

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Marija P. Malešević

MULTIKRITERIJUMSKI PRISTUP
MODELOVANJA HPLC METODE ZA
ODREĐIVANJE ZOLPIDEM-TARTARATA
I DEGRADACIONIH PROIZVODA

doktorska disertacija

Beograd, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Marija P. Malešević

MULTICRITERIA APPROACH TO
DEVELOPMENT OF HPLC METHOD FOR
DETERMINATION OF ZOLPIDEM
TARTRATE AND DEGRADATION
PRODUCTS

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

KOMISIJA ZA OCENU I ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

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: _____

Eksperimentalni deo ovog rada urađen je u Nacionalnoj kontrolnoj laboratoriji Agencije za lekove i medicinska sredstva Srbije. Deo eksperimenta koji se odnosi na LC-MSⁿ istraživanja je urađen na Katedri za analitičku hemiju Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Želela bih da izrazim veliku zahvalnost svom mentoru prof. dr Ljiljani Živanović na ogromnom znanju i iskustvu koje mi je nesebično prenosila tokom svih godina naše saradnje, kao i na nepresušnoj energiji koja me je stimulisala da istrajem i na pravi način završim ovaj rad.

Takođe zahvaljujem prof. dr Miri Zečević i prof. dr Mili Laušević na nesebičnoj stručnoj pomoći i dragocenim sugestijama tokom izrade i pisanja ove disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem kolegama Ani Protić, Marini Radišić i Žarku Joviću na ogromnoj pomoći tokom eksperimentalnog rada i pregršt reči podrške, čime je njihov udeo u ovom radu neprocenjiv.

Neizrecivu zahvalnost dugujem i Agenciji za lekove i medicinska sredstva Srbije, mojoj drugoj kući i najdražim kolegama iz Agencije, koji su mi omogućili da se dalje nadograđujem i stručno usavršavam.

I na kraju koristim priliku da se zahvalim mojoj majci, ocu i bratu na bezuslovnoj ljubavi i poverenju koje mi pružaju i koji daju smisao i veličinu svemu što radim u životu.

MULTIKRITERIJUMSKI PRISTUP MODELOVANJA HPLC METODE ZA ODREĐIVANJE ZOLPIDEM-TARTARATA I DEGRADACIONIH PROIZVODA

Rezime

Zolpidem tartarat je nebenzodijazepinski sedativ i hipnotik, koji se koristi za kratkotrajnu terapiju nesanicе. Njegovi efekti se manifestuju vezivanjem za benzodiazepinsko vezujuće mesto na GABA_A receptoru u CNS-u. Zolpidem baza, koji farmaceutski aktivan deo molekula, podleže laganoj hidrolizi u kiselim i baznim rastvorima usled nestabilnosti tercijarne amidne funkcionalne grupe prisutne u njegovoj strukturi. Proizvodi ove hidrolize su zolpacid i dimetilamin. Oksozolpidem, zolpiridin i zolpaldehid su takođe potencijalni degradacioni proizvodi zolpidem-tartarata.

Kako prisustvo degradacionih proizvoda može da utiče na hemijske, farmaceutske i toksikološke osobine doziranog oblika, prema ICH smernicama moraju da se ispituju sve nečistoće prisutne u doziranom obliku u količini većoj od 0.1%. Zbog toga je razvijena nova, brza RP-HPLC metoda za određivanje zolpidem-tartarata i ključnih degradacionih proizvoda. Kako na hromatografsko ponašanje analiziranih supstanci mogu da utiču različiti eksperimentalni faktori odlučeno je da se razvoj i optimizacija metode sprovedu uz pomoć eksperimentalnog dizajna. Frakcioni faktorski dizajn je korišćen da se detektuju sve promenljive koje značajno utiču na hromatografsku metodu, centralni kompozicioni dizajn je korišćen za optimizaciju tih promenljivih, a multikriterijumski princip odlučivanja u formi Deringerove funkcije je primenjen za postizanje odgovarajućeg kompromisa između različitih hromatografskih ciljeva, kao što su zadovoljavajuća rezolucija između svih ispitivanih supstanci uz najkraće moguće trajanje hromatografske analize. Nakon toga, metoda je uspešno validirana u skladu sa ICH smernicama i primenjena za ispitivanje komercijalno dostupnih zolpidem-tartarat film-tableta.

Kako je pregled literature pokazao nedostatak informacija o degradacionom mehanizmu zolpidem-tartarata, sledeći cilj ovog rada je bio da se ispita stabilnost zolpidem-tartarata i mogućnost nastajanja novih degradacionih proizvoda, sprovođenjem studije forsirane degradacije sa aktivnom supstancom zolpidem-

tartaratom i farmaceutskim doziranim oblikom zolpidem-tartarat film-tabletama, što bi omogućilo identifikovanje potencijalnih degradacionih proizvoda i posledično utvrđivanje degradacionog puta i sveobuhvatne stabilnosti leka. Studije forsirane degradacije su sprovedene u skladu sa ICH smernicama. Uzorci su izlagani svetlosti, toploti, hidrolizi i oksidaciji. Prethodno razvijena metoda je korišćena za analiziranje uzoraka, a metoda je proširena i na LC-MSⁿ da bi se uradila karakterizacija nastalih degradacionih proizvoda. Uz pomoć kvadrupola i jonskog trapa ustanovljen je način fragmentacije degradacionih proizvoda. Ključni degradacioni proizvodi su identifikovani kao zolpacid, oksozolpidem, zolpaldehid i zolpiridin. Drugi degradacioni proizvodi nisu detektovani. Na kraju je predložen mogući put degradacije zolpidem tartarata pri različitim uslovima.

Stres studije su omogućile razvoj nove analitičke metode za razdvajanje farmaceutski aktivne supstance zolpidem-tartarata i svih ključnih degradacionih proizvoda, odnosno *stability-indicating* metode. Metoda je razvijena i optimizovana primenom eksperimentalnog dizajna i multikriterijumskog pristupa i validirana u skladu sa ICH smernicama.

Ključne reči

Zolpidem-tartarat, Tečna hromatografija, Frakcioni faktorski dizajn, Centralni kompozicioni dizajn, Deringerova funkcija poželjnih odgovora, Forsirana degradacija, Degradacioni proizvodi, LC-MS

Naučna oblast

Farmaceutske nauke

Uža naučna oblast

Analitika lekova

MULTICRITERIA APPROACH TO DEVELOPMENT OF HPLC METHOD FOR DETERMINATION OF ZOLPIDEM TARTRATE AND DEGRADATION PRODUCTS

Abstract

Zolpidem tartrate is a non-benzodiazepine sedative-hypnotic agent, used in the short-term management of insomnia. Its effects are expressed by binding to the benzodiazepine-binding site of the GABA_A receptor in the CNS. Zolpidem base, which is pharmacological active part of the molecule, undergoes slow degradation in acidic solutions, due to instability of the tercial amide moiety present in the zolpidem structure. Products of that acid hydrolysis are zolpacid and dimethylamine. Oxozolpidem, zolpyridine and zolpaldehyde are also potential degradation products of zolpidem.

