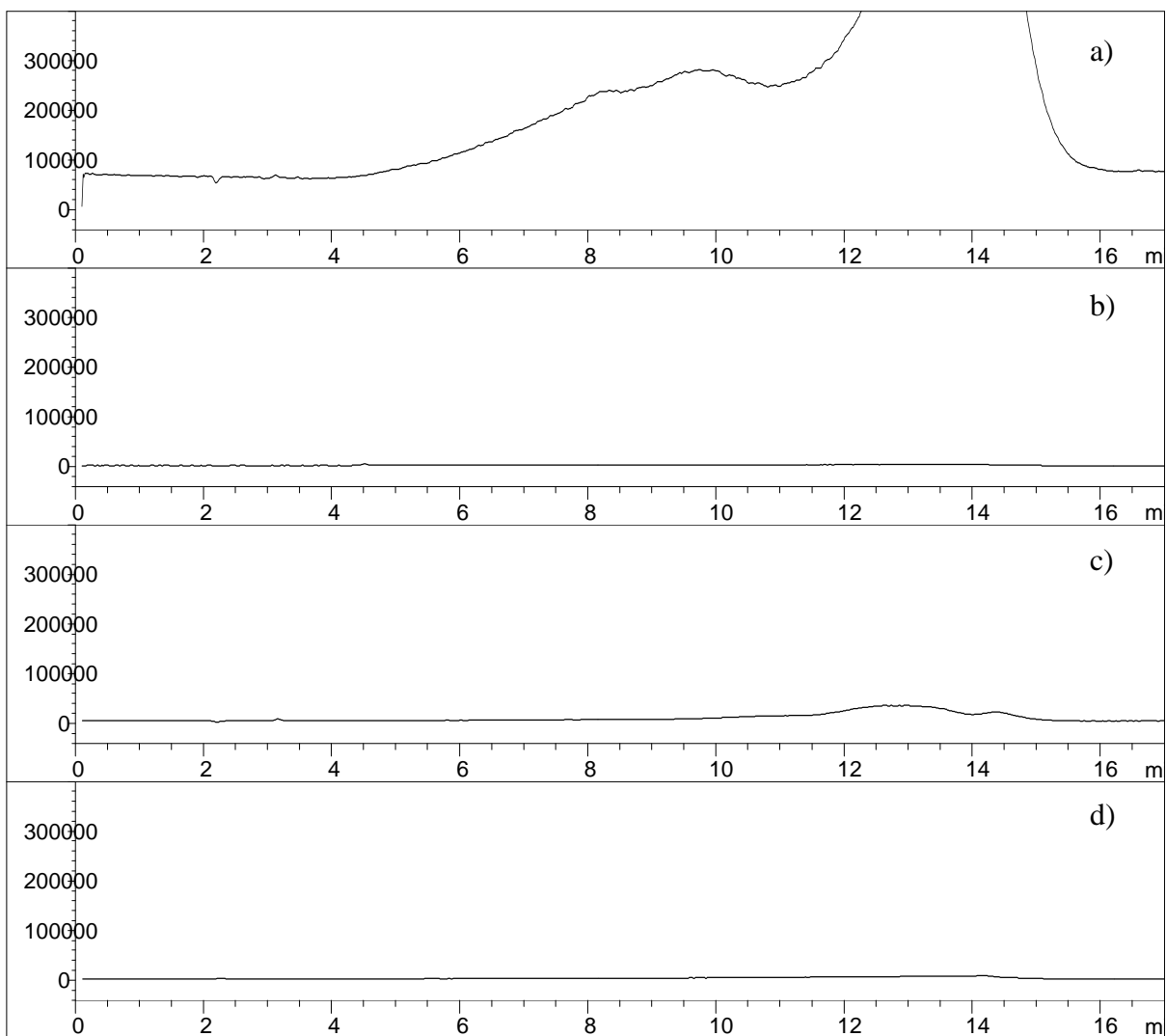
4.2.2. Validacija HPLC/MS metode

Optimalni uslovi pod kojima je izvršena validacija HPLC/MS metode opisani su u sekciji 3.7.3.

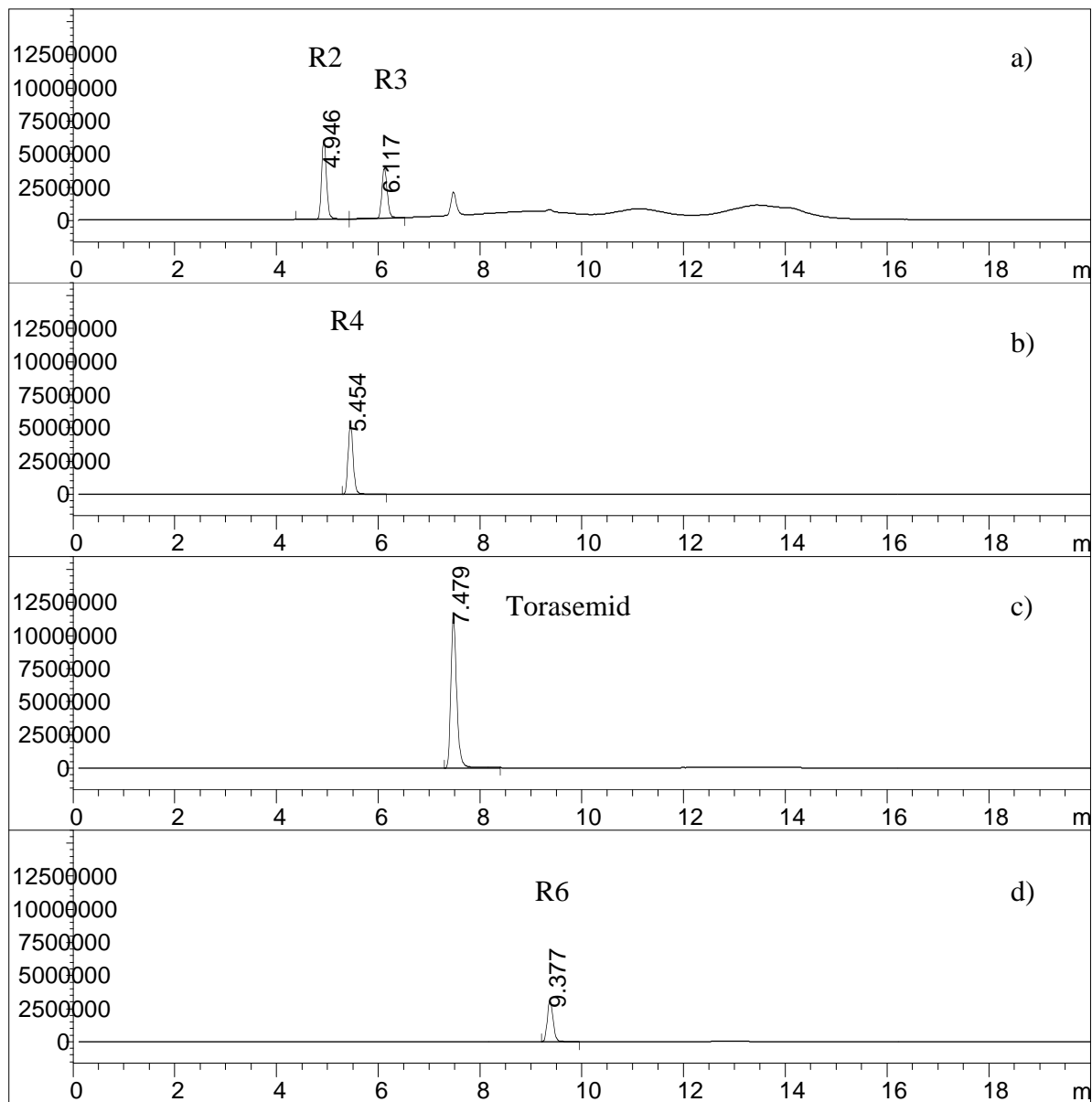
4.2.2.1. Ispitivanje selektivnosti

Selektivnost metode je ispitana injiciranjem rastvora placeba, rastvora uzorka i radnog rastvora standardnih supstanci torasemida i nečistoća koji su korišćeni za ispitivanje selektivnosti HPLC/UV metode, a dodatno su za HPLC/MS analizu razblaženi još 10 puta

sa smešom acetonitril–10 mM amonijum formijat pH 2.5 (50:50, v/v). Hromatogrami rastvora placeba i radnog rastvora standardnih supstanci za ispitivanje selektivnosti HPLC/MS metode snimljeni tehnikom praćenja odabranog jona (SIM) prikazani su na slikama 32 i 33.

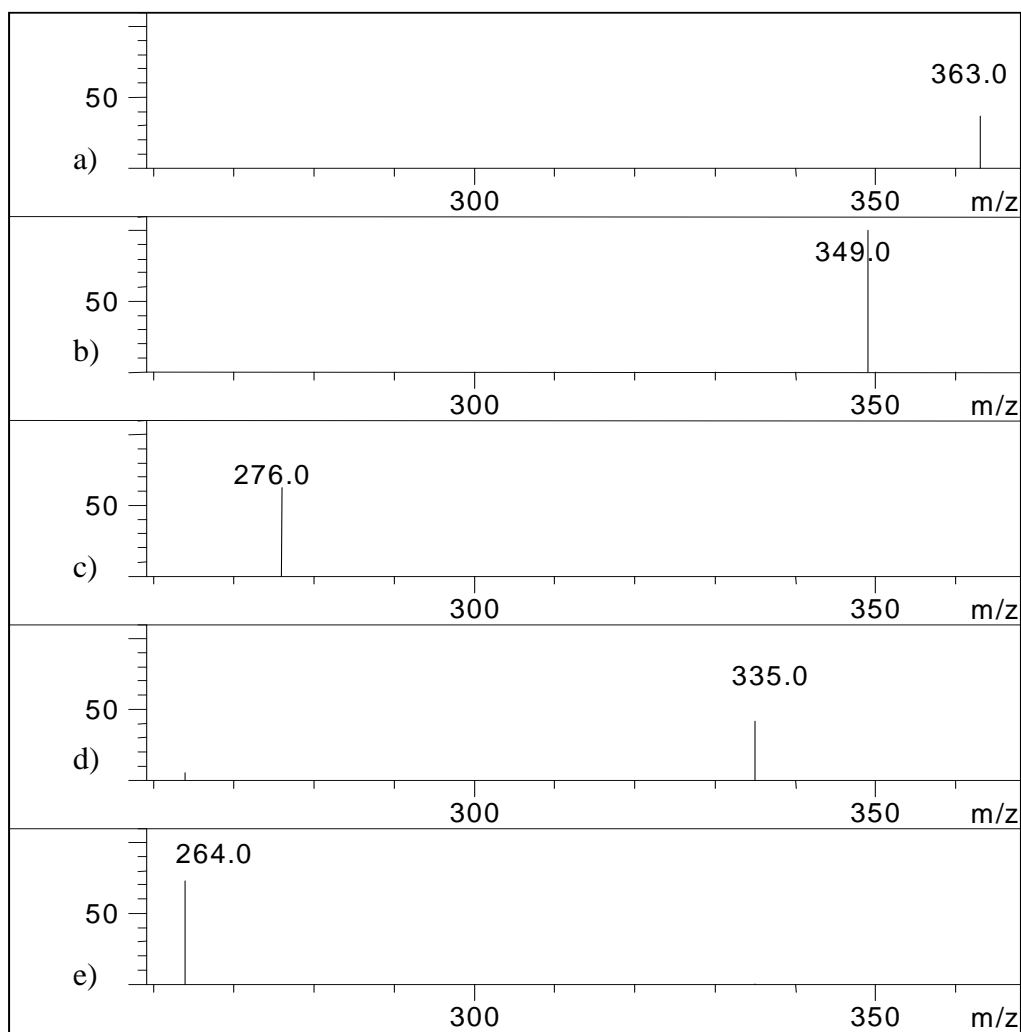


Slika 32. Hromatogram rastvora placeba, SIM, na kanalima na kojima se prate joni: a) m/z 264 i 335 za R2 i R3, b) m/z 276 za R4, c) m/z 349 za torasemid, d) m/z 363 za R6



Slika 33. Hromatogram rastvora standardnih supstanci za ispitivanje selektivnosti HPLC/MS metode, SIM, na kanalima na kojima se prate joni: a) m/z 264 i 335 za R2 i R3, b) m/z 276 za R4, c) m/z 349 za torasemid, d) m/z 363 za R6

MS spektri torasemida i nečistoća, snimljeni SIM tehnikom prikazani su na slici 34: a) m/z 363 nečistoća R6, b) m/z 349 torasemid, c) m/z 276 nečistoća R4, d) m/z 335 nečistoća R3, e) m/z 264 nečistoća R2.



Slika 34. MS spektri torasemida i nečistoća:

a) R6, b) torasemid, c) R4, d) R3, e) R2

Selektivnost metode je potvrđena jer na hromatogramu rastvora placebo nema pikova čija retenciona vremena odgovaraju retencionim vremenima za torasemid i nečistoće.

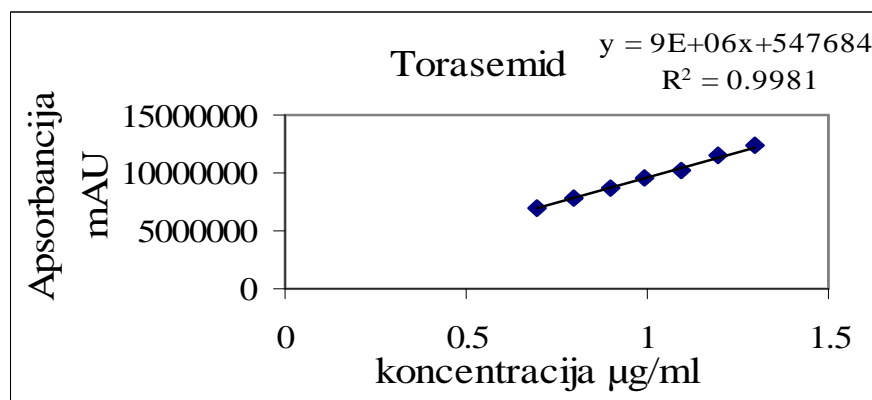
4.2.2.2. Ispitivanje linearnosti i opsega metode

Ispitivanje linearnosti izvršeno je na sedam standardnih rastvora, različitih koncentracija za torasemid i nečistoće R2, R3, R4 i R6. Ispitivani opseg koncentracija određen je u skladu sa *ICH* regulativom [31, 72]: od 70–130% za torasemid i 0.1–10% za nečistoće, u odnosu na radnu koncentraciju torasemida u rastvoru uzorka. Analizirana je

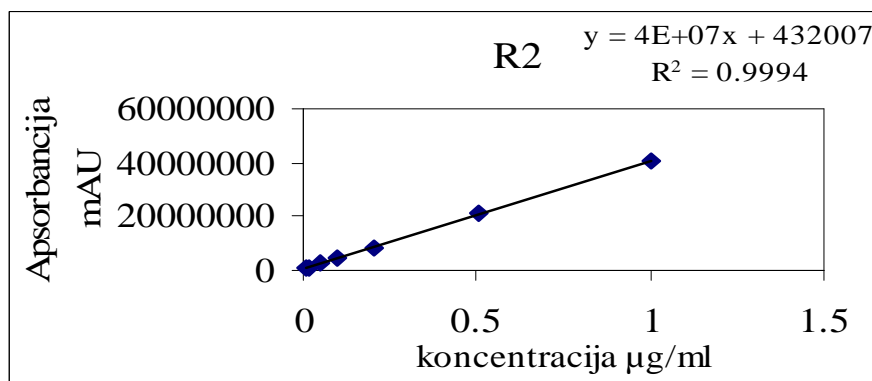
zavisnost površine pikova (apsorbancije) ispitivanih supstanci u funkciji koncentracije. Kalibracione krive su konstruisane metodom najmanjih kvadrata, a svaka tačka kalibracione krive dobijena je kao srednja vrednost tri injektovanja odgovarajućih rastvora.

Regresiona analiza dobijenih podataka pokazala je da je metoda linearna u ispitivanom opsegu koncentracija, jer su koeficijenti linearnosti za sve kalibracione krive bili veći od 0.9965 (postavljeni zahtevi su bili da koeficijent linearnosti bude veći od 0.995).

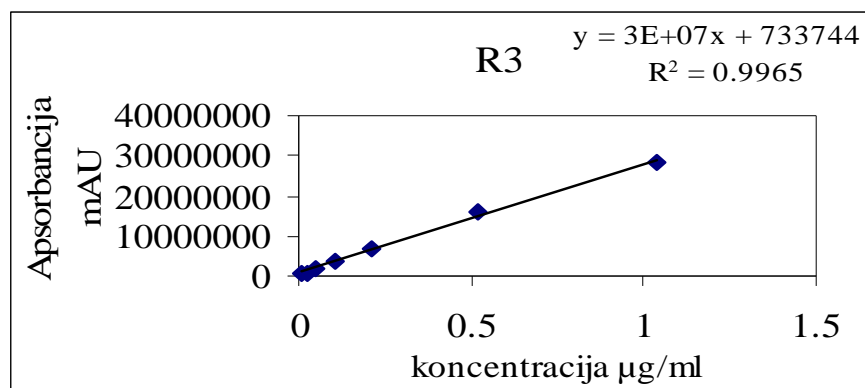
Kalibracione krive torasemida i nečistoća za validaciju HPLC/MS metode prikazane su na slikama 35, 36, 37, 38 i 39.