The presence of degradation products could affect chemical, pharmaceutical and toxicological properties of the pharmaceutical dosage form. Therefore, determination of degradation products present in pharmaceutical dosage forms above 0.1 % level is necessary, according to ICH guidelines. A new, rapid RP-HPLC method for determination of zolpidem tartrate and degradation products was developed. Since the chromatographic behaviour of analysed substances may be influenced by various experimental parameters, it was decided that the development and optimization of the method would be carried out by employing experimental design methodology. The fractional factorial design was used to detect all variables which significantly influenced the chromatographic procedure, central composite design was used for optimisation of these variables and multicriteria decision approach by means of Derringer's desirability function was applied for reaching a suitable compromise among different chromatographic goal such as satisfactory resolution between all analysed compounds with the shortest possible analysis time. Afterwards, the method was successfully validated in accordance with ICH guideline and subsequently applied to the analysis of commercially available zolpidem tartrate film-tablets.

As the literature search revealed lack of information on degradation mechanism of zolpidem tartrate, another objective of this work was to analyse the stability of

zolpidem tartrate and possibility of formation of new degradation products by conduction of forced degradation study with active pharmaceutical ingredient zolpidem tartrate and drug product zolpidem tartrate film tablets, which would help identify the potential degradation products and consequently establish the possible degradation pathways and intrinsic stability of the drug. The forced degradation study was carried out in accordance with ICH guidelines. The samples were exposed to light, heat, hydrolysis and oxidation. Previously developed method was used to analyse samples and the method was extended to LC–MSⁿ in order to characterise the arisen degradation products. A mass fragmentation pattern of degradation products was established using single quadrupole and ion trap mass analyzers. The key degradants were identified as zolpacid, oxozolpidem, zolpaldehyde and zolpyridine. Any other degradation products were not detected. Finally, the most possible degradation mechanism of zolpidem tartrate in different environments was proposed.

The stress studies enabled a development of new analytical method for separation of active pharmaceutical ingredient zolpidem tartrate and all key degradation products i.e. *stability-indicating* method. The method was developed and optimized by employing experimental design methodology and multiobjective optimization approach and finally validated in accordance with ICH guideline.

Keywords

Zolpidem tartrate, Liquid chromatography, Fractional factorial design, Central composite design, Derringer's desirability function, Forced degradation, Degradation products, LC–MS

Scientific field

Pharmaceutical sciences

Scientific discipline

Drug analysis

SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
1.1. Metode farmaceutske analize.....	2
1.1.1. Tečna hromatografija pod visokim pritiskom.....	3
1.1.1.1. Hromatografski parametri.....	4
1.1.1.2. Stacionarna faza.....	4
1.1.1.3. Mobilna faza.....	6
1.1.1.4. Tipovi detektora.....	6
1.1.2. Masena spektrometrija.....	7
1.1.2.1. Osnovni principi.....	7
1.1.2.2. Jonski izvor.....	8
1.1.2.3. Maseni analizator.....	10
1.1.2.4. Tandemska masena spektrometrija.....	12
1.1.3. Sprega tečne hromatografije i masene spektrometrije (LC–MS).....	14
1.2. Primena hemometrije u razvoju analitičkih metoda.....	15
1.2.1. Teorijske osnove eksperimentalnog dizajna.....	16
1.2.2. Vrste eksperimentalnog dizajna.....	19
1.2.3. Metodologija multikriterijumskog odlučivanja.....	21
1.3. Studije forsirane degradacije.....	23
1.3.1. Eksperimentalni uslovi za sprovođenje forsirane degradacije.....	23
1.3.2. Metode za praćenje stabilnosti.....	26
1.4. Analitika zolpidem-tartarata.....	28
1.4.1. Struktura i osobine zolpidem-tartarata.....	28
1.4.2. Nečistoće zolpidem-tartarata.....	29
1.4.3. Pregled literaturnih podataka.....	30
2. Cilj rada.....	37
3. Eksperimentalni deo.....	39
3.1. Aparati i pribor.....	40
3.1.1. Hromatografski sistem sa kvadrupolnim masenim detektorom.....	40
3.1.2. Hromatografski sistem sa jonskim trapom.....	40
3.1.3. Statistički programi.....	40

3.1.4.	Ostala oprema i pribor.....	41
3.1.5.	Rastvarači i reagensi.....	41
3.1.6.	Standardne supstance.....	42
3.1.7.	Farmaceutski dozirani oblik.....	42
3.1.8.	Komponente placeba.....	42
3.2.	Priprema rastvora za optimizaciju RP-HPLC metode.....	43
3.2.1.	Priprema mobilnih faza.....	43
3.2.2.	Priprema standardnih rastvora za optimizaciju metode.....	43
3.3.	Priprema rastvora za validaciju RP-HPLC metode.....	44
3.3.1.	Priprema mobilne faze.....	44
3.3.2.	Priprema standardnih rastvora za validaciju metode.....	44
3.3.2.1.	Priprema rastvora za ispitivanje linearnosti metode.....	45
3.3.2.2.	Priprema rastvora za ispitivanje selektivnosti metode....	45
3.3.2.3.	Priprema rastvora za ispitivanje preciznosti i tačnosti metode.....	46
3.3.2.4.	Radni rastvori za ispitivanje limita detekcije i limita kvantifikacije.....	46
3.3.3.	Priprema mobilnih faza za ispitivanje robusnosti.....	47
3.3.4.	Priprema rastvora uzorka.....	47
3.4.	Priprema rastvora za studiju forsirane degradacije.....	48
3.4.1.	Priprema rastvora stres agenasa.....	48
3.4.2.	Priprema standardnih rastvora za studiju forsirane degradacije.....	48
3.4.3.	Priprema uzoraka za studiju forsirane degradacije.....	48
3.4.3.1.	Priprema uzoraka za ispitivanje hidrolize u neutralnoj sredini i termalne degradacije.....	49
3.4.3.2.	Priprema uzoraka za ispitivanje hidrolize u kiseloj sredini.....	49
3.4.3.3.	Priprema uzoraka za ispitivanje hidrolize u baznoj sredini.....	49
3.4.3.4.	Priprema uzoraka za ispitivanje oksidacije.....	50
3.4.3.5.	Priprema uzoraka za ispitivanje fotodegradacije.....	50