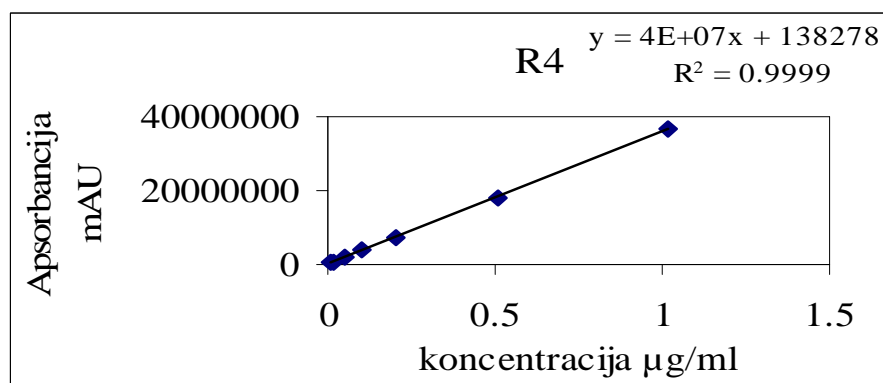
Slika 35. Kalibraciona kriva torasemida



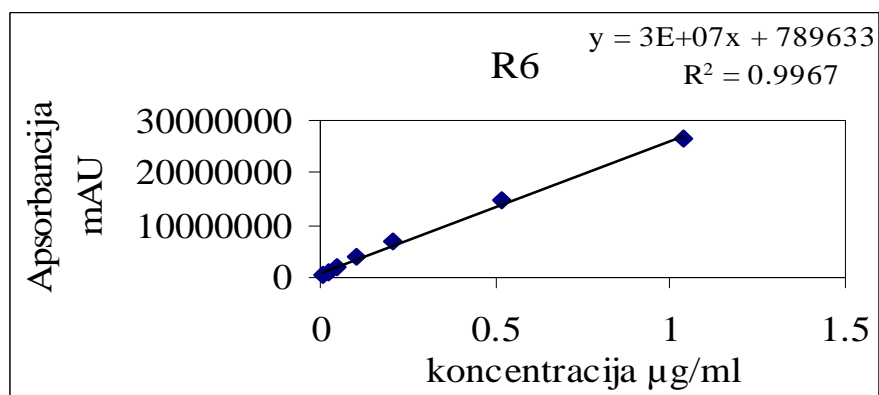
Slika 36. Kalibraciona kriva nečistoće R2



Slika 37. Kalibraciona kriva nečistoće R3



Slika 38. Kalibraciona kriva nečistoće R4



Slika 39. Kalibraciona kriva nečistoće R6

Uz pomoć *Student-ovog t-testa* je izvršena analiza značajnosti odsečka na y – osi. Zaključeno je da odsečki na y – osi nisu statistički značajno različiti od nule, jer su za sve kalibracione krive izračunate t -vrednosti (t_b) manje od tabelarne t -vrednosti ($t_{tab} = 4.032$, $p = 0.01$).

Parametri regresione analize prikazani su u tabeli 16.

Tabela 16. Parametri regresione analize

Supstanca	Opseg koncentracija ($\mu\text{g/ml}$)	Kalibraciona kriva $y = ax + b$	R^2	S_a	S_b	t_b
Torasemid	0.7 – 1.3	$y = 9E+06x+547684$	0.9981	1.79×10^5	1.82×10^5	3.02
R2	0.01 – 1.0	$y = 4E+07x+432007$	0.9994	4.41×10^5	1.91×10^5	2.26
R3	0.01 – 1.0	$y = 3E+07x+733744$	0.9965	7.25×10^5	3.24×10^5	2.26
R4	0.01 – 1.0	$y = 4E+07x+138278$	0.9999	1.29×10^5	5.64×10^5	2.45
R6	0.01 – 1.0	$y = 3E+07x+789633$	0.9967	6.54×10^5	2.92×10^5	2.71

a nagib kalibracione krive, b odsečak, R^2 koeficijent linearnosti, S_a standardna devijacija nagiba, S_b standardna devijacija odsečka, t_b izračunata t -vrednost za odsečak, tabelarna t vrednost ($t_{tab} = 4.032$, $p = 0.01$)

4.2.2.3. Ispitivanje preciznosti metode

Preciznost, odnosno ponovljivost HPLC/MS metode je ispitana analizom laboratorijske smeše radnih standardnih rastvora za ispitivanje preciznosti i tačnosti. Rastvori su sadržavali torasemid u koncentracijama 0.7, 1.0 i 1.3 $\mu\text{g/ml}$ i nečistoće R2, R3, R4 i R6 u koncentracijama 0.01, 0.1 i 1.0 $\mu\text{g/ml}$, kao i komponente placebo u odnosu koji odgovara sastavu pomoćnih komponenti u uzorku. Za svaki koncentracioni nivo napravljena su po tri rastvora koji su injicirani u hromatografski sistem po tri puta.

Izračunate standardne devijacije (SD) i relativne standardne devijacije (RSD), za sve ispitivane supstance i sve koncentracije, potvrdile su dobru preciznost metode u ispitivanom opsegu (kao zahtev za ponovljena određivanja torasemida postavljeno je da RSD vrednost

bude manja od 5%, a za nečistoće manja od 10%). Statistički parametri koji opisuju preciznost HPLC/MS metode prikazani su u tabeli 17.

4.2.2.4. Ispitivanje tačnosti metode

Ispitivanje tačnosti HPLC/MS metode izvršeno je sa standardnim rastvorima torasemida i nečistoća korišćenih za ispitivanje preciznosti metode. Izračunavanjem procenta prinosa, odnosno *recovery* vrednosti (kao zahtev je postavljeno da *recovery* vrednost za torasemid i nečistoće bude u opsegu 95–105%) potvrđena je dobra tačnost metode u ispitivanom opsegu. Statističkom analizom izračunati su parametri koji prikazuju tačnost HPLC/MS metode i dati su u tabeli 17.

Tabela 17. Rezultati ispitivanja preciznosti i tačnosti metode

Supstanca	Pripremljena koncentracija (µg/ml)	Nađena koncentracija±SD ¹ (µg/ml)	<i>Recovery</i> (%)	RSD (%)
Torasemid	0.6965	0.6781±0.0263	97.36	3.88
	0.9950	0.9589±0.0202	96.37	2.11
	1.2935	1.2684±0.0548	98.06	4.32
R2	0.0100	0.0101±0.0002	100.53	1.76
	0.1004	0.1006±0.0049	100.21	4.90
	1.0040	0.9616±0.0355	95.78	3.69
R3	0.0104	0.0101±0.0004	97.33	3.87
	0.1036	0.1057±0.0042	102.07	3.95
	1.0360	1.0071±0.0224	97.21	2.22
R4	0.0102	0.0103±0.0005	101.40	4.85
	0.1020	0.1058±0.0035	103.75	3.34
	1.0200	0.9969±0.0533	97.74	5.35
R6	0.0103	0.0106±0.0003	102.48	3.05
	0.1034	0.1057±0.0035	102.25	3.28
	1.0340	1.0155±0.0564	98.21	5.56

¹ standardna devijacija ($n = 9$)

4.2.2.5. Ispitivanje limita detekcije i kvantifikacije

Limiti detekcije i kvantifikacije za HPLC/MS metodu određeni su eksperimentalno i procenom odnosa signal/šum. Rastvori koncentracija 0.0002, 0.0006, 0.001, 0.002, 0.005 µg/ml za torasemid i 0.0002, 0.0004, 0.0006, 0.0012 i 0.0025 µg/ml za nečistoće injicirani su u hromatografski sistem i izračunate su vrednosti odnosa signal/šum. Limiti detekcije (*LOD*) i kvantifikacije (*LOQ*) ispitivanih supstanci su koncentracije koje su dale odnos signal/šum najmanje 3:1, odnosno 10:1. Vrednosti *LOD* i *LOQ* za torasemid i nečistoće dobijene HPLC/MS metodom prikazane su u tabeli 18.

Tabela 18. Limiti detekcije (*LOD*) i kvantifikacije (*LOQ*) za ispitivane supstance

Supstanca	<i>LOD</i> (µg/ml)	<i>LOQ</i> (µg/ml)
Torasemid	0.0002	0.0006
R2	0.0003	0.0009
R3	0.0004	0.0012
R4	0.0002	0.0006
R6	0.0002	0.0006

4.3. KVALITATIVNA I KVANTITATIVNA ANALIZA TORASEMID TABLETA

Dobijene vrednosti validacionih parametara: selektivnosti, linearnosti, preciznosti i tačnosti, limita detekcije i kvantifikacije, kao i robustnosti su u skladu sa unapred definisanim kriterijumima za validaciju HPLC/UV i HPLC/MS metoda čime je potvrđena njihova primenljivost za istovremeno određivanje torasemida i nečistoća R2, R3, R4 i R6 iz farmaceutskog doziranog oblika. Validirane metode, HPLC/UV i HPLC/MS primenjene su za kvalitativnu i kvantitativnu analizu torasemid tableta.

Pod navedenim uslovima, na hromatogramu pikova torasemida i nečistoća mogu se izračunati hromatografski parametri koji obezbeđuju dobro razdvajanje i tačno određivanje ispitivanih supstanci: retencioni faktor, simetrija pika i rezolucija. Prvi pik na hromatogramu (nečistoća R2) ima retencioni faktor 0.94, što garantuje dobro razdvajanje od pika mobilne

faze. Simetrija pika torasemida je 0.74, a pikova nečistoća 0.98, čime je omogućena dobra integracija pikova i tačno određivanje. Rezolucije između ispitivanih supstanci su mnogo veće od 1.5, što je uslov za razdvajanje na baznoj liniji. Kvalitativna i kvantitativna analiza torasemida i nečistoća ostvaruje se za relativno kratko vreme (svi pikovi eluiraju sa kolone za manje od 10 minuta). Vrednosti hromatografskih parametara za torasemid i nečistoće su prikazane u tabeli 19.

Tabela 19. Hromatografski parametri

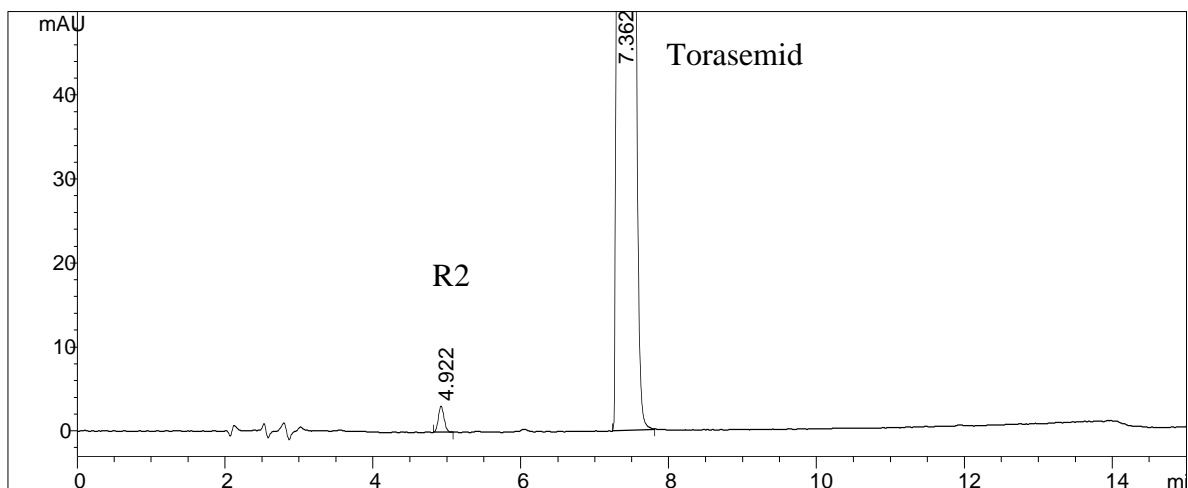
Supstanca	Retenciono vreme	Retencioni faktor	Simetrija pika	Rezolucija
R2	4.93	0.94	0.98	/
R4	5.44	1.16	0.98	3.49 ¹
R3	6.14	1.53	0.98	4.84 ²
Torasemid	7.37	2.09	0.74	6.28 ³
R6	9.41	2.96	0.98	10.04 ⁴

¹ rezolucija R2/R4, ² rezolucija R4/R3, ³ rezolucija R3/Torasemid, ⁴ rezolucija Torasemid/R6

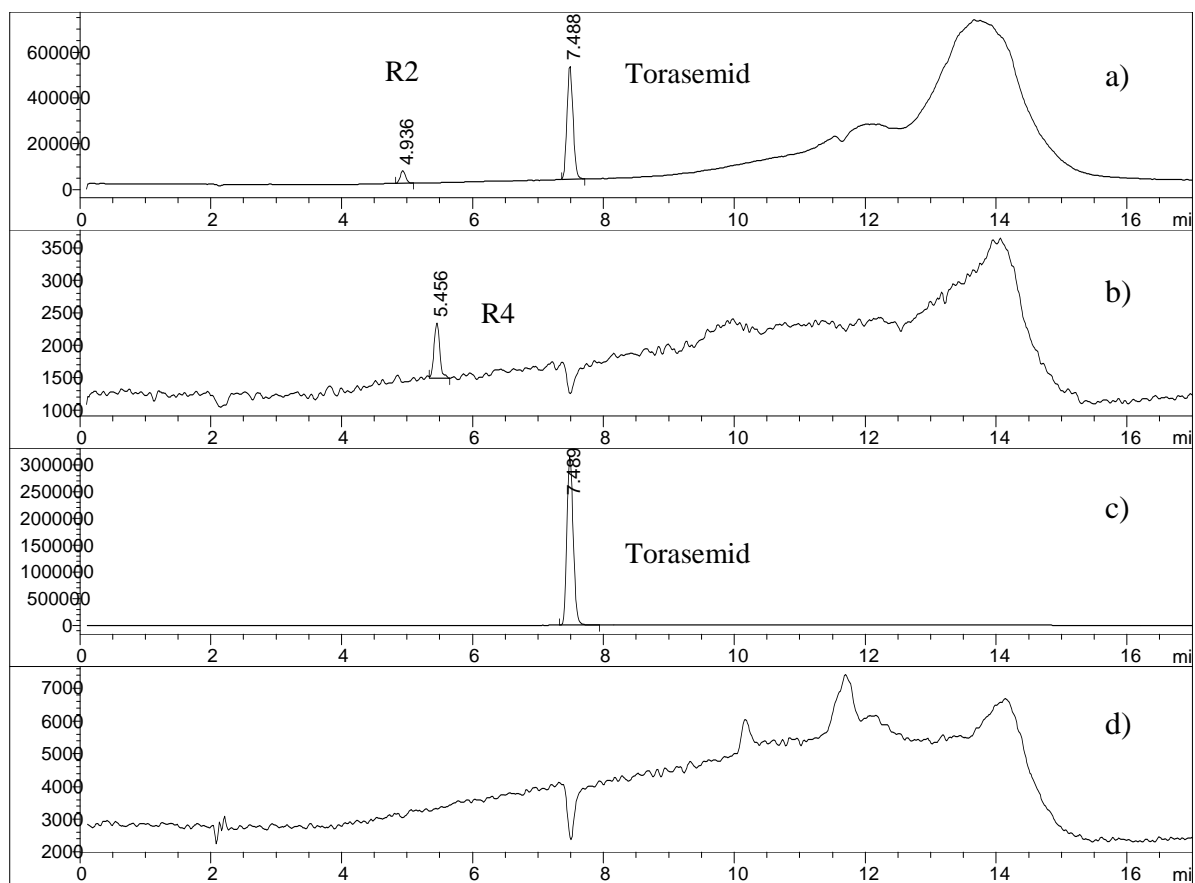
Identifikacija torasemida i nečistoća je izvršena preko retencionih vremena na hromatogramima, kao i snimanjem UV i masenih spektara. Kvantitativna analiza je urađena preko površina pikova ispitivanih supstanci na PDA detektoru, odnosno masenom detektoru.

Generalno, veća preciznost i tačnost metode se postiže HPLC/UV analizom, što je značajno sa aspekta njene kvantitativne primene. Prednost HPLC/MS analize je veća osetljivost metode. Osim toga, dobijene su niže *LOD* i *LOQ* vrednosti za sve ispitivane supstance, a u rastvoru uzorka nađena je i nečistoća R4 (ispod *LOQ* vrednosti).

Hromatogrami HPLC/UV i HPLC/MS analiza rastvora uzorka su prikazani na slikama 40 i 41.



Slika 40. HPLC/UV hromatogram rastvora uzorka



Slika 41. HPLC/MS hromatogram rastvora uzorka, SIM, na kanalima na kojima se prate joni: a) m/z 264 i 335 za R2 i R3, b) m/z 276 za R4, c) m/z 349 za torasemid, d) m/z 363 za R6

Rezultati određivanja torasemida i nečistoća iz torasemid tableta HPLC/UV i HPLC/MS metodom prikazani su u tabeli 20.

Tabela 20. Rezultati određivanja torasemida i nečistoća iz torasemid tableta

Supstanca	HPLC/UV			HPLC/MS		
	Nađeno po tableti (mg) ¹	% ²	RSD (%)	Nađeno po tableti (mg) ¹	% ²	RSD (%)
R2	0.015	0.15	0.80	0.016	0.16	1.76
R4	Ispod <i>LOD</i>	/	/	Ispod <i>LOQ</i>	/	/
R3	Ispod <i>LOD</i>	/	/	Ispod <i>LOD</i>	/	/
Torasemid	9.63	96.3	0.44	9.68	96.8	1.90
R6	Ispod <i>LOD</i>	/	/	Ispod <i>LOD</i>	/	/

¹($n = 3$), ² u odnosu na deklarisanu količinu torasemida u tabletama

Niske RSD vrednosti (ispod 2% za sva određivanja) potvrđuju pogodnost obe metode za određivanje torasemida i nečistoća iz farmaceutskog doziranog oblika. Nađeni sadržaji torasemida i nečistoće R2 zadovoljavaju definisane zahteve iz specifikacije gotovog proizvoda.

4.4. STUDIJA FORSIRANE DEGRADACIJE

Torasemid i farmaceutski dozirani oblik (torasemid tablete) podvrgnuti su studijama forsirane degradacije u skladu sa *ICH* smernicama [57, 58]. Studije su obuhvatale stres uslove: hidrolizu (kisela, bazna i neutralna), oksidaciju, fotodegradaciju i termodegradaciju. Detaljna priprema uzoraka za studije forsirane degradacije opisana je u sekciji 3.4.

Ispitivanja na farmaceutskoj aktivnoj supstanci vršena su u sledećim vremenskim tačkama: neposredno nakon pripreme (vreme nula), nakon 1, 4, 8, 24, 48 sati i nakon 7 dana. Ispitivanja na torasemid tabletama sprovedena su u istim vremenskim tačkama, sa dodatnom vremenskom tačkom nakon 21 dan. Ispitivanja su prekidana kada se dostigne nivo degradacije 5–20% [60]. Svi uzorci su analizirani HPLC/UV i HPLC/MS metodom, opisanim u sekcijama 3.7.2. i 3.7.3. Dodatna identifikacija degradacionih proizvoda

stvorenih tokom studija forsirane degradacije izvršena je HPLC/MS/MS metodom (sekcija 3.7.4.). Tokom svih ispitivanja praćeno je očuvanje ravnoteže mase (eng. *mass balance*). Dobijena vrednost za ravnotežu mase treba da bude bliska vrednosti od 100%, što osigurava pogodnost upotrebljene metode za detektovanje svih proizvoda degradacije. Za sve uzorke dobijene su vrednosti ravnoteže mase veće od 99%, odnosno nije bilo gubitka mase tokom ispitivanja stresiranih uzoraka.

Sumarni rezultati studije forsirane degradacije farmaceutski aktivne supstance torasemida su prikazani u tabeli 21. U tabeli su dati i molekularni joni i fragmenti za nađene nečistoće dobijeni HPLC/MS metodom.

Tabela 21. Sumarni rezultati studije forsirane degradacije torasemida

Stres uslovi	Neutralna hidroliza	Kisela hidroliza	Bazna hidroliza	Oksidacija		Fotoliza
	/	/	/			
	Termoliza	Termoliza	Termoliza			
	70 °C 24h	1 M HCl 70 °C 24h	1 M NaOH 70 °C 7 dana	10% H ₂ O ₂ 7 dana		ICH uslovi
Torasemid (%)	93.5	81.3	92.8	89.8		100.0
Degradacioni proizvod	R2	R2	R2	Nečistoća 1	Nečistoća 2	/
Degradacija (%)	6.5	18.7	7.2	3.4	6.0	/
RRt ¹	0.66	0.66	0.66	0.53	1.18	/
Molekularni joni	264[M+H] ⁺	264[M+H] ⁺	264[M+H] ⁺	302[M+Na] ⁺	365[M+H] ⁺	/
Fragmentni joni	183/168	183/168	183/168	286	306/280	/

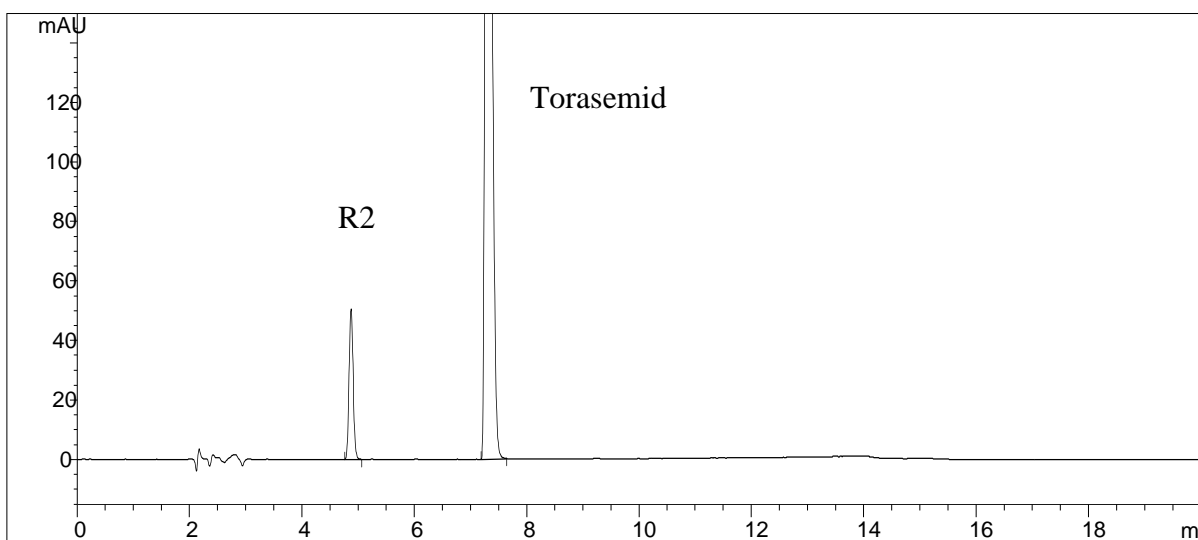
¹ relativno retenciono vreme

4.4.1. Hidroliza i termodegradacija

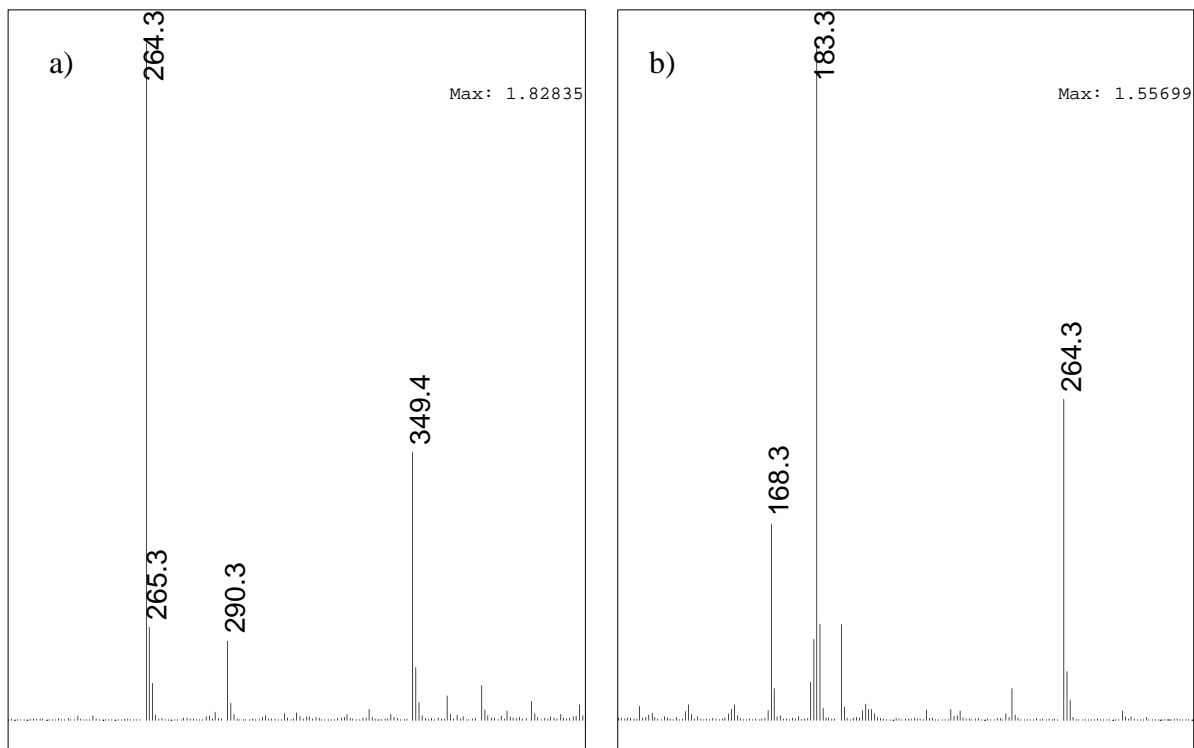
Torasemid je u kiselim, baznim i neutralnim rastvorima na sobnoj temperaturi pokazao stabilnost, ni posle sedam dana nije dobijena značajna degradacija. Kisela i bazna hidroliza ispitivana je sa 0.1, 0.5 i 1.0 M hlorovodonične kiseline, odnosno natrijum hidroksida. U svakoj vremenskoj tački analizirani su stres uzorak, blank rastvor, blank rastvor podvrgnut stres studiji na isti način kao i uzorci, radni standardni rastvor torasemida (pripremljen neposredno pre upotrebe).

Izlaganje stresiranih uzoraka temperaturi od 70 °C, u neutralnim rastvorima, dovelo je do degradacije torasemida od 6.5% nakon 24 sata. Na istoj temperaturi, uzorci stresirani sa 1.0 M NaOH smanjivali su stepen hidrolize (dobijeno 1.1%) nakon 24 sata, odnosno degradacija posle 7 dana je iznosila 7.2%. Torasemid je pokazao veću osetljivost na kisele uslove, te je degradacija sa 1.0 M HCl posle 24 sata na 70 °C iznosila 18.7%. U svim slučajevima, dobijen je jedan degradacioni proizvod (RRt 0.66).

Pik na RRt 0.66 je dao identičan spektar na PDA detektoru i retenciono vreme kao i nečistoća R2. Dodatna identifikacija izvršena je HPLC/MS metodom, pikovi u standardnom rastvoru nečistoće R2 i uzorka dali su molekulske jone na m/z 264 $[M+H]^+$ i fragmentne jone m/z 183 i 168. Na slikama 42 i 43 prikazani su HPLC/UV hromatogram i maseni spektri uzorka izloženog uslovima kisele hidrolize na 70 °C.



Slika 42. Hromatogram stresiranog uzorka torasemida (1 M HCl, 70 °C, 24 sata)



Slika 43. ESI⁺ maseni spektri dobijeni na kvadrupolnom masenom analizatoru: a) torasemid i b) nečistoća R2

Termodegradacija je ispitivana na farmaceutski aktivnoj supstanci torasemidu u čvrstom obliku i na farmaceutskom doziranom obliku (torasemid tablete). Grejanjem na povišenoj temperaturi od 70 °C ni posle 21 dan uzorci nisu pokazali znakove degradacije. Kao kontrolni uzorak za farmaceutski dozirani oblik uporedo je analiziran i placebo rastvor.

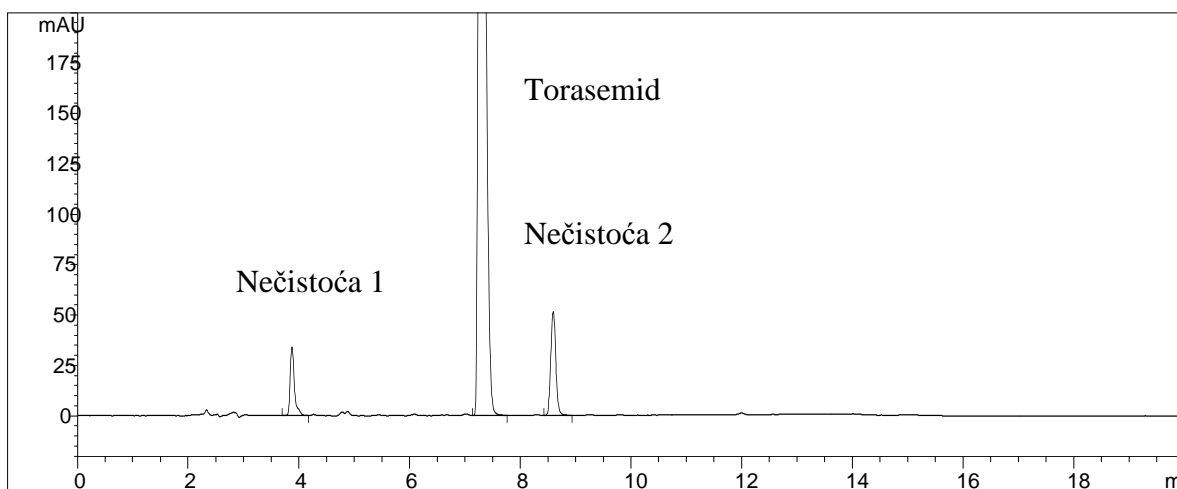
4.4.2. Fotodegradacija

Pod *ICH* uslovima, torasemid u rastvoru nije pokazao nikakvu degradaciju ni posle 7 dana. Uporedo sa stresiranim uzorcima analizirani su i blank rastvor, blank rastvor podvrgnut stres studiji na isti način kao i uzorci, radni standardni rastvor torasemida, te tamna kontrola (rastvor uzorka čuvan u frižideru i zaštićen od svetlosti).

Stabilnost torasemida prema stres uslovima fotolize potvrđena je i na farmaceutski aktivnoj supstanci u čvrstom obliku i na farmaceutskom doziranom obliku (torasemid tablete). Studije su trajale 21 dan, bez znakova degradacije.

4.4.3. Oksidacija

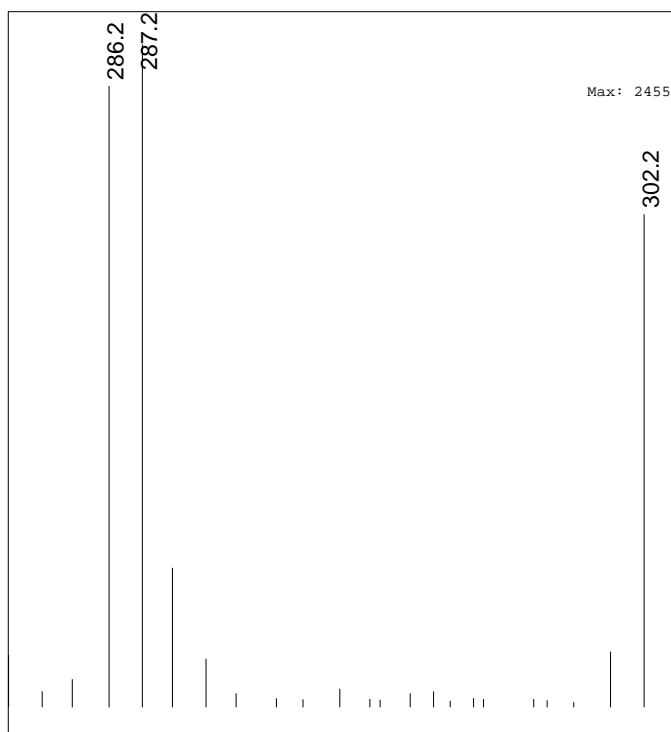
Ispitivanja studija oksidativne degradacije izvršena su sa rastvorima vodonik peroksida koncentracije 3%, kao što je i predloženo u literaturi [60, 61]. Degradacija torasemida pri tim uslovima nije postignuta. Sa druge strane, povećanjem koncentracije vodonik peroksida povećava se i osetljivost torasemida na oksidaciju. Posle 7 dana izlaganja uzoraka rastvoru vodonik peroksida 10%, na sobnoj temperaturi, postignuta je ukupna degradacija od 9.4%. Na HPLC/UV hromatogramu uočavaju se dva pika, sa RRt 0.53 i 1.18 (slika 44). Pored stresiranih uzoraka, analizirani su i blank rastvor, blank rastvor podvrgnut stres studiji na isti način kao i uzorci i radni standardni rastvor torasemida.



Slika 44. Hromatogram stresiranog uzorka torasemida (10% H₂O₂, 7 dana)

Sa ciljem potpune identifikacije dobijenih pikova primenjena je i analiza sa masenom detekcijom. Komponenta na RRt 0.53 (nečistoća 1) je bila teška za analizu sa stanovišta potrebne energije za njenu jonizaciju i fragmentaciju. Zbog toga je bilo neophodno primeniti veliku jonizacionu energiju, kako za kvadrupolni maseni analizator, tako i za jonski trap. Dva jona u malim količinama detektovana su na masenom spektru: joni na m/z 302 i 286 (slika 45). Iz hemijske strukture nečistoće R2 zaključeno je da postoji mogućnost građenja N-oksida (nečistoća R2-N-oxid). Sa druge strane, na većim energijama fragmentacije povećava se mogućnost formiranja adukt jona (npr. sa natrijumom), što bi bilo objašnjenje za jon na m/z 302 [M+Na]⁺. Fragmentni jon na m/z 286 može nastati kao

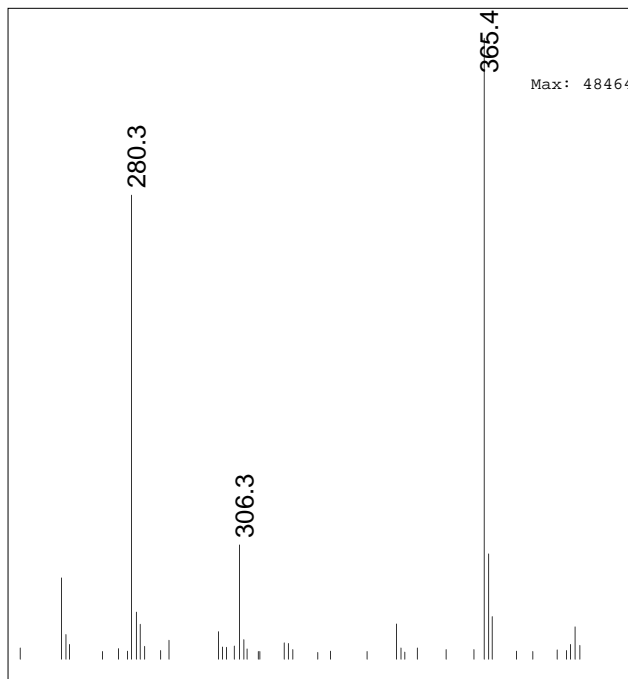
posledica gubitka atoma kiseonika iz N-oksida funkcionalne grupe. Dalja karakterizacija nije rađena, s obzirom da nečistoća 1 nastaje oksidativnom degradacijom degradacionog proizvoda R2, a ne degradacijom torasemida.