3.4.3.6. Priprema kontrolnih uzoraka za studiju forsirane degradacije.....	50
3.5. Priprema rastvora za optimizaciju <i>stability-indicating</i> metode.....	51
3.5.1. Priprema mobilnih faza.....	51
3.5.2. Priprema standardnih rastvora za optimizaciju <i>stability-indicating</i> metode.....	51
3.6. Priprema rastvora za validaciju <i>stability-indicating</i> metode.....	52
3.6.1. Priprema mobilne faze.....	52
3.6.2. Priprema standardnih rastvora za validaciju <i>stability-indicating</i> metode.....	52
3.7. Hromatografski postupak.....	52
3.7.1. Hromatografski uslovi.....	52
3.7.2. Postupak rada.....	54
4. Rezultati i diskusija.....	55
4.1. Razvoj i optimizacija RP-HPLC metode za određivanje zolpidem-tartarata i njegovih degradacionih proizvoda.....	56
4.1.1. Preliminarna ispitivanja.....	56
4.1.2. Razvoj metode primenom eksperimentalnog dizajna.....	62
4.1.2.1. Primena frakcionog faktorskog dizajna u <i>screening</i> fazi.....	63
4.1.2.2. Primena centralnog kompozicionog dizajna u optimizacionoj fazi.....	66
4.1.3. Primena multikriterijumskog odlučivanja u formi Deringerove funkcije.....	72
4.2. Validacija RP-HPLC metode za određivanje zolpidem-tartarata i njegovih degradacionih proizvoda.....	76
4.2.1. Ispitivanje robusnosti.....	76
4.2.2. Ispitivanje selektivnosti.....	77
4.2.3. Ispitivanje linearnosti.....	78
4.2.4. Ispitivanje preciznosti.....	81
4.2.5. Ispitivanje tačnosti.....	82
4.2.6. Ispitivanje limita detekcije i kvantifikacije.....	83

4.3.	Kvalitativna i kvantitativna analiza film-tableta.....	84
4.4.	Studija forsirane degradacije.....	86
4.4.1.	Optimizacija uslova na masenom detektoru.....	88
4.4.2.	Hidroliza u neutralnoj sredini i termalna degradacija.....	89
4.4.3.	Hidroliza u kiseloj sredini.....	89
4.4.4.	Hidroliza u baznoj sredini.....	93
4.4.5.	Fotodegradacija.....	93
4.4.6.	Oksidativna degradacija.....	95
4.4.7.	Fragmentacija zolpidem-tartarata i ključnih degradacionih proizvoda.....	96
4.4.8.	Predloženi put degradacije za zolpidem-tartarat.....	98
4.5.	Razvoj i optimizacija <i>stability-indicating</i> metode za zolpidem-tartarat....	99
4.5.1.	Primena frakcionog faktorskog dizajna u screening fazi.....	100
4.5.2.	Primena punog faktorskog dizajna u optimizacionoj fazi.....	103
4.5.3.	Primena multikriterijumskog odlučivanja u formi Deringerove funkcije.....	107
4.6.	Validacija <i>stability-indicating</i> metode za zolpidem-tartarat.....	112
4.6.1.	Ispitivanje selektivnosti.....	112
4.6.2.	Ispitivanje linearnosti.....	113
4.6.3.	Ispitivanje preciznosti.....	114
4.6.4.	Ispitivanje tačnosti.....	115
4.6.5.	Ispitivanje limita detekcije i kvantifikacije.....	116
4.7.	Kvalitativna i kvantitativna analiza film-tableta <i>stability-indicating</i> metodom.....	117
5.	Zaključak.....	120
	Literatura.....	125
	Prilozi	

LISTA SKRAĆENICA KORIŠĆENIH U OVOM RADU

- AAS – *Atomic absorption spectrometry* – Atomska apsorpciona spektrometrija
- ANOVA – *Analysis of variance* – Analiza varijanse
- APCI – *Atmospheric pressure chemical ionization* – Hemijska jonizacija pod atmosferskim pritiskom
- API – *Active pharmaceutical ingredient* – Farmaceutski aktivna supstanca
- CE – *Capillary electrophoresis* – Kapilarna elektroforeza
- CI – *Chemical ionization* – Hemijska jonizacija
- CNS – *Central nervous system* – Centralni nervni sistem
- D – *Desirability function* – Funkcija poželjnih odgovora
- DP – *Drug product* – Farmaceutski dozirani oblik
- EI – *Electron ionization* – Elektronska jonizacija
- ESI – *Electrospray ionization* – Elektrosprej jonizacija
- FAB – *Fast atom bombardment* – Bombardovanje brzim atomima
- FIA – *Flow injection analysis* – Unos uzorka u maseni analizator u struji mobilne faze
- GABA – *Gama amino buteric acid* – Gama amino buterna kiselina
- GC – *Gas chromatography* – Gasna hromatografija
- GC-MS – *Gas chromatography/Mass spectrometry* – Gasna hromatografija spregnuta sa masenom spektrometrijom
- HPLC – *High pressure liquid chromatography* – Tečna hromatografija pod visokim pritiskom
- HPTLC – *High pressure thin layer chromatography* – Visoko-efikasna tankoslojna hromatografija
- ICH – *International Conference on Harmonization* – Međunarodna Konferencija o Harmonizaciji
- IR – *Infrared* – Infracrveno
- LC-MS – *Liquid chromatography/Mass spectrometry* – Tečna hromatografija pod visokim pritiskom spregnuta sa masenom spektrometrijom
- LOD – *Limit of detection* – Limit detekcije
- LOQ – *Limit of quantification* – Limit kvantifikacije
- MALDI – *Matrix-assisted laser desorption/ionization* – Jonizacija laserom iz matriksa

MEEKC – *Microemulsion electrokinetic chromatography* – mikroemulziona elektrokinetička hromatografija

MEKC – *Micellar electrokinetic chromatography* – Micelarna elektrokinetička hromatografija

MLR – *Multiple linear regression* – Višestruka linearna regresiona analiza

MS – *Mass spectrometry* – Masena spektrometrija

MS/MS ili MSⁿ – *Tandem mass spectrometry* – Tandemska masena spektrometrija

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

NMR – *Nuclear magnetic resonance* – Nuklearna magnetna rezonanca

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

ODS – *Octadecyl silica* – Silikagel sa vezanim oktadecil grupama

OVAT – *One-variable-at-a-time* – Optimizovanje jedne po jedne promenljive

PCR – *Principal komponents regression* – Regresiona analiza glavnih komponenata

PDA – *Photodiode-array* – Detektor sa nizom fotodioda

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

PLS – *Partial least squares* – Metoda parcijalno najmanjih kvadrata

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

SAD – Sjedinjene američke države

SD – *Standard deviation* – Standardna devijacija

SIM – *Selected ion monitoring* – Praćenje izabranog jona

TLC – *Thin layer chromatography* – Tankoslojna hromatografija

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

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

USP – *United States Pharmacopoeia* – Farmakopeja Sjedinjenih američkih država

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

1. UVOD

1.1. METODE FARMACEUTSKE ANALIZE

Primena naučnih dostignuća farmaceutske analize u razvoju i proizvodnji lekova je široko rasprostranjena. Farmaceutska analiza podrazumeva upotrebu različitih metoda od početnih faza razvoja leka (analize malih količina supstanci dobijenih nakon sinteze određenog leka) finalno do kontrole kvaliteta farmaceutskog doziranog oblika [1]. Ove metode se mogu podeliti u dve grupe: separacione i neseparacione metode.

Separacione metode omogućavaju analizu komplikovanih smeša, jer obezbeđuju istovremeno razdvajanje komponenti smeše, kao i identifikaciju i kvantifikaciju svake komponente. Najzastupljenije separacione metode su: tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC ili LC), gasna hromatografija (GC), tankoslojna hromatografija (TLC), visoko-efikasna tankoslojna hromatografija (HPTLC), kapilarna elektroforeza (CE), micelarna elektrokinetička hromatografija (MEKC) i mikroemulziona elektrokinetička hromatografija (MEEKC).

U neseparacione metode ubrajaju se spektroskopske tehnike, kao što su: ultraljubičasta i vidljiva spektrofotometrija (UV/VIS), infracrvena spektroskopija (IR), atomska apsorpciona spektrometrija (AAS), masena spektrometrija (MS) i nuklearna magnetna rezonantna spektrometrija (NMR) [2].

Da bi se obezbedio odgovarajući kvalitet, efikasnost i bezbednost lekova, pored određivanja sadržaja farmaceutske aktivne supstance, vrlo je važno i praćenje sadržaja nečistoća u leku. Metode za farmaceutsku analizu, koje služe za ispitivanje nečistoća, moraju biti dovoljno osetljive da bi kvantifikovale nečistoće i u količinama 0,05% u odnosu na sadržaj aktivne supstance, a ponekad i niže limite [3], a moraju biti i validirane u skladu sa ICH smernicama [4].

Za ispitivanje nečistoća mogu se koristiti neseparacione metode, kao što su UV/VIS ili AAS, ali je njihova primena ograničena. UV/VIS se koristi za ispitivanje nečistoća ukoliko ispitivana nečistoća apsorbuje svetlost određene talasne dužine ili se nekom hemijskom reakcijom može prevesti u takvo jedinjenje, a farmaceutska aktivna supstanca ne apsorbuje na datoj talasnoj dužini. AAS se koristi za ispitivanje prisustva teških metala ili nečistoća koje sadrže određene jone. U nekim slučajevima, kada se rade limit testovi pomoću kojih se nečistoće ne kvantifikuju, već se samo određuje njihovo prisustvo ispod određenog limita, mogu se koristiti i hemijske bojene reakcije.

Međutim, u ispitivanju nečistoća najšire su primenjene separacione tehnike, kao što su TLC, GC ili HPLC, jer omogućavaju međusobno razdvajanje nečistoća i farmaceutske aktivne supstance, kao i razdvajanje od komponenti matriksa u farmaceutskom doziranom obliku. U novije vreme pravu ekspanziju su doživele tzv. kombinovane tehnike gde se gore pomenute hromatografske tehnike kombinuju sa moćnim detektorima, kao što su maseni detektor ili nuklearna magnetna rezonanca, koji mogu da kvantifikuju nečistoće prisutne u tragovima i da identifikuju eventualno prisutne nepoznate nečistoće.

1.1.1. Tečna hromatografija pod visokim pritiskom

Tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC) je separaciona tehnika, koja se najviše primenjuje u analitici lekova u cilju razdvajanja, kvalitativne i kvantitativne analize smeša farmaceutskih supstanci koje ulaze u sastav farmaceutskih doziranih oblika. Kao i ostale hromatografske tehnike, zasniva se na različitoj raspodeli supstanci između dve faze: nepokretne odnosno stacionarne faze i pokretne, mobilne faze. Kod tečne hromatografije, mobilna faza je uvek tečna, dok stacionarna faza može biti čvrsta ili tečna [5].

Mehanizam razdvajanja supstanci u tečnoj hromatografiji se odvija procesom adsorpcije, raspodele između dva rastvarača, jonske izmene ili raspodele prema veličini molekula, pa tako razlikujemo adsorpcionu, podeonu, jonoizmenjivačku hromatografiju i hromatografiju raspodele prema veličini molekula [6].

U zavisnosti od polarnosti stacionarne odnosno mobilne faze tečna hromatografija se može podeliti na normalno-faznu tečnu hromatografiju (NP-HPLC) i reverzno-faznu tečnu hromatografiju (RP-HPLC). Kod NP-HPLC stacionarna faza je polarna (napr. sadrži vezane amino, cijano ili hidroksilne grupe), dok je mobilna faza nepolarna, pa se koristi za ispitivanje polarnih supstanci. Razdvajanje se zasniva na stvaranju vodoničnih veza ili na polarnim interakcijama između ispitivanih supstanci i stacionarne faze, pa će polarnije supstance eluirati kasnije sa kolone. Sa druge strane, kod RP-HPLC stacionarna faza je nepolarna (napr. sadrži vezane ugljovodonične lance), dok je mobilna faza polarna, pa se koristi za ispitivanje nepolarnih supstanci. Razdvajanje se zasniva na hidrofobnim interakcijama između ispitivanih supstanci i stacionarne faze, pa će nepolarnije supstance eluirati kasnije sa kolone [5,7].

1.1.1.1. Hromatografski parametri

Osnovni parametri koji karakterišu jedan hromatografski sistem prikazani su u tabeli 1 [8,9].