Slika 45. ESI⁺ maseni spektar nečistoće 1 (RRt 0.53), dobijen na kvadrupolnom masenom analizatoru

PDA spektar pika komponente na RRt 1.18 (nečistoća 2) je vrlo sličan spektru torasemida, ukazujući na osnovnu strukturu torasemida. Kako je komponenta stvorena procesom oksidativne degradacije, pretpostavka je bila da dobijeni degradacioni proizvod ima kiseonik vezan na molekulu torasemida (torasemid N-oksida). Potvrda je dobijena snimanjem masenog spektra: pik je pokazao molekulski jon na m/z 365 [M+H]⁺ i fragmentne jone na m/z 306 i 280 (slika 46). Ova razlika od 16 u odnosu na odgovarajuće jone torasemida (molekulski jon na m/z 349 [M+H]⁺ i fragmentni joni na m/z 290 i 264), dokaz je vezivanja kiseonika i sličnog puta fragmentacije. Dodatna potvrda sličnog

fragmentacionog puta je dobijena i HPLC/MS/MS analizom (jonski trap), a rezultati su prikazani u tabeli 22.



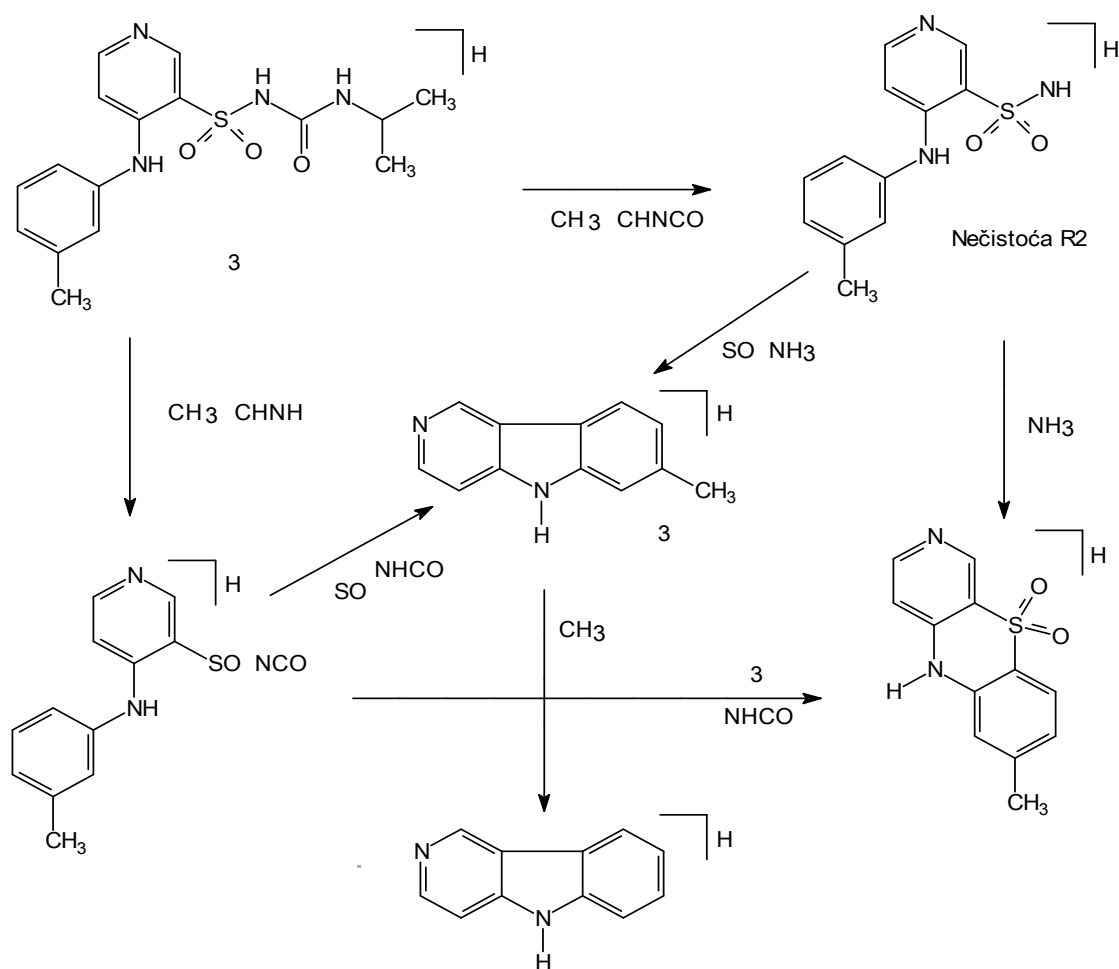
Slika 46. ESI⁺ maseni spektar nečistoće 2 (RRt 1.18), dobijen na kvadrupolnom masenom analizatoru

Tabela 22. HPLC/MS/MS fragmentacija nečistoće 2 i torasemida

Supstanca	Molekulski jon	Koliziona energija	MS ² (intenzitet jona)	Koliziona energija	MS ³ (intenzitet jona)
Nečistoća 2	365	30	280 (100)	35	263 (100)
					246 (25)
			306 (40)	40	289 (100)
					246 (30)
Torasemid	349	30	264 (100)	40	247 (85)
					230 (55)
					219 (100)
					183 (30)
					201 (25)
			290 (40)	37	247 (85)
					230 (60)
					219 (100)
					183 (30)
					201 (30)

4.4.4. Fragmentacija torasemida i degradacionog proizvoda R2

Prisustvo sličnih fragmentnih jona u masenim spektrima (tabele 21 i 22) ukazuje na sličnu strukturu i put fragmentacije torasemida i degradacionih proizvoda. Fragmentacija torasemida počinje cepanjem bočne NH–CO grupe u strukturi uree (m/z 290), a nastavlja eliminacijom bočne karbonilne grupe (m/z 264). Nakon toga postoje dva moguća puta stvaranja dodatnih fragmenata: jedan je ciklizacija između pozicije 5 u piridinu i pozicije 6 u benzolovom prstenu (m/z 183), a drugi je ciklizacija između bočne sulfonamidne grupe i pozicije 2 u benzolovom prstenu (m/z 247). Konačno, fragment m/z 168 nastaje od fragmenta m/z 183 eliminacijom preostale metil grupe [73]. Sličan fragmentacioni put je predložen i za degradacioni proizvod R2, kako je i prikazano na slici 47.

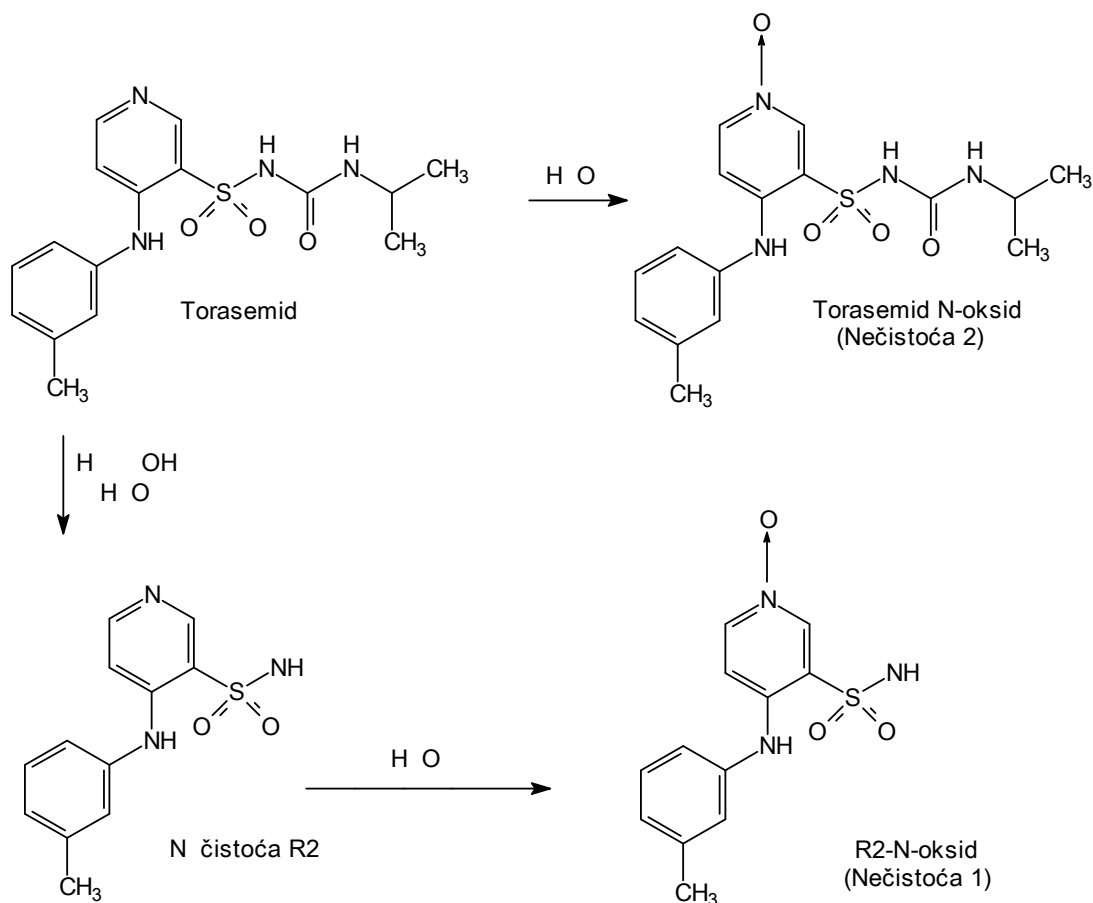


Slika 47. Šema fragmentacije torasemida i degradacionog proizvoda R2

4.4.5. Predloženi put degradacije za torasemid

Degradacijom torasemida dobijaju su tri degradaciona proizvoda: nečistoća R2, nečistoća 1 (nečistoća R2-N-oksid) i nečistoća 2 (torasemid N-oksid).

U hemijskoj strukturi torasemida postoji jedna slaba veza gde se može očekivati hidroliza. Funkcionalna grupa sulfonilurea podleže procesu hidrolize u kiselim uslovima. U prisustvu vode dolazi do cepanja bočne NH–CO grupe u strukturi uree, pri čemu nastaje odgovarajući amin i derivat karbonske kiseline. U kiselim uslovima gubitkom ugljen dioksida iz ovog derivata stvara se odgovarajući sulfonamid [62]. Hidroliza se dešava i u neutralnim i baznim uslovima, ali samo sa povećanjem temperature (70 °C). Proizvod hidrolize je nečistoća R2 (slika 48).



Slika 48. Predloženi put degradacije torasemida

Sa druge strane, u prisustvu vodonik peroksida, piridin može podleći procesu oksidacije pri čemu nastaju N-oksidi (slika 48). Mehanizam uključuje nukleofilni napad slobodnih elektrona azota na peroksidnu kiselinu. Oksidacija je takođe moguća i na funkcionalnoj grupi sekundarnog amina rezultujući stvaranjem hidrosilamina, ali ovo nije uobičajeni degradacioni put. Hidrosilamini se teško izoluju i detektuju [62].

4.5. RAZVOJ I OPTIMIZACIJA STABILITY-INDICATING METODE ZA TORASEMID

Dobijeni degradacioni profil torasemida u studiji forsirane degradacije poslužio je za razvijanje nove metode za praćenje stabilnosti (*stability-indicating* metoda) farmaceutski aktivne supstance torasemida i odgovarajućeg farmaceutskog doziranog oblika (torasemid tablete). Razvoj i optimizacija *stability-indicating* metode, koja će omogućiti uspešno razdvajanje torasemida od potencijalnih degradacionih proizvoda i njihovo određivanje, izvršena je primenom eksperimentalnog dizajna i metodologije multikriterijumskog odlučivanja.

4.5.1. Screening faza eksperimenta

Preliminarna ispitivanja su pokazala da na hromatografsko ponašanje torasemida i njegovih ključnih degradacionih proizvoda najviše uticaja imaju zastupljenost acetonitrila i pufera (amonijum formijata) u mobilnoj fazi, pH mobilne faze i temperatura kolone. Ispitivanje uticaja ovih faktora na sistem izvršeno je uz pomoć frakcionog faktorskog dizajna (FFD) 2^{4-1} . Nivoi za svaki od ispitivanih faktora su izabrani tokom preliminarnih ispitivanja. Ukupno je izvedeno 8 eksperimenata uz dodatna 4 ponavljanja u centralnoj tački da bi se izračunala standardna greška, a posmatrani odgovori sistema su bili retencioni faktori (k') ispitivanih supstanci. U tabelama 23 i 24 su dati ispitivani faktori i njihovi nivoi, odnosno dobijeni retencioni faktori za torasemid i degradacione proizvode.

Tabela 23. FFD 2^{4-1} , ispitivani faktori i nivoi

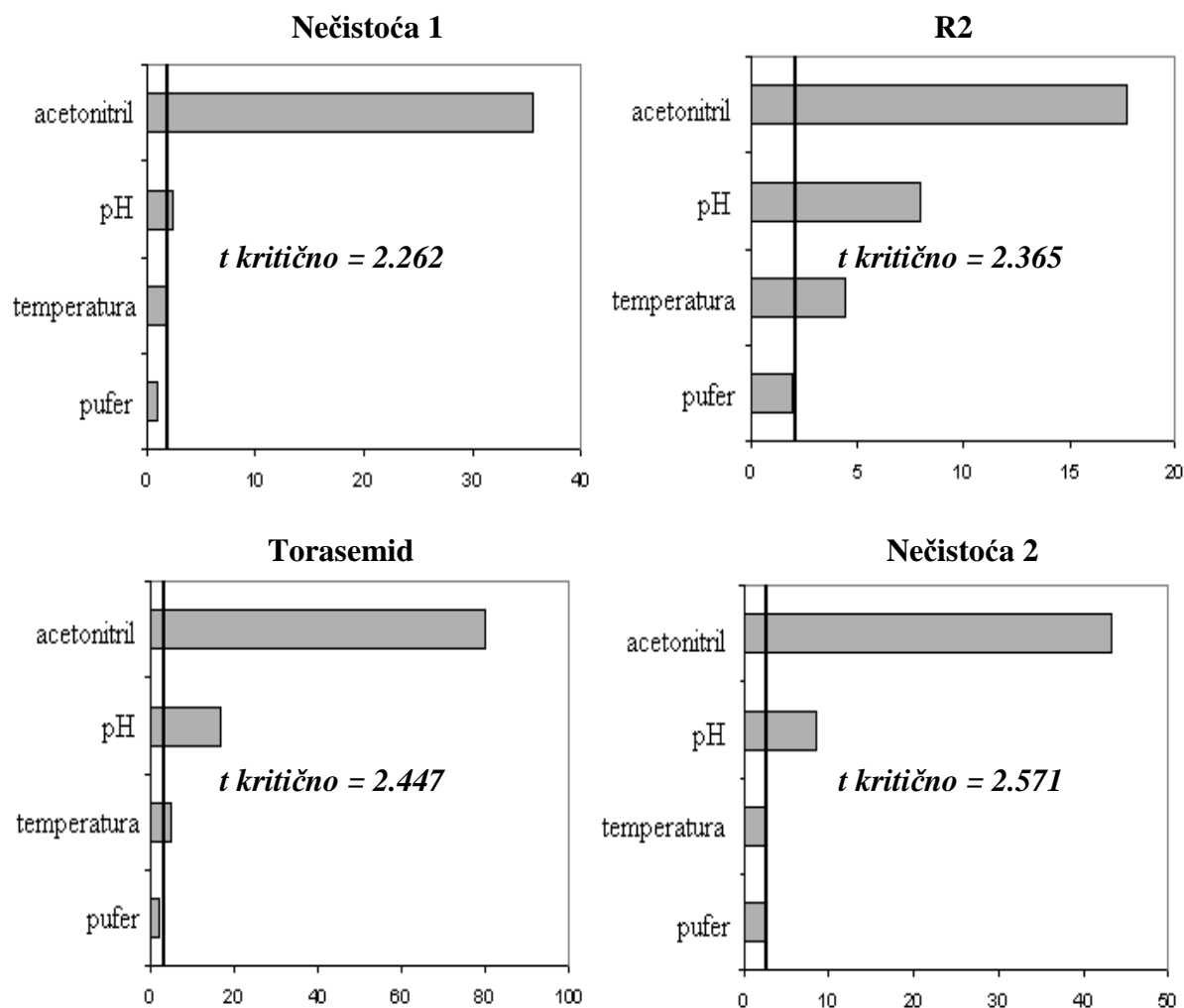
Redni broj eksperimenta	Ispitivani faktori			
	Acetonitril (%)	pH	Temperatura (°C)	Pufer (mM)
1.	30	2	40	10
2.	30	4	40	0
3.	30	4	20	10
4.	30	2	20	0
5.	60	4	40	10
6.	60	4	20	0
7.	60	2	20	10
8.	60	2	40	0
9.*	45	3	30	5

* četiri ponavljanja u centralnoj tački

Tabela 24. Retencioni faktori torasemida i degradacionih proizvoda

Redni broj eksperimenta	Retencioni faktori			
	Nečistoća 1	R2	Torasemid	Nečistoća 2
1.	0.94	1.27	4.61	7.27
2.	0.96	1.59	3.22	6.03
3.	1.04	2.54	3.34	4.75
4.	1.04	1.50	5.11	8.69
5.	0.22	0.70	0.43	0.29
6.	0.26	0.79	0.54	0.68
7.	0.22	0.52	0.73	0.86
8.	0.21	0.38	0.55	0.71
9.	0.35	0.80	0.97	1.37
10.	0.35	0.80	0.98	1.38
11.	0.34	0.79	0.96	1.36
12.	0.33	0.79	0.95	1.35

Značajnost dobijenih koeficijenata matematičkih modela za sve dobijene retencione faktore ispitivanih supstanci, a samim tim i odgovarajućih faktora, procenjena je *Student*-ovim *t*-testom. Izračunate *t*-vrednosti su upoređene sa kritičnom tabelarnom *t*-vrednošću. Koeficijenti, odnosno faktori čija je izračunata *t*-vrednost veća od tabelarne smatraju se statistički značajnim. Rezultati eksperimenata se mogu predstaviti i grafički, u vidu *Pareto* dijagrama (slika 49).