Tabela 1. Hromatografski parametri i način njihovog izračunavanja

Naziv i oznaka parametra	Formula za izračunavanje	Optimalna vrednost
Retenciono vreme mobilne faze, t_0	/	/
Retenciono vreme, t_r	/	/
Redukovane retenciono vreme, t_r'	$t_r - t_0$	/
Relativno retenciono vreme, RRt	t_B/t_A	Različito od 1
Retenciona zapremina, V_r	$t_r \times F$	/
Retencioni faktor, k'	$(t_r - t_0)/t_0$	$0,5 \leq k' \leq 20$
Faktor selektivnosti, α	k_B'/k_A'	Različito od 1
Broj teoretskih platoa, N	$5,54 (t_r/W_{1/2})^2$ ili $16 (t_r/W)^2$	/
Rezolucija, R	$1,18 (t_{rA} - t_{rB})/(W_A - W_B)$	$> 1,5$
Faktor simetrije pika, A_s	$W_{ab} - W_{bc}$	$0,8 \leq A_s \leq 1,2$

F - protok, W - širina pika, $W_{1/2}$ - širina pika na polovini visine

Optimalna vrednost hromatografskih parametara dobija se menjanjem parametara metode, kao što su sastav i pH mobilne faze, kolona i temperatura kolone, protok mobilne faze itd.

Osnovni delovi HPLC sistema su rezervoar mobilne faze, degaser, pumpa, injektor, kolona, termostat za kolonu, detektor i sistem za prikupljanje i obradu podataka. Svi delovi su tako konstruisani da izdrže visoke pritiske, pri kojima se odvija čitav proces [5,7].

1.1.1.2. Stacionarna faza

Kolone su najvažniji deo HPLC sistema, jer se na njima vrši razdvajanje komponenti iz uzorka. Napravljene su najčešće od nerđajućeg čelika, dužine 20–300 mm, unutrašnjeg prečnika 2–5 mm i napunjene su stacionarnom fazom.

Stacionarna faza predstavlja punjenje kolone i na njoj se vrši razdvajanje komponenta uzorka. Materijali od kojih se prave stacionarne faze su: silikagel, polimeri ili porozni grafit za koje mogu biti hemijski vezane određene funkcionalne

grupe, aluminijum-oksidi, polimerne smole sa kiselim ili baznim grupama, derivati celuloze, amiloze, proteini, peptidi i ciklodekstrini [8].

Najčešće se koriste stacionarne faze na bazi hemijski modifikovanog silikagela. Silanolne grupe (Si-OH) na površini silikagela daju mu polaran i slabo kiseo karakter, tako da se nemodifikovani silikagel može koristiti za analizu baznih jedinjenja [10]. Modifikacija se vrši tako što se na polarne silanolne grupe silicijum-dioksida hemijski vezuju grupe koje modifikuju polarnost silikagela.

U normalno-faznoj hromatografiji kao stacionarna faza koristi se silikagel sa vezanim polarnim grupama kao što su: cijanopropil ili Si-[CH₂]₃-CN (cijano kolona), aminopropil ili Si-[CH₂]₃-NH₂ (amino kolona), diol ili Si-[CH₂]₃-O-CH(OH)-CH₂-OH (diol kolona) i nemodifikovani silicijum-dioksid. Sa druge strane, u reverzno-faznoj hromatografiji koristi se silikagel sa vezanim nepolarnim grupama, kao što su: oktadecil ili Si-[CH₂]₁₇-CH₃ (C₁₈ ili ODS kolone), oktil ili Si-[CH₂]₇-CH₃ (C₈ kolone) i fenil ili Si-[CH₂]_n-C₆H₅ (fenil kolona) [8,11].

Najčešće se koristi silikagel koji ima sferičan oblik čestica, veličine 3–10 μm u prečniku. Silikagel je stabilan na pH vrednostima 2–8. Na nižim vrednostima može doći do raskidanja hemijskih veza sa nosačem, a na višim do rastvaranja silikagela. Zbog toga se vrši zaštita slobodnih silanolnih grupa pogodnim radikalima ili njihovim ukrštenim vezivanjem (endkapovanje), čime se povećava stabilnost kolone na većim pH vrednostima i bolja simetrija pikova na hromatogramu, posebno za bazne supstance [8,10].

Noviji tip kolona su kolone punjene hibridnim česticama koje sadrže neorgansku (silicijum-dioksid) i organsku (organosiloksani) komponentu i imaju povećanu efikasnost razdvajanja i hemijsku i temperaturnu stabilnost u odnosu na klasične kolone. Nešto drugačiji tip su monolitne kolone, koje nisu punjene sferičnim česticama silikagela, već predstavljaju kontinuiranu homogenu fazu od poroznog silikagela sa makro i mezoporama kroz koje prolaze mobilna faza i rastvorene komponente uzorka. Porozna struktura obezbeđuje veliku aktivnu površinu stacionarne faze i povećava efikasnost razdvajanja [10].

1.1.1.3. Mobilna faza

Kada se razvija nova metoda tečne hromatografije velika pažnja se poklanja izboru stacionarne faze, jer se smatra da ona igra ključnu ulogu u razdvajanju komponenata. Međutim, mnogo parametara, kao što su vreme eluiranja, oblik pika, pritisak na koloni itd., zavise od pravilnog izbora mobilne faze [11].

U RP-HPLC mobilna faza je polarna i sastoji se od smeše organskih rastvarača kao što su metanol, acetonitril ili tetrahidrofuran i vodene faze, kojoj se često dodaju modifikatori. Uloga modifikatora je da suzbiju jonizaciju ispitivanih komponenti, pri čemu one sa kolone izlaze u vidu bolje definisanih i simetričnijih pikova. Modifikatori se dodaju u malim količinama (2% ili manje), a obuhvataju kiseline (napr. fosforna, sirćetna, trifluorosirćetna), baze (napr. trietilamin, dietilamin), pufere (npr. fosfatni, acetatni) ili jon-par reagense (napr. natrijum-laurilsulfat, tetrabutilamonijum-fosfat). Najčešće se koriste puferi, čija je uloga da održavaju pH mobilne faze konstantnim. Izbor pufera zavisi od pH na kojem će se odvijati hromatografsko ispitivanje. Najefikasnije je koristiti pufer čija je pK_a vrednost bliska pH vrednosti na kojoj će se vršiti ispitivanje. Fosfatni puferi su najčešće korišćeni, jer imaju tri pH regiona gde su efikasni (pH 2, 7 ili 12). Acetatni pufer je efikasan oko pH 4, a amonijačni oko pH 9 [11].

U NP-HPLC mobilna faza je nepolarna i sastoji se od smeše organskih rastvarača kao što su heksan, dihlorometan, izopropanol ili etilacetat.