Slika 49. *Pareto* dijagrami izračunatih *t*-vrednosti za koeficijente matematičkih modela retencionih faktora za torasemid i degradacione proizvode

Na osnovu *Pareto* dijagrama, uočava se da procenat acetonitrila u mobilnoj fazi ima najveći uticaj na hromatografsko ponašanje svih ispitivanih supstanci. Statistički značajan uticaj ispoljava i pH mobilne faze, dok temperatura kolone utiče na torasemid i R2. Promena koncentracije pufera nema statistički značajan uticaj na retencione faktore, pa je u daljim eksperimentima koncentracija amonijum formijata od 10 mM održavana konstantnom. Prva tri faktora su dalje ispitivana primenom optimizacionog dizajna.

4.5.2. Primena centralnog kompozicionog dizajna u optimizacionoj fazi eksperimenta

Centralni kompozicioni dizajn i metodologija površine odgovora primenjeni su u optimizacionoj fazi eksperimenta. Ispitivani faktori i njihovi nivoi su prikazani u tabeli 25.

Tabela 25. Centralni kompozicioni dizajn, ispitivani faktori i nivoi

Redni broj eksperimenta	Ispitivani faktori		
	Acetonitril (%)	pH	Temperatura (°C)
1.	60.0	3.0	27.5
2.	30.0	3.0	27.5
3.	45.0	3.0	15.0
4.	53.9	3.6	20.0
5.	45.0	3.0	40.0
6.	36.1	2.4	20.0
7.	45.0	4.0	27.5
8.	36.1	2.4	34.9
9.	53.9	2.4	34.9
10.	53.9	3.6	34.9
11.	53.9	2.4	20.0
12.	45.0	2.0	27.5
13.	36.1	3.6	20.0
14.	36.1	3.6	34.9
15.*	45.0	3.0	27.5

* šest ponavljanja u centralnoj tački

Izabrani faktori (procenat acetonitrila u mobilnoj fazi, pH mobilne faze i temperatura kolone) su u *screening* fazi eksperimenta pokazali statistički značajan uticaj na hromatografsko ponašanje ispitivanih supstanci, pa je njihova dalja optimizacija izvršena upotrebom centralnog kompozicionog dizajna. Svi eksperimenti su izvedeni randomiziranim redosledom, sa 6 ponavljanja u centralnoj tački, tako da je ukupan broj eksperimenata bio 20. Radi dobijanja većeg broja informacija praćeno je više odgovora sistema: retencioni faktori nečistoća 1 i 2, odnosno rezolucija između kritičnih pikova (torasemid/R2 i torasemid/nečistoća 2). Odgovori sistema su prikazani u tabeli 26.

Tabela 26. Centralni kompozicioni dizajn, odgovori sistema

Redni broj eksperimenta	Retencioni faktori		Rezolucija	
	Nečistoća 1	Nečistoća 2	Torasemid /R2	Torasemid /Nečistoća 2
1.	0.17	0.54	1.20	1.20
2.	1.07	7.86	15.26	12.55
3.	0.35	1.63	2.07	4.77
4.	0.22	0.50	4.98	0.00
5.	0.38	1.38	3.95	4.26
6.	0.62	4.34	10.53	7.33
7.	0.29	0.78	3.63	0.00
8.	0.58	3.69	11.25	7.61
9.	0.20	0.86	2.87	2.45
10.	0.20	0.44	4.23	1.21
11.	0.21	0.97	2.72	2.19
12.	0.31	1.67	6.70	4.21
13.	0.60	2.40	1.72	4.90
14.	0.58	2.03	2.71	2.91
15.	0.33	1.41	2.83	4.54
16.	0.31	1.34	2.56	4.31
17.	0.34	1.43	2.89	4.57
18.	0.32	1.36	2.70	4.41
19.	0.32	1.38	2.72	4.44
20.	0.33	1.41	2.85	4.56

Višestrukom regresionom analizom definisana je veza između kodiranih faktora i ispitivanih odgovora sistema, koja se najbolje može opisati sledećim matematičkim modelima:

$$\ln(k'N1) = -1.14 - 0.54x_1 - 0.0072x_2 - 0.0078x_3 + 0.0099x_1x_2 - 0.0054x_1x_3 - 0.0017x_2x_3 + 0.097x_1^2 - 0.028x_2^2 + 0.042x_3^2 \quad (17)$$

gde $\ln(k'N1)$ predstavlja prirodni logaritam retencionog faktora nečistoće 1,

$$\ln(k'N2) = 0.33 - 0.77x_1 - 0.30x_2 - 0.063x_3 - 0.018x_1x_2 + 0.010x_1x_3 - 0.002x_2x_3 + 0.13x_1^2 - 0.12x_2^2 + 0.014x_3^2 \quad (18)$$

gde $\ln(k'N2)$ predstavlja prirodni logaritam retencionog faktora nečistoće 2,

$$Rs = 2.99 - 1.80x_1 - 1.26x_2 + 0.32x_3 + 2.83x_1x_2 - 0.27x_1x_3 - 0.094x_2x_3 + 0.90x_1^2 + 0.83x_2^2 + 0.072x_3^2 \quad (19)$$

gde Rs predstavlja rezoluciju između torasemida i R2,

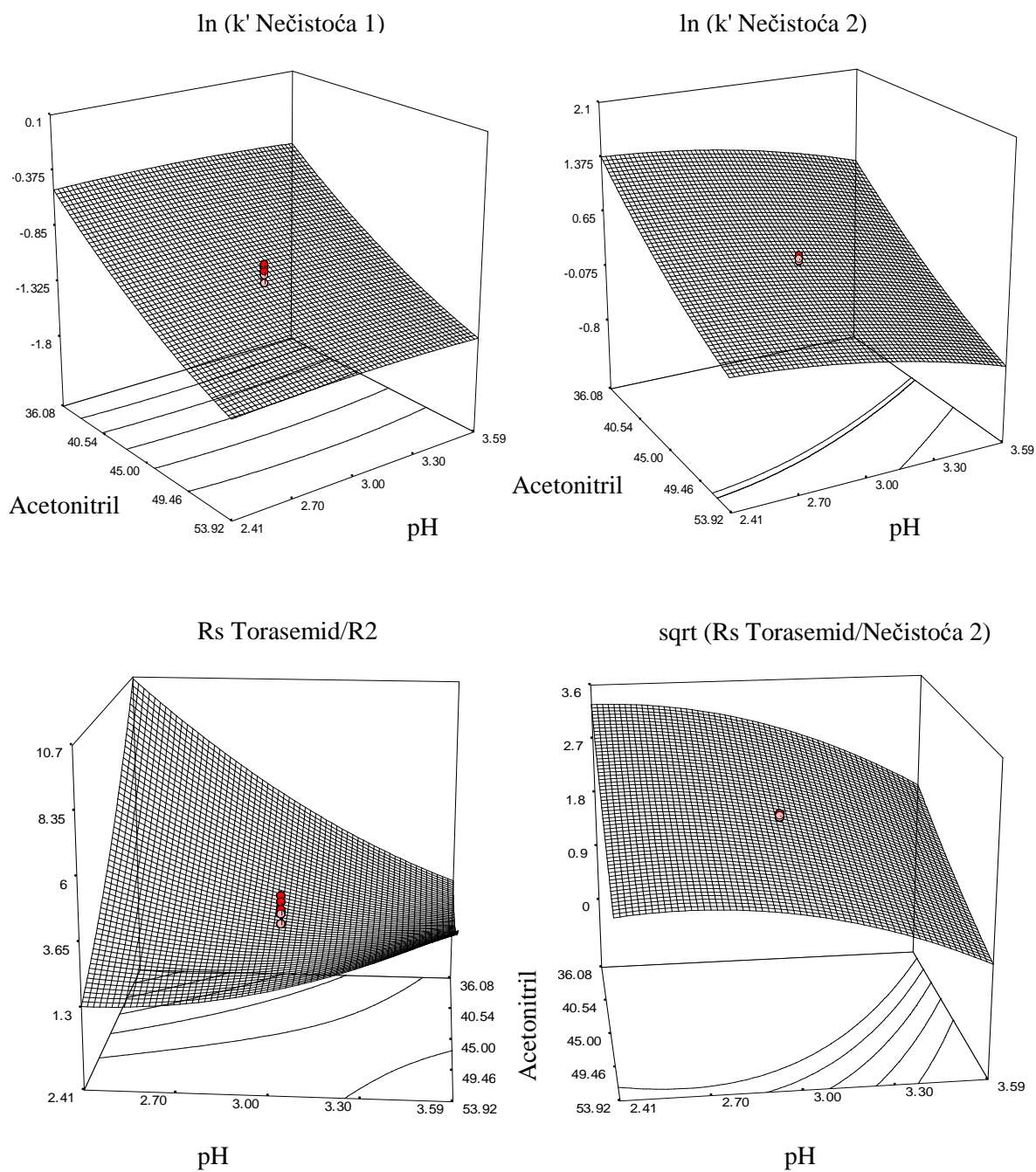
$$\sqrt{Rs} = 2.11 - 0.73x_1 - 0.62x_2 + 0.028x_3 + 0.14x_1x_2 + 0.27x_1x_3 + 0.25x_2x_3 + 0.072x_1^2 - 0.39x_2^2 - 0.040x_3^2 \quad (20)$$

gde \sqrt{Rs} predstavlja kvadratni koren rezolucije između torasemida i nečistoće 2,

x_1 predstavlja procenat acetonitrila u mobilnoj fazi, x_2 pH mobilne faze, a x_3 temperaturu kolone.

Odgovori sistema su opisani kvadratnim matematičkim modelima, odnosno polinomima drugog reda. Veća vrednost koeficijenta u polinomu znači i veći uticaj faktora na odgovor sistema. Konkretno, povećanje procenta acetonitrila u mobilnoj fazi i povećanje pH mobilne faze dovode do smanjenja svih odgovora sistema. Sa druge strane, povećanje temperature kolone dovodi do smanjenja retencionih faktora za nečistoće 1 i 2, ali i povećava rezoluciju između ispitivanih supstanci.

Dobijeni rezultati se radi bolje vizuelizacije mogu predstaviti i grafički, kao površine odgovora za sve ispitivane odgovore sistema u zavisnosti od dva faktora koji najviše utiču na posmatrani odgovor (slika 50).



Slika 50. 3-D grafici ispitivanih odgovora sistema u funkciji pH i procenta acetonitrila u mobilnoj fazi, pri konstantnoj temperaturi od 27.5 °C

Sa 3-D grafika se može zaključiti da faktorske interakcije statistički značajno ne utiču na retencione faktore nečistoća 1 i 2, dok imaju veliki uticaj na rezoluciju između torasemida i R2 i nešto manje na rezoluciju između torasemida i nečistoće 2.

Za ispitivane odgovore sisteme proverena je adekvatnost izabranog modela, odnosno koliko dobro izabrani model opisuje ponašanje hromatografskog sistema i eksperimentalno dobijene rezultate. Softverski su izračunate vrednosti R^2 i $adj. R^2$ za sve odgovore sistema, a dobijene vrednosti su prikazane u tabeli 27.

Tabela 27. Vrednosti koeficijenta korelacije R^2 i $adj. R^2$

Odgovor sistema	R^2	$adj. R^2$
ln (k' Nečistoća 1)	0.9922	0.9852
ln (k' Nečistoća 2)	0.9975	0.9953
Rs Torasemid/R2	0.9770	0.9562
sqrt (Rs Torasemid/Nečistoća 2)	0.9997	0.9994

Imajući u vidu da su za sve odgovore sistema odgovarajuće R^2 i $adj. R^2$ vrednosti vrlo bliske vrednosti 1 dokazano je da izabrani matematički modeli adekvatno opisuju eksperimentalne podatke.

4.5.3. Primena metodologije multikriterijumskog odlučivanja

Optimizacija jednog hromatografskog sistema zahteva dobro razdvajanje ispitivanih supstanci u najkraćem mogućem vremenu trajanja analize. Da bi se to ostvarilo, bilo je potrebno optimizovati više faktora istovremeno, odnosno ispuniti više ciljeva u isto vreme. U svrhu višestruke optimizacije sistema primenjena je metodologija multikriterijumskog odlučivanja (eng. *multicriteria methodology*), odnosno *Derringer*-ova funkcija poželjnih odgovora kao najčešće korišćena u optimizaciji analitičkih metoda [74, 75]. Multikriterijumska evaluacija podrazumeva izračunavanje funkcija poželjnih odgovora za svaki posmatrani odgovor sistema, za šta je potrebno postaviti zahteve, odnosno ciljeve koje

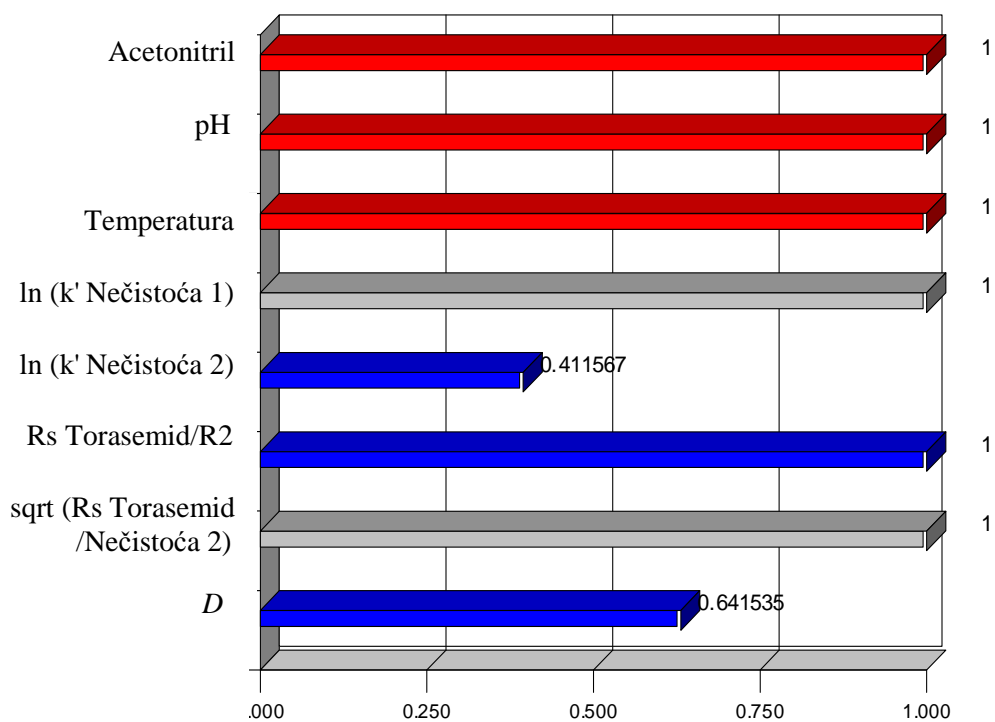
svaki odgovor sistema treba da ispuni. Posmatrani odgovori i ciljevi u svrhu multikriterijumskog pristupa optimizaciji metode prikazani su u tabeli 28.

Tabela 28. Multikriterijumski pristup u optimizaciji metode, posmatrani odgovori sistema i postavljeni ciljevi

Odgovor sistema	Cilj	Donja granica	Gornja granica
ln (k' Nečistoća 1)	u opsegu	-0.52	-0.4
ln (k' Nečistoća 2)	minimalan odgovor	-0.82	2.06
Rs Torasemid/R2	maksimalan odgovor	1.5	5
sqrt (Rs Torasemid/Nečistoća 2)	u opsegu	1	3

Prvi postavljeni cilj je bio da se dobije maksimalna vrednost za retencioni faktor pika koji se prvi eluira sa kolone (Nečistoća 1), da bi se sprečilo njegovo preklapanje sa pikom mobilne faze. Drugi cilj je bio postići najkraće moguće trajanje hromatografske analize traženjem minimalne vrednosti za retencioni faktor pika koji poslednji eluira sa kolone (Nečistoća 2). Treći i četvrti cilj je bio postići dobro razdvajanje između pikova torasemida, R2 i Nečistoće 2. Kako su svi ciljevi bili podjednako značajni, to im je i dodeljena relativna značajnost od 1.

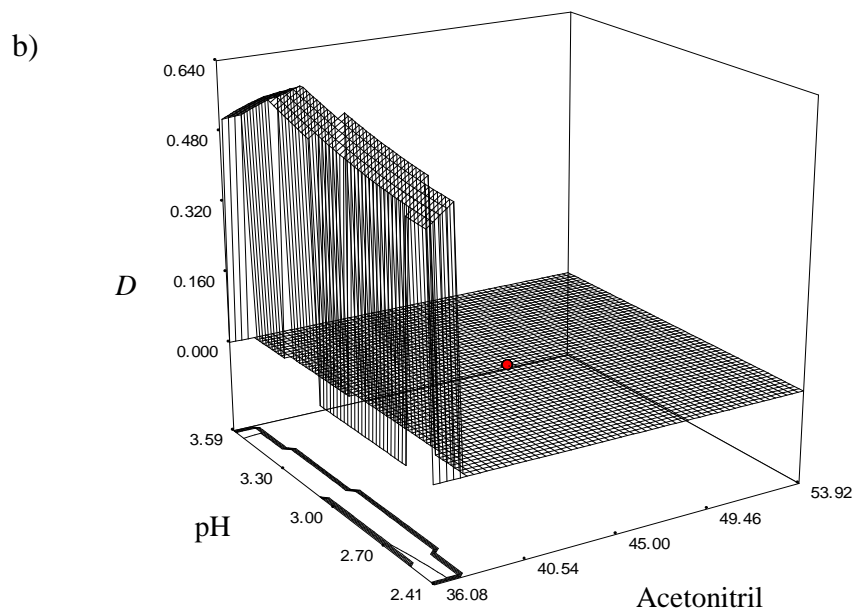
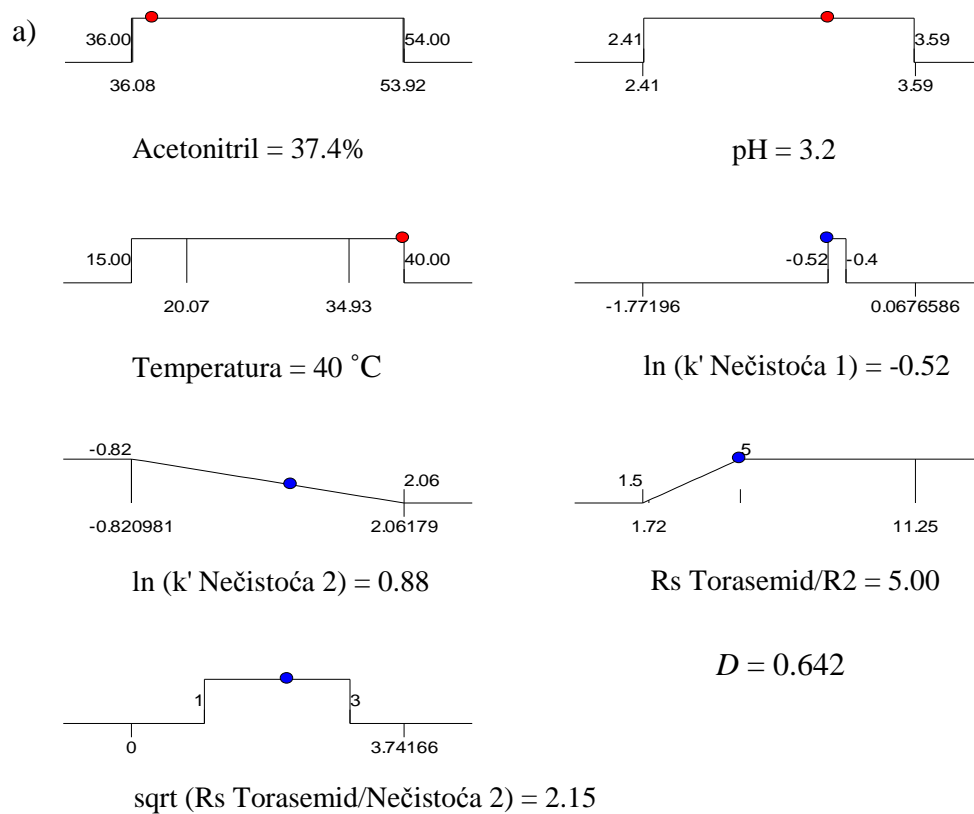
Za svaki od postavljenih ciljeva izračunate su pojedinačne funkcije poželjnih odgovora, kao i ukupna funkcija poželjnih odgovora (D). Što je vrednost D bliža vrednosti 1 to je svaki posmatrani odgovor sistema bliži ispunjenju postavljenih kriterijuma. Vrednosti pojedinačnih i ukupne funkcije poželjnih odgovora su radi bolje vizuelizacije prikazane kao *Pareto* dijagram na slici 51.



Slika 51. *Pareto* dijagram vrednosti pojedinačnih i ukupne funkcije poželjnih odgovora (D) za posmatrane odgovore sistema

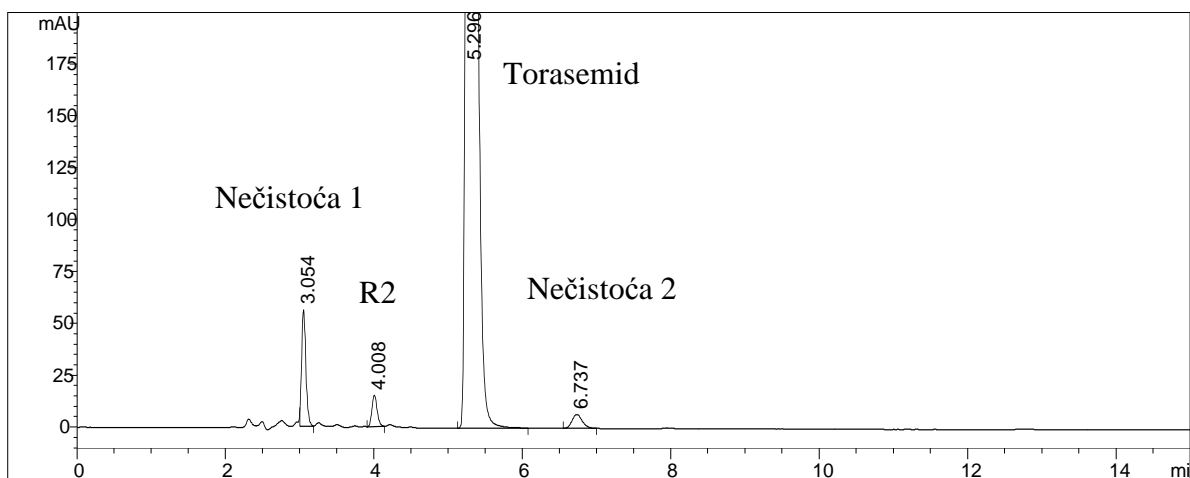
Pri vrednostima ispitivanih faktora od 37.4% acetonitrila, pH 3.2 i temperature kolone od 40 °C svi pojedinačni ciljevi osim retencionog faktora Nečistoće 2 su maksimalno ispunjeni. Vrednosti pojedinačne funkcije poželjnih odgovora za retencionni faktor Nečistoće 2, kao i vrednost ukupne funkcije poželjnih odgovora se prema *Harrington*-ovoj tabeli smatraju prihvatljivim [76]. Pri datim hromatografskim uslovima ostvaruje se najkraće moguće vreme trajanja analize (oko 7 minuta) uz dobro razdvajanje svih ispitivanih supstanci.

Grafički prikaz zadovoljenja hromatografskih ciljeva i 3-D dijagram zavisnosti ukupne funkcije poželjnih odgovora (D) od procenta acetonitrila u mobilnoj fazi i pH mobilne faze dati su na slici 52a, odnosno 52b.



Slika 52. a) grafički prikaz zadovoljenja hromatografskih ciljeva, b) 3-D dijagram zavisnosti ukupne funkcije poželjnih odgovora (D) od procenta acetonitrila i pH mobilne faze

Eksperimentalni dizajn i multikriterijumski pristup u odlučivanju pomogli su pronalaženje optimalnih hromatografskih uslova i razvoj *stability-indicating* metode za praćenje stabilnosti farmaceutski aktivne supstance torasemida i farmaceutskog doziranog oblika (torasemid tablete). Za razvoj i optimizaciju *stability-indicating* metode korišćen je radni rastvor koji je sadržavao smešu torasemida i degradacionih proizvoda, a dobijen je iz stresiranih uzoraka nastalih oksidativnom degradacijom i kiselim hidrolizom. Na slici 53 prikazan je hromatogram radnog rastvora torasemida i degradacionih proizvoda pri optimalnim hromatografskim uslovima (sekcija 3.7.5.).



Slika 53. Hromatogram radnog rastvora torasemida i degradacionih proizvoda

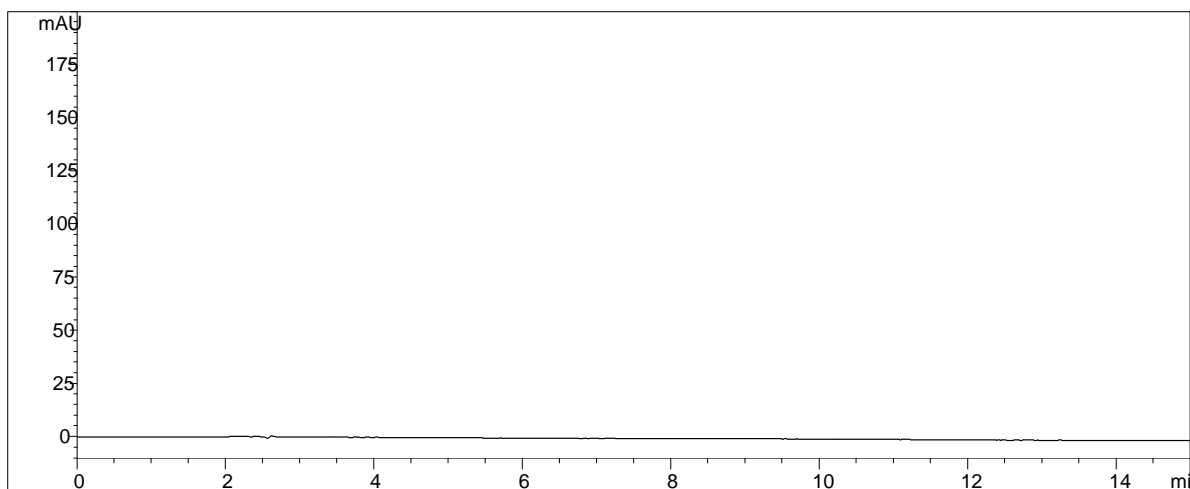
4.6. VALIDACIJA *STABILITY-INDICATING* METODE ZA TORASEMID

Nakon što su ustanovljeni optimalni hromatografski uslovi, validacija HPLC/UV *stability-indicating* metode za torasemid izvršena je u skladu sa *ICH* regulativom [31], a ispitivani su parametri metode: selektivnost, linearnost i opseg, preciznost, tačnost, limiti detekcije i kvantifikacije.

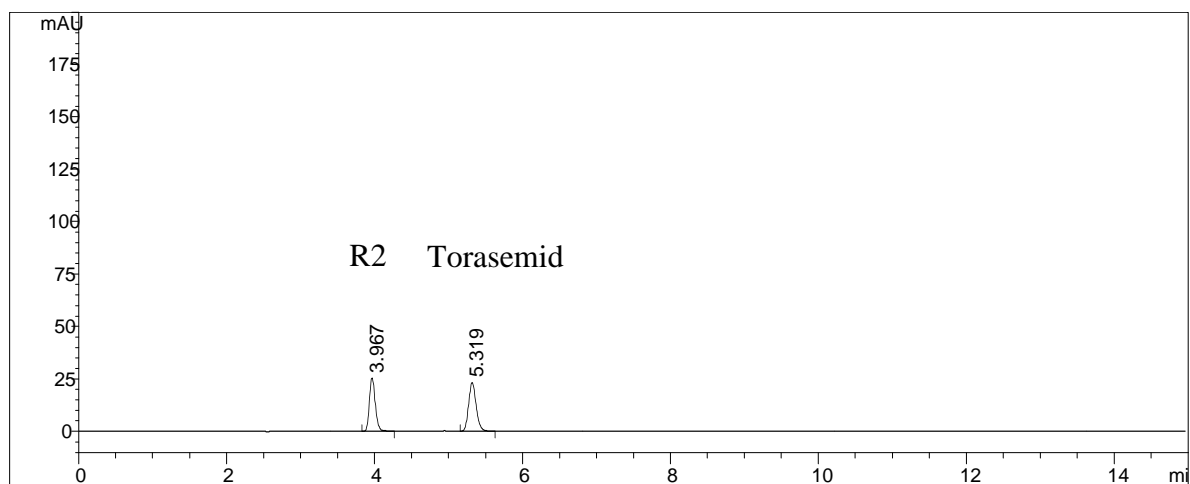
4.6.1. Ispitivanje selektivnosti

Selektivnost metode je ispitana injiciranjem rastvora placeba, rastvora uzorka i radnog rastvora standardnih supstanci koji je sadržavao torasemid i nečistoću R2 u koncentracijama 0.001 mg/ml. Selektivnost se potvrđuje ukoliko nema interferencija od

strane komponenata placeba, odnosno ukoliko na hromatogramu rastvora placeba nema pikova čija retencionna vremena odgovaraju retencionim vremenima za torasemid i nečistoću R2. Hromatogrami rastvora placeba i radnog rastvora standardnih supstanci za ispitivanje selektivnosti su prikazani na slikama 54 i 55.



Slika 54. Hromatogram rastvora placeba



Slika 55. Hromatogram rastvora standardnih supstanci za ispitivanje selektivnosti

Čistoća svih eluiranih pikova je praćena upotrebom PDA detektora i dokazano je da je čistoća svih pikova bila veća od 99%. Selektivnost metode je potvrđena jer na

hromatogramu rastvora placeba nema pikova čija retenciona vremena odgovaraju retencionim vremenima za torasemid i nečistoću R2.

4.6.2. Ispitivanje linearnosti i opsega metode

Ispitivanje linearnosti izvršeno je na pet standardnih rastvora različitih koncentracija za torasemid i nečistoću R2. Ispitivani opseg koncentracija određen je u skladu sa *ICH* regulativom [31, 72]: od 80–120% za torasemid (određivanje sadržaja) i 0.1–1.0% za torasemid i nečistoću R2 (ispitivanje stepena čistoće), u odnosu na radnu koncentraciju torasemida u rastvoru uzorka. Analizirana je zavisnost površine pikova (apsorbancije) ispitivanih supstanci u funkciji koncentracije. Kalibracione krive su konstruisane metodom najmanjih kvadrata, a svaka tačka kalibracione krive dobijena je kao srednja vrednost tri injektovanja odgovarajućih rastvora.

Regresiona analiza dobijenih podataka pokazala je da je metoda linearna u ispitivanom opsegu koncentracija, jer su koeficijenti linearnosti za sve kalibracione krive bili veći od 0.9995 (postavljeni zahtevi su bili da koeficijent linearnosti bude veći od 0.995).

Uz pomoć *Student*-ovog *t*-testa je izvršena analiza značajnosti odsečka na *y* – osi. Zaključeno je da odsečki na *y* – osi nisu statistički značajno različiti od nule, jer su za sve kalibracione krive izračunate *t*-vrednosti (t_b) manje od tabelarne *t*-vrednosti ($t_{tab} = 3.182$, $p = 0.05$). Parametri regresione analize prikazani su u tabeli 29.

Tabela 29. Parametri regresione analize

Supstanca	Opseg koncentracija (µg/ml)	Kalibraciona kriva $y = ax + b$	R^2	S_a	S_b	t_b
Torasemid	80 – 120	$y = 65.500x - 10.6$	0.9999	0.15	14.89	0.71
	0.1 – 1.0	$y = 102.044x + 0.543$	0.9995	1.37	0.84	0.88
R2	0.1 – 1.0	$y = 128.349x - 0.342$	0.9997	1.33	0.82	0.53

a nagib kalibracione krive, *b* odsečak, R^2 koeficijent linearnosti, S_a standardna devijacija nagiba, S_b standardna devijacija odsečka, t_b izračunata *t*-vrednost za odsečak, tabelarna *t* vrednost ($t_{tab} = 3.182$, $p = 0.05$)

4.6.3. Ispitivanje preciznosti metode

Preciznost, odnosno ponovljivost metode je ispitana analizom laboratorijske smeše radnih standardnih rastvora za ispitivanje preciznosti i tačnosti. Rastvori su sadržavali torasemid u koncentracijama 80, 100 i 120 µg/ml, odnosno torasemid i nečistoću R2 u koncentracijama 0.1, 0.5 i 1.0 µg/ml, kao i komponente placeba u odnosu koji odgovara sastavu pomoćnih komponenti u uzorku. Za svaki koncentracioni nivo napravljena su po tri rastvora koji su injicirani u hromatografski sistem po tri puta.