1.1.1.4. Tipovi detektora

Za identifikaciju i kvantifikaciju komponenata koje su se razdvojile na koloni koriste se različiti tipovi detektora, kao što su: UV/VIS detektor, fluorescentni detektor, refraktometrijski detektor, elektrohemijski detektor i maseni detektor. Izbor detektora zavisi od osobine supstanci koje se ispituju.

UV/VIS detektor se najčešće koristi u tačnoj hromatografiji. Služi za ispitivanje supstanci koje apsorbuju u ultraljubičastoj i vidljivoj oblasti. Detekcija se zasniva na merenju apsorbancije ispitivane supstance na određenoj talasnoj dužini, a prema Lambert-Beer-ovom zakonu apsorbancija je direktno proporcionalna koncentraciji ispitivane supstance u rastvoru. Koriste se jednostavni UV/VIS detektori koji mere apsorbanciju samo na jednoj talasnoj dužini, varijabilni UV/VIS detektori koji mogu da

se podešavaju na različite talasne dužine i PDA detektori koji mogu da prate apsorbanciju na više talasnih dužina uporedo i da snimaju UV/VIS spektar ispitivane supstance u celom opsegu. I dok jednostavni UV/VIS detektori imaju veću osetljivost, prednosti PDA detektora su mogućnost identifikacije supstanci prema UV-spektru, mogućnost praćenja čistoće pika i mogućnost oduzimanja refrentne talasne dužine, što dovodi do smanjenja fluktuacije bazne linije tokom gradijentnog eluiranja [7,8].

Fluorescentni detektor radi na principu ekscitacije uzorka UV zračenjem, nakon čega uzorak emituje zračenje veće talasne dužine, odnosno fluorescira. Identifikacija se vrši preko retencionog vremena i talasnih dužina ekscitacije i emisije, čime je postignuta veća selektivnost [7,8].

Refraktometrijski detektor meri razliku između indeksa refrakcije same mobilne faze i mobilne faze sa rastvorenim uzorkom. Univerzalan je detektor, ali je time i najmanje osetljiv. Koristi se za detektovanje supstanci koje ne apsorbuju u UV oblasti [7,12].

Elektrohemijski detektor meri intenzitet struje koja nastaje kao posledica elektrolitičke oksidacije ili redukcije ispitivane supstance na površini elektrode. Ovi detektori su jako osetljivi i selektivni [7,8].

Maseni detektor se zasniva na jonizaciji molekula uzorka i njihovoj fragmentaciji, nakon čega se detektuju molekularni joni i njihovi fragmenti na osnovu odnosa masa/naelektrisanje (m/z). Ovaj tip detektora pokazuje veliku osetljivost i selektivnost i našao je široku primenu u analitici lekova, posebno u ispitivanju nepoznatih uzoraka i uzoraka sa teškim i komplikovanim matriksom [10].

1.1.2. Masena spektrometrija

1.1.2.1. Osnovni principi

Prvi korak u masenoj spektrometriji je prevođenje molekula uzorka u gasovito stanje, a zatim sledi njegova jonizacija. Prilikom jonizacije nastaje nekoliko vrsta jona. Nastaju pre svega molekularni joni. U zavisnosti od načina jonizacije molekularni jon može da nastane izbijanjem jednog ili više elektrona iz molekula uzorka (jon M^+ , M^{2+} itd), vezivanjem protona (jon MH^+), a ako se jonizacija vrši tako da nastaju negativni joni molekula može da primi elektron (jon M^-) ili da izgubi proton (jon $[M-H]^-$).

Povećavanjem energije jonizacije jonima sa predaje veća energija, čime oni postaju nestabilni, cepaju se i daju fragmentne jone. Jedan molekularni jon se pod istim uslovima uvek fragmentiše na isti način. Molekularni jon i njegovi odgovarajući fragmenti čine maseni spektar ispitivane supstance koji služi za njenu identifikaciju. Praćenjem nastalih fragmenata i njihove zastupljenosti u masenom spektru može se pretpostaviti struktura ispitivane supstance, a na osnovu m/z odnosa molekularnog jona i njena molekularna masa.

U masenoj spektrometriji mogu nastati i drugi joni osim fragmenata, kao što su višestruko naelektrisani joni (M^{2+} , M^{3+} itd.) i *adduct* joni npr. sa natrijumom (MNa^+), amonijumom (MNH_4^+) ili acetatima (MCH_3COO^-). U spektru mogu biti prisutni i izotopski joni (npr. kod supstanci koje sadrže hlor, brom, sumpor, kiseonik, azot, ugljenik), kao i preuređeni joni (nastaju unutrašnjim pregrupisavanjem atoma ili grupa atoma u trenutku raspadanja molekularnog jona) [13,14].

I dok je za identifikaciju ispitivanog uzorka bitno pratiti sve jone u masenom spektru, za kvantifikaciju je bolje izabrati jedan jon ili nekoliko jona koji će se pratiti (eng. *selected ion monitoring, SIM*), jer se time postiže veća osetljivost i selektivnost. Tom prilikom se meri intenzitet signala koji potiče od jednog ili više jona u uzorku i upoređuje se sa intenzitetom signala istog jona u standardnom rastvoru [13].

Svaki maseni spektrometar sadrži sistem za unošenje uzorka, jonski izvor, jedan ili više masenih analizatora, detektor i sistem za obradu podataka. Uzorci se u maseni spektrometar unose direktnim injiciranjem ili iz hromatografa koji je vezan za maseni detektor. Maseni analizatori se nalaze u polju visokog vakuuma koji omogućava da joni dođu do detektora bez sudara sa molekulima vazduha, jer bi u protivnom bili neutralisani i ne bi se mogli detektovati [5,14].

1.1.2.2. Jonski izvor

Uloga jonskog izvora je da jonizuje molekule uzorka. Postoji nekoliko tipova jonskog izvora, a najzastupljeniji su:

- Elektronska jonizacija (EI) – jonizacija se postiže bombardovanjem elektronima velike energije, koji pri sudaru izbijaju elektrone iz molekula analita. Koristi se u kombinaciji sa GC.

- Hemijska jonizacija (CI) – jonizacija se postiže bombardovanjem elektronima u struji reagujućeg gasa (metan, amonijak, izobutan). Elektroni pri sudaru jonizuju molekule reagujućeg gasa, koji daljim sudarima jonizuju molekule analita. Koristi se u kombinaciji sa GC.

- Bombardovanje brzim atomima (FAB) – jonizacija analita koji je rastvoren u neisparljivom matriksu (glicerol, tioglicerol itd.) postiže se izlaganjem struji neutralnih atoma (argon ili ksenon) ili jonskom toku.