Izračunate standardne devijacije (SD) i relativne standardne devijacije (RSD), za sve ispitivane supstance i sve koncentracije, potvrdile su dobru preciznost metode u ispitivanom opsegu (kao zahtev za ponovljena određivanja torasemida postavljeno je da RSD vrednost bude manja od 2% (određivanje sadržaja), odnosno manja od 5% za torasemid i nečistoću R2 (ispitivanje stepena čistoće)). Statistički parametri koji opisuju preciznost metode prikazani su u tabeli 30.

Tabela 30. Rezultati ispitivanja preciznosti i tačnosti metode

Supstanca	Pripremljena koncentracija (µg/ml)	Nađena koncentracija±SD ¹ (µg/ml)	Recovery (%)	RSD (%)
Torasemid	80.100	79.970±0.001	99.83	0.10
	101.100	99.960±0.001	98.87	0.10
	120.300	119.333±0.001	99.20	0.97
	0.100	0.101±0.002	101.10	2.05
	0.510	0.495±0.014	97.06	1.44
	1.020	0.997±0.001	97.74	0.50
R2	0.099	0.096±0.004	96.97	2.23
	0.500	0.496±0.010	99.20	1.07
	1.010	0.985±0.022	97.52	1.10

¹ standardna devijacija ($n = 9$)

4.6.4. Ispitivanje tačnosti metode

Ispitivanje tačnosti metode izvršeno je sa standardnim rastvorima torasemida i nečistoće R2 korišćenih za ispitivanje preciznosti metode. Izračunavanjem procenta prinosa, odnosno *recovery* vrednosti (kao zahtev je postavljeno da *recovery* vrednost za torasemid bude između 98–102% (određivanje sadržaja), odnosno između 95–105% za torasemid i nečistoću R2 (ispitivanje stepena čistoće)) potvrđena je dobra tačnost metode u ispitivanom opsegu. Statističkom analizom izračunati su parametri koji prikazuju tačnost metode i dati su u tabeli 30.

4.6.5. Ispitivanje limita detekcije i kvantifikacije

Limiti detekcije i kvantifikacije određeni su eksperimentalno i procenom odnosa signal/šum. Rastvori koncentracija 0.02, 0.03, 0.06, 0.1 i 0.2 µg/ml za torasemid i nečistoću R2 injicirani su u hromatografski sistem i izračunate su vrednosti odnosa signal/šum. Limiti detekcije (*LOD*) i kvantifikacije (*LOQ*) ispitivanih supstanci su koncentracije koje su dale odnos signal/šum najmanje 3:1, odnosno 10:1. Vrednosti *LOD* i *LOQ* za torasemid i nečistoću R2 prikazane su u tabeli 31.

Tabela 31. Limiti detekcije (*LOD*) i kvantifikacije (*LOQ*) za ispitivane supstance

Supstanca	<i>LOD</i> (µg/ml)	<i>LOQ</i> (µg/ml)
Torasemid	0.035	0.100
R2	0.020	0.060

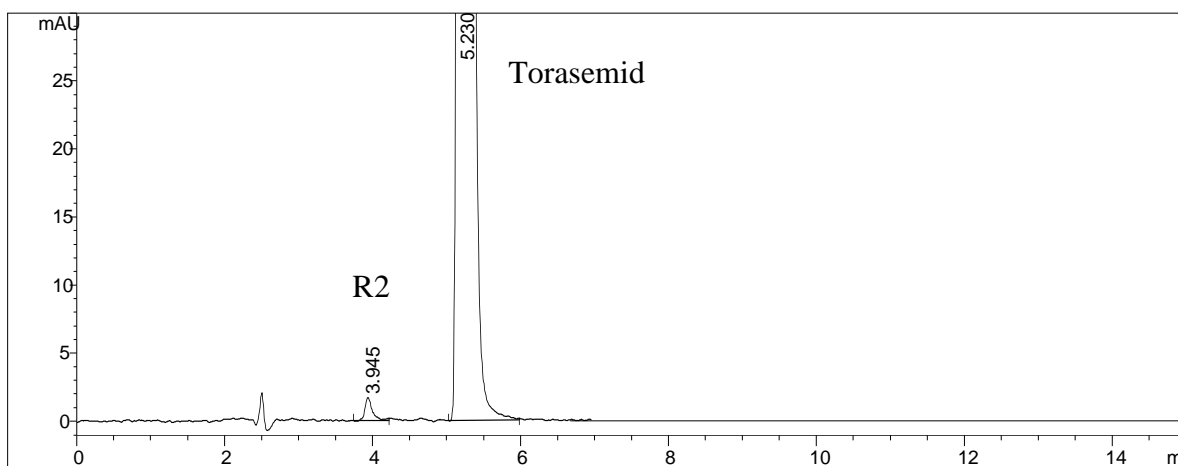
4.7. KVALITATIVNA I KVANTITATIVNA ANALIZA TORASEMID TABLETA STABILITY-INDICATING METODOM

Dobijene vrednosti validacionih parametara: selektivnosti, linearnosti, preciznosti i tačnosti, limita detekcije i kvantifikacije su u skladu sa unapred definisanim kriterijumima za validaciju metode i pokazuju da validirana HPLC/UV *stability-indicating* metoda odgovara planiranoj nameni za praćenje stabilnosti farmaceutski aktivne supstance torasemida i farmaceutskog doziranog oblika (torasemid tablete). Za potvrdu primenljivosti

razvijene metode za praćenje stabilnosti izvršena je kvalitativna i kvantitativna analiza torasemid tableta.

Pod navedenim hromatografskim uslovima (sekcija 3.7.5.), na hromatogramu pikova torasemida i nečistoće R2 mogu se izračunati hromatografski parametri koji obezbeđuju dobro razdvajanje i tačno određivanje ispitivanih supstanci: retencioni faktor, simetrija pika i rezolucija. Prvi pik na hromatogramu (nečistoća R2) ima retencioni faktor 0.90, što obezbeđuje dobro razdvajanje od pika mobilne faze. Simetrija pika je 0.80, a simetrija pika torasemida 0.83, čime je omogućena dobra integracija pikova i tačno određivanje. Rezolucija između dva pika je 7.88, mnogo više od vrednosti koja je uslov za razdvajanje na baznoj liniji (1.5).

Za relativno kratko vreme (manje od 10 minuta) u izokratskom sistemu eluiranja određen je sadržaj torasemida i potencijalnih degradacionih proizvoda u torasemid tabletama. Kvalitativna analiza je izvršena preko retencionih vremena na hromatogramima, kao i snimanjem UV spektara. Kvantitativna analiza je urađena preko površina pikova ispitivanih supstanci na PDA detektoru. Hromatogram rastvora uzorka prikazan je na slici 56, a dobijeni rezultati određivanja torasemida i potencijalnih degradacionih proizvoda iz torasemid tableta dati su u tabeli 32.



Slika 56. Hromatogram rastvora uzorka

Tabela 32. Rezultati određivanja torasemida i degradacionih proizvoda iz torasemid tableta

Supstanca	Nađeno po tableti (mg) ¹	% ²	RSD (%)
Torasemid	9.70	97.0	0.30
Degradacioni proizvodi ³	0.017	0.17	1.21

¹ ($n = 3$), ² u odnosu na deklarisanu količinu torasemida u tabletama, ³ nečistoća R2

Dobijene vrednosti za sadržaj torasemida i degradacionog proizvoda (nečistoća R2) zadovoljavaju definisane zahteve iz specifikacije leka. Prisustvo drugih degradacionih proizvoda nije detektovano.

5. ZAKLJUČAK

- Razvijene su i optimizovane HPLC/UV i HPLC/MS metode za određivanje torasemida i njegovih nečistoća: R2, R3, R4 i R6 u torasemid tabletama. Metode su razvijene uz upotrebu *screening* i optimizacionih vrsta eksperimentalnog dizajna. U *screening* fazi eksperimenta, za identifikaciju faktora koji imaju statistički značajan uticaj na hromatografsko ponašanje ispitivanih supstanci korišćen je 2^{4-1} frakcioni faktorski dizajn, a praćeni odgovori sistema su bili retencioni faktori svih ispitivanih supstanci. Dobijeni rezultati i *Pareto* dijagrami su pokazali da na hromatografski sistem značajno utiču procenat acetonitrila u mobilnoj fazi, pH mobilne faze i temperatura kolone. Slične hemijske strukture i hromatografsko ponašanje svih pet ispitivanih supstanci nametnulo je potrebu da se ustanovi sistem gradijentnog eluiranja. Faktori koji su dalje optimizovani upotrebom 3^2 punog faktorskog dizajna i metodologije površine odgovora bili su pH mobilne faze i temperatura kolone. Odgovori sistema koji su praćeni su retencioni faktori torasemida i nečistoća, odnosno rezulucija između kritičnog para (nečistoće R2 i R4). Višestrukom regresionom analizom i analizom varijanse (ANOVA) statistički su obrađeni dobijeni rezultati i konstruisani su 3-D grafikoni, odnosno površine odgovora na kojima se vizuelno mogu uočiti optimalne vrednosti ispitivanih faktora koji daju optimalnu separaciju između ispitivanih supstanci u prihvatljivom vremenu trajanja analize. Optimalni hromatografski uslovi su podrazumevali kolonu Zorbax SB C₁₈ (250 x 4.6 mm, 5 μm) i mobilnu fazu koja se sastoji od acetonitrila (A) i 10 mM vodenog rastvora amonijum formijata, pH 2.5 podešen sa mravljom kiselinom (B) u gradijentnom sistemu eluiranja: 0 minuta B30%, 11.2 minuta B60%, 11.3 minuta B30%, 21.0 minut B30%. Protok mobilne faze je 1 ml/minuti, temperatura kolone 25 °C, a talasna dužina detekcije 290 nm. Volumen injiciranja je podešen na 30 μl za HPLC/UV, odnosno 10 μl za HPLC/MS analizu.
- HPLC/UV i HPLC/MS metode su dalje validirane u skladu sa *ICH* smernicama radi potvrde njihove primenljivosti za određivanje sadržaja torasemida i njegovih nečistoća u torasemid tabletama. Ispitivani su parametri metoda: selektivnost, linearnost i opseg, preciznost, tačnost, limiti detekcije i kvantifikacije i robustnost. Ispitivani opseg koncentracija je bio od 70–130% za torasemid i 0.1–10% za nečistoće, u odnosu na

radnu koncentraciju torasemida u rastvoru uzorka. Koeficijent linearnosti za HPLC/UV metodu je bio veći od 0.9978, odnosno za HPLC/MS metodu veći od 0.9965, za sve ispitivane supstance. Obe metode su pokazale dobru preciznost u datom opsegu, jer se relativna standardna devijacija ponovljenih određivanja za sve ispitivane supstance kretala od 0.12–1.92% za HPLC/UV metodu, odnosno od 1.76–5.56% za HPLC/MS metodu. *Recovery* vrednosti za sve ispitivane supstance i koncentracije su bile u opsegu od 96.57–104.92% za HPLC/UV metodu, odnosno od 95.78–103.75% za HPLC/MS metodu, potvrđujući dobru tačnost metoda. Dobijeni limiti detekcije HPLC/UV metodom su u rasponu od 0.020–0.035 µg/ml, a limiti kvantifikacije od 0.060–0.100 µg/ml. HPLC/MS metodom su dobijeni limiti detekcije u rasponu od 0.0002–0.0004 µg/ml i limiti kvantifikacije od 0.0006–0.0012 µg/ml. Dobijeni rezultati validacije su pokazali da obe metode odgovaraju planiranoj nameni za određivanje sadržaja torasemida i njegovih nečistoća u torasemid tabletama.

- Studije forsirane degradacije farmaceutski aktivne supstance torasemida i farmaceutskog doziranog oblika (torasemid tablete) sprovedene su u skladu sa *ICH* smernicama. Ispitivana je stabilnost supstance i farmaceutskog doziranog oblika u čvrstom stanju i u rastvoru, u uslovima hidrolize (kisela, bazna i neutralna), termalne degradacije, oksidacije i fotodegradacije. Farmaceutski dozirani oblik je pokazao apsolutnu stabilnost u svim stres uslovima. Farmaceutski aktivna supstanca je pokazala degradaciju u uslovima kisele, bazne i neutralne hidrolize pri povišenoj temperaturi, kao i pri uslovima oksidativne degradacije.
- Identifikacija nastalih degradacionih proizvoda torasemida izvršena je primenom HPLC metode sa UV i masenom detekcijom, na osnovu retencionih vremena ispitivanih supstanci i odgovarajućih spektara na oba detektora. Nečistoća R2 je identifikovana kao proizvod hidrolitičke degradacije torasemida sa molekulskim jonom na m/z 264 i fragmentnim jonima na m/z 183 i 168. Oksidativnom degradacijom identifikovana su dva degradaciona proizvoda: nečistoća 1 sa molekulskim jonom na m/z 302 i

fragmentnim jonom na m/z 286 (nečistoća R2-N-oksidi) i nečistoća 2 sa molekulskim jonom na m/z 365 i fragmentnim jonima na m/z 306 i 280 (torasemid N-oksidi).

- Definirani su putevi degradacije torasemida. Hidrolitičkom degradacijom nastaje nečistoća R2. Hidrolizi podleže funkcionalna grupa sulfonilurea. U prisustvu vode dolazi do cepanja bočne NH-CO grupe u strukturi uree, pri čemu nastaje odgovarajući amin i derivat karbonske kiseline. U kiselim uslovima gubitkom ugljen dioksida iz ovog derivata stvara se odgovarajući sulfonamid. Hidroliza se dešava i u neutralnim i baznim uslovima, ali samo sa povećanjem temperature (70 °C). Sa druge strane, u prisustvu vodonik peroksida, piridin podleže procesu oksidacije pri čemu nastaju N-oksidi (torasemid N-oksidi i nečistoća R2-N-oksidi). Mehanizam uključuje nukleofilni napad slobodnih elektrona azota na peroksidnu kiselinu.
- Razvijena je i optimizovana HPLC/UV *stability-indicating* metoda za praćenje stabilnosti farmaceutski aktivne supstance torasemida i farmaceutskog doziranog oblika (torasemid tablete) kojom je moguće identifikovati torasemid i degradacione proizvode i odrediti njihov tačan sadržaj. Razvoj i optimizacija je izvršena uz upotrebu eksperimentalnog dizajna i metodologije multikriterijumskog odlučivanja. U *screening* fazi eksperimenta, za identifikaciju faktora koji imaju statistički značajan uticaj na hromatografsko ponašanje ispitivanih supstanci korišćen je 2^{4-1} frakcioni faktorski dizajn. Kao odgovori sistema praćeni su retencioni faktori svih ispitivanih supstanci. *Pareto* dijagrami su pokazali da na hromatografski sistem značajno utiču procenat acetonitrila u mobilnoj fazi, pH mobilne faze i temperatura kolone, pa su ovi faktori dalje optimizovani upotrebom centralnog kompozicionog dizajna. Odgovori sistema koji su praćeni bili su retencioni faktori ispitivanih supstanci i rezolucije između kritičnih pikova. Višestrukom regresionom analizom i analizom varijanse (ANOVA) statistički su obrađeni dobijeni rezultati i konstruisani su 3-D grafikoni, odnosno površine odgovora na kojima se vizuelno mogu uočiti optimalne vrednosti ispitivanih faktora koje daju optimalnu separaciju između ispitivanih supstanci u prihvatljivom vremenu trajanja analize. U svrhu višestruke optimizacije sistema primenjena je i metodologija

multikriterijumskog odlučivanja, odnosno *Derringer*-ova funkcija poželjnih odgovora kojom su definisani finalni optimalni uslovi: kolona Zorbax SB C₁₈ (250 x 4.6 mm, 5 μm) i mobilna faza koja se sastoji od acetonitrila i 10 mM vodenog rastvora amonijum formijata, pH 3.2 podešen sa mravljom kiselinom (37.4:62.6, v/v). Protok mobilne faze je 1 ml/minuti, temperatura kolone 40 °C, a talasna dužina detekcije 290 nm. Volumen injiciranja je 30 μl.

- HPLC/UV *stability-indicating* metoda je dalje validirana u skladu sa *ICH* smernicama. Ispitivani su parametri metode: selektivnost, linearnost i opseg, preciznost, tačnost, limiti detekcije i kvantifikacije. Ispitivani opseg koncentracija je bio od od 80–120% za torasemid (određivanje sadržaja) i 0.1–1.0% za torasemid i nečistoću R2 (ispitivanje stepena čistoće), u odnosu na radnu koncentraciju torasemida u rastvoru uzorka. Koeficijent linearnosti za ispitivane supstance je bio veći od 0.9995. Metoda je pokazala dobru preciznost u datom opsegu, jer se relativna standardna devijacija ponovljenih određivanja za ispitivane supstance kretala od 0.10–2.23%. *Recovery* vrednosti su bile u opsegu od 96.97–101.10%, potvrđujući dobru tačnost metode. Limiti detekcije su u rasponu od 0.020–0.035 μg/ml, a limiti kvantifikacije od 0.060–0.100 μg/ml. Dobijeni rezultati validacije su pokazali da HPLC/UV *stability-indicating* metoda odgovara planiranoj nameni za praćenje stabilnosti farmaceutski aktivne supstance torasemida i farmaceutskog doziranog oblika (torasemid tablete).