- Jonizacija laserom iz matriksa (MALDI) – jonizacija se postiže bombardovanjem laserskim zrakom.

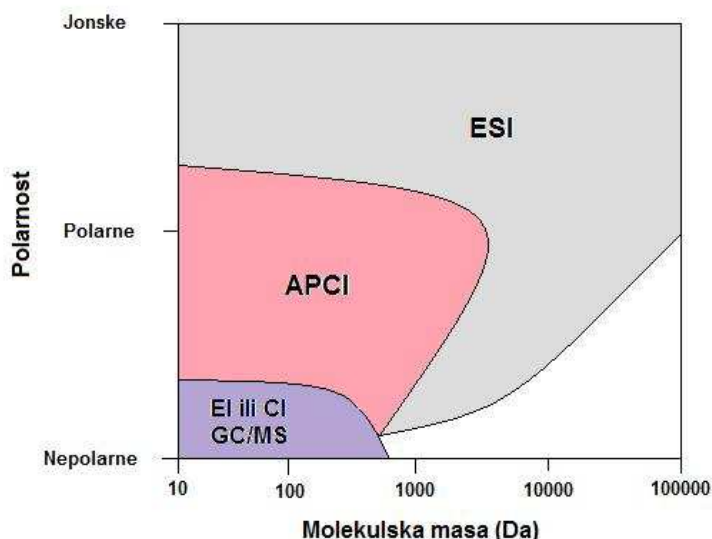
- Hemijska jonizacija pod atmosferskim pritiskom (APCI) – jonizacija se postiže kao kod CI, ali pri atmosferskom pritisku. Rastvor analita se uz pomoć gasa za raspršivanje pretvara u fini aerosol iz kojeg se rastvarač otklanja uparavanjem u zagrejanju komori, čime se neutralni molekuli analita prevode u gasovito stanje. Molekuli analita zatim stižu do elektrode (korona) na kojoj se dešava jonizacija, u prisustvu okolnog gasa koji je potpomaže.

- Elektrosprej jonizacija (ESI) – uzorak rastvoren u polarnom isparljivom rastvaraču upumpava se u jonski izvor na atmosferskom pritisku preko uske kapilare od nerđajućeg čelika. Na kraj kapilare se primenjuje velika potencijalna razlika u odnosu na protivelektrodu, što stvara jako električno polje. Ovo električno polje dovodi do nakupljanja naelektrisanja na površini kapljice na vrhu kapilare, koja će se nakon odvajanja od kapilare pretvoriti u visokoelektrisanu česticu aerosola. U toploj struji gasa za sušenje (azot) rastvarač isparava, naelektrisane čestice se smanjuju, a gustina naelektrisanja na njihovoj površini se povećava. Proces teče do trenutka kada sile odbijanja istoimenog naelektrisanja ne postanu veće od kohezivnih sila površinskog napona, što dovodi do eksplozije naelektrisane čestice i oslobađanja jona analita. ESI predstavlja tkz. najmekšu tehniku jonizacije, jer se joni stvaraju direktno iz rastvora, pa je pri manjim energijama jonizacije, na masenom spektru najdominantniji molekulski jon [13–18].

Većina jonskih izvora, pre svega ESI i APCI mogu da rade sa pozitivnim ili negativnim jonima. Pozitivni joni nastaju protonovanjem molekula analita ili izbijanjem elektrona iz njegove strukture. Na ovaj način se analiziraju supstance sa baznim osobinama, jer se one lako protonuju još u rastvoru sa niskim vrednostima pH. Sa druge

strane negativno naelektrisani joni nastaju primanjem elektrona ili gubitkom protona iz molekula analita. Na ovaj način se analiziraju supstance sa kiselim osobinama, jer one lako gube proton u rastvoru sa visokim vrednostima pH.

Koji će se jonski izvor koristiti zavisi od polarnosti i molekulske mase ispitivane supstance kao što je prikazano na slici 1 [14].



Slika 1. Kriterijumi za izbor jonskog izvora u zavisnosti od molekulske mase i polarnosti ispitivane supstance [14]

1.1.2.3. Maseni analizator

Razdvajanje nastalih jona vrši se u masenom analizatoru. Tri glavne karakteristike po kojima se razlikuju maseni analizatori su opseg masa, transmisija i rezolucija. Opseg masa se pre svega odnosi na najveću vrednost odnosa m/z , koja se može detektovati na masenom analizatoru. Transmisija je odnos između broja jona koji dođu do detektora i broja jona nastalih u jonskom izvoru. Rezolucija je mogućnost dobijanja signala od jona sa vrlo malom razlikom u masi. Najčešće korišćeni maseni analizatori su: kvadrupolni maseni analizator, jonski trap, *time-of-flight* maseni analizator (ToF) i elektromagnetni analizator.

Kvadrupolni maseni analizatori se sastoje od četiri paralelne cevi postavljene jedna naspram druge koje predstavljaju elektrode. Naspramni par elektroda je istoimeno naelektrisan, dok drugi par elektroda nosi suprotno naelektrisanje. Joni koji se kreću između paralelnih cevi bivaju privučeni suprotno naelektrisanim elektrodama i kreću se

ka njima. Pre nego što udare u njih dolazi do promene u naelektrisanju elektrode, odnosno elektroda postaje suprotno naelektrisana i sada odbija iste jone. Na ovaj način između elektroda stabilnom putanjom prolaze samo joni određenog odnosa m/z i stižu do detektora, dok ostali udaraju u elektrode i razelektrišu se. Koji joni će doći do detektora zavisi od veličine napona na elektrodama. Prednost ovog analizatora je jednostavnost, brzina, osetljivost i otpornost na visoke pritiske, a nedostatak mu je niska rezolucija i mogućnost analize samo jona sa stabilnom putanjom, dok se ostali joni gube (niska transmisiona efikasnost).

Jonski trap je maseni analizator koji se ponaša kao trodimenzionalni kvadrupol. Sastoji se od jedne prstenaste elektrode i dve tanjiraste koje zatvaraju prsten sa donje i gornje strane, stvarajući tako komoru u kojoj su „zarobljeni“ joni različitih masa. Joni se unutar komore kreću stabilnim trodimenzionalnim putanjama koje treba da su što manje do trenutka kada jon treba da napusti komoru. Ovo se postiže prisustvom gasa helijuma u komori pod visokim vakumom koji stabilizuje jone. Promenom napona na prstenastoj elektrodi putanja jona određene mase se destabilizuje i oni bivaju izbačeni ka detektoru. Prednost ovog analizatora je jednostavnost, brzina, otpornost na visoke pritiske i mogućnost detekcije svih jona iz uzorka (visoka transmisiona efikasnost), a nedostatak mu je relativno niska rezolucija.