LITERATURA

- [1] PDR Staff, Physicians' desk reference, 62nd ed., Thomson Healthcare Inc., Montvale, NJ, 2007.
- [2] Brunton LL, Lazo JS, Parker KL, Goodman & Gilman's, The pharmacological basis of therapeutics, McGraw-Hill, United States of America, 11th ed., 2006.
- [3] Sweetman S, Martindale, The complete drug reference 36, E-Publishing, Pharmaceutical Press, London, 2009.
- [4] Knauf H, Mutshler E, Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of torasemide, Clin Pharmacokinet 34 (1998) 1–24.
- [5] Anderson PO, Knoben JE, Troutman WG, Handbook of clinical drug data, 10th ed., McGraw–Hill Companies, Inc., USA, 2002.
- [6] Beers MH, Berkow R, The Merck Manual of diagnosis and therapy, 17th ed., Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, USA, 1999.
- [7] Kordova M, Process for preparing torsemide intermediate, U.S. Pat. No. 6,670,478 B2, 2003.
- [8] Council of Europe, European Pharmacopoeia, 7th ed., Council of Europe, Strasbourg, 2011.
- [9] British Pharmacopoeia 2012, The Stationery Office, London, UK, 2011.
- [10] Kwang HL, Lee YK, Ryu JY, Lee DJ, Kang W, Lee SS, Yoon YR, Shin JG, Simple and sensitive assay of torasemide in human plasma by high–performance liquid chromatography using a monolithic silica column, Chromatogr 60 (2004) 639–643.
- [11] Engelhardt S, Meineke I, Brockmöller J, Improved solid–phase extraction and HPLC measurement of torasemide and its important metabolites, J Chromatogr B 831 (2006) 31–35.
- [12] Karnes HT, Farthing D, Besenfelder E, Solid phase extraction with automated elution and HPLC of torasemide and metabolites from plasma, J Liq Chrom 12 (1989) 1809–1818.
- [13] Barroso MB, Alonso RM, Jimenez RM, Simultaneous determination of torasemide and its major metabolite M5 in human urine by high–performance liquid chromatography–electrochemical detection, J Chromatogr Sci 39 (2001) 491–496.

- [14] Barroso MB, Alonso RM, Jimenez RM, Quantitative analysis of the loop diuretic torasemide in tablets and human urine by HPLC–EC, *J Liq Chrom Rel Technol* 19 (1996) 179–186.
- [15] Deventer K, Pozzo OJ, Van Eenoo P, Delbeke FT, Qualitative detection of diuretics and acidic metabolites of other doping agents in human urine by high–performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J Chromatogr A* 1216 (2009) 5819–5827.
- [16] Deventer K, Delbeke FT, Roels K, Van Eenoo P, Screening for 18 diuretics and probenecid in doping analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Biomed Chromatogr* 16 (2002) 529–535.
- [17] Deventer K, Van Eenoo P, Delbeke FT, Simultaneous determination of beta-blocking agents and diuretics in doping analysis by liquid chromatography/mass spectrometry with scan to scan polarity switching, *Rapid Commun Mass Spectrom* 19 (2005) 90–98.
- [18] Qin Y, Wang XB, Wang C, Zhao M, Wu MT, Xu YX, Peng SQ, Application of high–performance liquid chromatography–mass spectrometry to detection of diuretics in human urine, *J Chromatogr B* 794 (2003) 193–203.
- [19] Thieme D, Grosse J, Lang R, Mueller RK, Wahl A, Screening, confirmation and quantitation of diuretics in urine for doping control analysis by high–performance liquid chromatography–atmospheric pressure ionisation tandem mass spectrometry, *J Chromatogr B* 757 (2001) 49–57.
- [20] Goebel C, Trout GJ, Kazlauskas R, Rapid screening method for diuretics in doping control using automated solid phase extraction and liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry, *Anal Chim Acta* 502 (2004) 65–74.
- [21] Marchi I, Rudaz S, Veuthey J, Sample preparation development and matrix effects evaluation for multianalyte determination in urine, *J Pharm Biomed Anal* 49 (2009) 459–467.
- [22] Barroso MB, Meiring HD, De Jong A, Alonso RM, Jimenez RM, Gas chromatographic–mass spectrometric analysis of the loop diuretic torasemide in human urine, *J Chromatogr B* 690 (1997) 105–113.

- [23] Akesolo U, Gonzalez L, Jimenez RM, Alonso RM, Multivariate optimisation of a cyclodextrin–assisted–capillary zone electrophoretic method for the separation of torasemide and its metabolites, *J Chromatogr A* 990 (2003) 271–279.
- [24] Riekkola ML, Jumppanen JH, Capillary electrophoresis of diuretics, *J Chromatogr A* 735 (1996) 151–164.
- [25] Krishna MV, Sankar DG, Simple spectrophotometric determination of torsemide in bulk drug and in formulations, *J Chem* 5 (2008) 473–478.
- [26] Krishna MV, Sankar DG, Colorimetric determination of torsemide in pure form and in pharmaceutical formulations by using redox reactions, *Acta Ciencia Indica* 32 (2006) 355–358.
- [27] Farouk M, Elaziz OA, Hemdan A, Shehata M, Novel validated chromatographic method for determination of some anti-hypertensive drugs, *J Am Sci* 6 (2010) 476–486.
- [28] Sankar DG, Krishna MV, Sujatha N, Prasad L, Rama LA, Latha BS, Development and validation of RP-HPLC method for the estimation of torasemide in pure form and in pharmaceutical dosage forms, *Anal Chem* 3 (2007) 196–199.
- [29] Patel HB, Mohan A, Joshi HS, Reversed-phase ultra-performance liquid chromatographic method development and validation for determination of impurities related to torsemide tablets, *J AOAC Int* 94 (2011) 143–149.
- [30] Ardrey R, *Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction*, John Wiley & Sons Ltd, UK, 2003.
- [31] ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of analytical procedures, Text and methodology, Q2 (R1), current step 4 version, 2005.
- [32] OMCL Network/EDQM of the Council of Europe, PA/PH/OMCL (05) 47 DEF, Guideline on validation of analytical procedures, Strasbourg Cedex 2005.
- [33] Živanović Lj, *Odabrane metode za farmaceutsku analizu*, Nijansa, Srbija, 1995.
- [34] Nikolin B, Šober M, *Analitika lijekova*, Sarajevo Publishing, Sarajevo, 2003.
- [35] Ahuja S, Alsante KM, *Handbook of isolation and characterization of impurities in pharmaceuticals*, Elsevier Science, USA, 2003.
- [36] Ahuja S, *Impurities evaluation of pharmaceuticals*, Marcel Dekker Inc., New York, USA, 1998.

- [37] Veronika RM, Practical high-performance liquid chromatography, John Wiley & Sons Ltd, UK, 2004.
- [38] De Hoffmann E, Stroobant V, Mass spectrometry: principles and applications, John Wiley & Sons Ltd, UK, 2001.
- [39] Herbert C, Johnstone R, Mass spectrometry basics, CRC Press LLC, Florida, USA, 2003.
- [40] Rossi DT, Sinz MW, Mass spectrometry in drug discovery, Marcel Dekker Inc., New York, USA, 2002.
- [41] Pramanik BN, Ganguly AK, Gross ML, Applied electrospray mass spectrometry, Marcel Dekker Inc., New York, USA, 2002.
- [42] Deming S, Morgan S, Experimental design: a chemometric approach, Elsevier Science Publishers BV, The Netherlands, 1993.
- [43] Lundstedt T, Seifert E, Abramo L, Thelin B, Nystrom A, Pettersen J, Bergman R, Experimental design and optimization, *Chemom Intell Lab Syst* 42 (1998) 3–40.
- [44] Brereton RG, Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant, John Wiley & Sons Ltd, UK, 2003.
- [45] Ferreira SLC, Bruns RE, da Silva EGP, dos Santos WNL, Quintella CM, David JM, de Andrade JB, Breitzkreitz MC, Jardim ICSF, Neto BB, Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems, *J Chromatogr A* 1158 (2007) 2–14.
- [46] Preu M, Guyot D, Petz M, Development of a gas chromatography–mass spectrometry method for the analysis of aminoglycoside antibiotics using experimental design for the optimisation of the derivatisation reactions, *J Chromatogr A* 818 (1998) 95–108.
- [47] Barmapalexis P, Kanaze FI, Georgarakis E, Developing and optimizing a validated isocratic reversed–phase high–performance liquid chromatography separation of nimodipine and impurities in tablets using experimental design methodology, *J Pharm Biomed Anal* 49 (2009) 1192–1202.
- [48] Ficarra R, Calabro ML, Cutroneo P, Tommasini S, Melardi S, Semreen M, Furlanetto S, Ficarra P, Altavilla G, Validation of a LC method for the analysis of

oxaliplatin in a pharmaceutical formulation using an experimental design, *J Pharm Biomed Anal* 29 (2002) 1097–1103.

[49] Ragonese R, Mulholland M, Kalman J, Full and fractionated experimental designs for robustness testing in the high-performance liquid chromatographic analysis of codeine phosphate, pseudoephedrine hydrochloride and chlorpheniramine maleate in a pharmaceutical preparation, *J Chromatogr A* 870 (2000) 45–51.

[50] Ryan TP, *Modern experimental design*, John Wiley & Sons, Inc., NJ, USA, 2007.

[51] Armstrong NA, *Pharmaceutical experimental design and interpretation*, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA, 2006.

[52] Dejaegher B, Vander Heyden Y, The use of experimental design in separation science, *Acta Chromatogr* 21 (2009) 161–201.

[53] Martendal E, Budziak D, Carasek E, Application of fractional factorial experimental and Box-Behnken designs for optimization of single-drop microextraction of 2,4,6-trichloroanisole and 2,4,6-tribromoanisole from wine samples, *J Chromatogr A* 1148 (2007) 131–136.

[54] Myers RH, Montgomery DC, *Response surface methodology*, John Wiley & Sons, Inc., NY, USA, 2002.

[55] Mason R, Gunst R, Hess J, *Statistical design and analysis of experiments*, John Wiley & Sons Inc., NJ, USA, 2003.

[56] Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escalera LA, Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta* 76 (2008) 965–977.

[57] ICH Harmonised Tripartite Guideline, Stability testing of new drug substances and products, Q1A (R2), current step 4 version, 2003.

[58] ICH Harmonised Tripartite Guideline, Stability testing: photostability of new drug substances and products, Q1B, current step 4 version, 1996.

[59] World Health Organization, Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products, Annex 2, WHO technical report series, No. 953, 2009.

- [60] 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* 59 (2007) 29–37.
- [61] Huynh-Ba K, *Handbook of stability testing in pharmaceutical development*, Springer Science, New York, USA, 2009.
- [62] Baertschi SW, *Pharmaceutical stress testing*, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA, 2005.
- [63] Alsante KM, Martin L, Baertschi SW, A stress testing benchmarking study, *Pharm Technol* 2 (2003) 60–72.
- [64] Subba Rao DV, Radhakrishnanand P, Surendranath KV, Raghuram P, Himabindu V, A stability indicating LC method for amtolmetin guacyl, *Chromatogr* 68 (2008) 567–577.
- [65] Khedr A, Sheha M, Stress degradation studies on betahistine and development of a validated stability-indicating assay method, *J Chromatogr B* 869 (2008) 111–117.
- [66] Krishnaiah C, Reddy AR, Kumar R, Mukkanti K, Stability-indicating UPLC method for determination of valsartan and their degradation products in active pharmaceutical ingredient and pharmaceutical dosage forms, *J Pharm Biomed Anal* 53 (2010) 483–489.
- [67] Reddy YR, Nandan SR, Bharathi DV, Nagaraju B, Reddy SS, Ravindranath LK, Rao VS, LC and LC–MS/MS study of forced decomposition behavior of anastrozole and establishment of validated stability-indicating analytical method for impurities estimation in low dose anastrozole tablets, *J Pharm Biomed Anal* 50 (2009) 397–404.
- [68] Modhave DT, Handa T, Shah RP, Singh S, Stress degradation studies of lornoxicam using LC, LC–MS/TOF and LC–MSⁿ, *J Pharm Biomed Anal* 56 (2011) 538–545.
- [69] Bhardwaj SP, Singh S, Study of forced degradation behavior of enalapril maleate by LC and LC–MS and development of a validated stability-indicating assay method, *J Pharm Biomed Anal* 46 (2008) 113–120.
- [70] Ahuja S, Scypinski S, *Handbook of modern pharmaceutical analysis*, Academic Press, San Diego, CA, USA, 2001.
- [71] Mendez A, Bosch E, Roses M, Neue UD, Comparison of the acidity of residual silanol groups in several liquid chromatograph columns, *J Chromatogr A* 986 (2003) 33–44.

- [72] ICH Harmonised Tripartite Guideline, Impurities in new drug products, Q3B (R2), current step 4 version, 2006.
- [73] Kondo N, Kimura M, Yamamoto M, Hashimoto H, Kawamata K, Kawano K, Schmidt H, Chemical structure and physico-chemical properties of torasemide, *Iyakuhin Kenkyu* 25 (1994) 734–749.
- [74] Sivakumar T, Manavalan R, Valliappan K, Global optimization using Derringer's desirability function: enantioselective determination of ketoprofen in formulations and in biological matrices, *Acta Chromatogr* 19 (2007) 29–47.
- [75] Hadjmohammadi M, Sharifi V, Simultaneous optimization of the resolution and analysis time of flavonoids in reverse liquid chromatography using Derringer's desirability function, *J Chromatogr B* 880 (2012) 34–41.
- [76] Bikbulatov ES, Stepanova IE, Harrington's desirability function for natural water quality assessment, *Russ J Gen Chem* 81 (2011) 2694–2704.

PRILOZI

SPISAK OBJAVLJENIH RADOVA IZ DOKTORSKE DISERTACIJE

Radovi iz doktorske disertacije štampani u međunarodnim časopisima:

Jovic Z., Zivanovic Lj., Protic A., Radisic M., Lausevic M., Malesevic M., Zecevic M., "Forced degradation study of torasemide: characterization of its degradation products", Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, accepted manuscript

Jovic Z., Zivanovic Lj., Radisic M., Protic A., Malesevic M., "Chemometrically assisted development and validation of LC/UV and LC/MS methods for simultaneous determination of torasemide and its impurities", Journal of Chromatographic Science, (2012) 50, 324–334.

Radovi iz doktorske disertacije saopštteni na domaćim skupovima štampani kao kratak izvod:

Jović Ž., Živanović Lj., Malešević M., Protić A., "Razvoj i optimizacija RP-HPLC metode za određivanje torasemida i njegovih nečistoća u tabletama", Peti kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd, Srbija, decembar 2010, Arhiv za farmaciju (2010) 5, 942–943.

Radovi iz doktorske disertacije saopštteni na međunarodnim skupovima štampani kao kratak izvod:

Jovic Z., Zivanovic Lj., Radisic M., Malesevic M., "Validation of LC and LC/MS methods for simultaneous determination of torasemide and its impurities in tablets", 28th International symposium on chromatography, Valensija, Španija, septembar 2010

BIOGRAFIJA AUTORA

Žarko Jović je rođen 1969. godine u Šapcu. Osnovnu školu i srednju medicinsku završio je u Beogradu. Farmaceutski fakultet u Beogradu upisao je školske 1998/99. i diplomirao 2004. godine sa prosečnom ocenom 8.61.

Od septembra 2001. godine zaposlen je u Zavodu za farmaciju Srbije, koji od oktobra 2004. godine prerasta u Agenciju za lekove i medicinska sredstva Srbije. U okviru Agencije obavljao je poslove ispitivanja i kontrole lekova, procene farmaceutske dokumentacije i implementacije sistema kvaliteta. Od 2007. do 2010. godine obavljao je poslove planiranja, organizacije i nadzora nad svim aktivnostima sprovedenim u Instrumentalnoj laboratoriji, kao i poslove savetnika za kvalifikaciju laboratorijske opreme. Sada radi na poslovima planiranja i sprovođenja sistematske kontrole lekova i medicinskih sredstava, koordinaciji poslova na izradi Nacionalne farmakopeje i Magistrálnih formula, kao i aktivnostima laboratorije u okviru mreže evropskih kontrolnih laboratorija.

Doktorske studije iz oblasti farmaceutske hemije upisao je 2006. godine.

Kao posle diplomac bavi se naučno-istraživačkim radom u sferi ispitivanja kvaliteta lekova, ispitivanja nečistoća i degradacionih proizvoda u farmaceutskim preparatima, kao i studijama forsirane degradacije primenom tečne hromatografije sa UV i masenom detekcijom. U optimizaciji analitičkih metoda koristi savremene principe hemometrije i multikriterijumskog optimizacionog pristupa.

Tokom naučno-istraživačkog rada učestvovao je na međunarodnim i domaćim skupovima sa devet saopštenja štampanih kao kratak izvod, kao i sa šest naučnih radova štampanih u celosti u međunarodnim časopisima.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Жарко М. Јовић

број индекса 87/06

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Хеометријски приступ у развоју HPLC/UV и HPLC/MS метода за одређивање и испитивање стабилности торасемида и нечистоћа

- 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, 09.01.2013.

Жарко М. Јовић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Жарко М. Јовић

Број индекса 87/06

Студијски програм Фармацеутска хемија

Наслов рада Хеометријски приступ у развоју HPLC/UV и HPLC/MS метода за
одређивање и испитивање стабилности торасемида и нечистоћа

Ментор Проф. др Љиљана Живановић

Потписани/а Жарко М. Јовић

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, 09.01.2013.

Жарко М. Јовић

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 развоју HPLC/UV и HPLC/MS метода за одређивање и испитивање стабилности торасемида и нечистоћа

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 09.01.2013.

Јовита Јасарић

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.