Princip rada *Time-of-flight* masenog analizatora (ToF) se zasniva na činjenici da ukoliko se svim jonima koji su nastali u jonskom izvoru dâ ista kinetička energija njihova brzina će biti obrnuto proporcionalna kvadratnom korenu njihove mase. To znači da će se teži joni sporije kretati. Drugim rečima, vreme koje je potrebno da jon pređe putanju između jonskog izvora i detektora (region preleta ili *drift* tuba) će zavistiti od njegovog m/z odnosa. Na ovaj način joni različitih masa će se razdvojiti, iako će do detektora na kraju stići svi joni nastali u jonskom izvoru, što je i prednost ovog masenog analizatora (visoka transmisiona efikasnost). Ostale prednosti ToF-a su širok opseg i visoka rezolucija, koja se postiže produžavanjem puta koji joni prelaze u *drift* tubi ugradnjom reflektora. Reflektor je elektrostatički reflektor koji reflektuje jone i vraća ih da još jednom pređu celu dužinu *drift* tube.

Elektromagnetni analizator koristi magnetno i električno polje da bi uticao na putanju i brzinu jona. Kada se joni kreću u magnetnom polju koje deluje pod pravim uglom u odnosu na pravac njihovog kretanja doći će do zakrivljivanja njihove putanje,

odnosno joni određenog odnosa m/z će se kretati po kružnoj putanji određenog prečnika. Menjanjem jačine magnetnog polja menjaće se i prečnik putanje, čime se samo joni određene mase fokusiraju ka detektoru. Električno polje služi da smanji disperziju jona, odnosno da se joni iste kinetičke energije zajedno fokusiraju ka detektoru [13–18].

1.1.2.4. Tandemska masena spektrometrija

Tandemska masena spektrometrija (MS/MS) predstavlja metodu koja obuhvata barem dva stupnja analize masa, odnosno barem dva masena analizatora. Pri tome prvi analizator služi da izoluje jon prekursor, koji se zatim fragmentiše dajući kao proizvode fragmentacije jedan produkt jon i neutralni fragment. Drugi maseni analizator služi za analizu nastalih fragmenata. Moguće je, takođe povećati broj koraka, odnosno vezati novi maseni analizator koji će fragmentisati nastali produkt jon, analizirati novo nastale fragmente, pa od njih izabrati novi jon koji će se dalje fragmentisati, što vodi stvaranju višestruko vezanih analiza masa što se obeležava sa MS^n [13,14].

Tandemska masena spektrometrija se može postići na dva načina: u prostoru i u vremenu. MS/MS u prostoru nastaje fizičkim spajanjem dva ili više masenih analizatora, dok MS/MS u vremenu nastaje pravljenjem sekvence događaja u delu aparata za čuvanje jona.

MS/MS u prostoru postiže se na trostrukom kvadrupolnom masenom spektrometru (eng. *triple quadrupole*) koji se sastoji od tri seta kvadrupolnih analizatora povezanih serijski. Prvi kvadrupol izoluje jon prekursor, u drugom (koliziona ćelija) se vrši fragmentacija i fokusiranje određenih jona ka trećem analizatoru, dok se u trećem vrši analiza produkt jona i fragmenata. Moguće je takođe kombinovati elektromagnetni analizator sa dva kvadrupola ili dva kvadrupola sa ToF-om.

MS/MS u vremenu postiže se korišćenjem jonskog trapa, gde se sukcesivno u samom trapu prvo vrši odabir jona prekursora, zatim njegova fragmentacija, analiza produkt jona, njihova fragmentacija itd [14].

Tandemska masena spektrometrija omogućava četiri vrste eksperimenata: skeniranje produkt jona (eng. *product ion scan*), skeniranje jona prekursora (eng. *precursor ion scan*), skeniranje konstantnog neutralnog gubitka (eng. *neutral loss scan*), i praćenje odabrane reakcije (eng. *selected reaction monitoring*).

Kod skeniranja produkt jona prvo se izoluje jon od interesa, najčešće molekulski jon, zatim se on fragmentiše i na kraju se snime maseni spektri produkt jona. Kod jonskog trapa svi joni koji nisu od interesa prevode se u nestabilnu putanju i izbacuju se iz trapa, dok se sa jonima od interesa postupa na prethodno opisan način. Na ovaj način se može postupati sa svim produkt jonima koji su nastali u trapu. Ovi eksperimenti su dobri za određivanje strukture molekula, jer se dobijaju spektri koji služe kao otisak prsta ispitivane supstance (ista supstanca se pod istim uslovima uvek fragmentiše na isti način).

Kod skeniranja jona prekursora prvi maseni analizator je podešen da propušta sve jone iz određenog opsega koji se zatim fragmentišu u kolizionoj ćeliji. Poslednji maseni analizator je podešen da ka detektoru propušta samo produkt jon jednog izabranog odnosa m/z . Na ovaj način će do detektora stići signal tek kada prvi maseni analizator propusti jon prekursor koji fragmentacijom daje izabrani produkt jon. Ovaj tip eksperimenata je koristan pri ispitivanju smeša jedinjenja koji daju iste proizvode fragmentacije. Zbog svoje strukture jonski trap i kombinacija kvadrupola sa ToF-om ne mogu da sprovode ovaj tip eksperimenata.

Skeniranje konstantnog neutralnog gubitka se obavlja na taj način što su oba masena analizatora podešena da skeniraju u celom opsegu odnosa m/z , ali drugi maseni analizator propušta samo one jone koji se od jona iz prvog analizatora razlikuju za određeni broj masenih jedinica, koje odgovaraju gubitku neutralnog fragmenta. Ovi eksperimenti se koriste za izolovanje i analizu smeše karboksilnih kiselina sa drugim supstancama, jer se karboksilne kiseline fragmentišu uz gubitak neutralnog fragmenta CO_2 (razlika u masi jona je 44 Da). Neutralni fragmenti su najčešće NH_3 , HCN , H_2O ili H_2S . Jonski trap i kombinacija kvadrupola sa ToF-om ne mogu da izvode ni ovaj tip eksperimenata.

Praćenje odabrane reakcije je analogno SIM tehnici u standardnoj masenoj spektrometriji. Koristi se za poznata jedinjenja radi potvrđivanja njihovog prisustva u uzorku. Oba masena analizatora su podešena da prate jedan ili više poznatih jona prekursora i poznatih fragmentnih jona, čime je povećana osetljivost i selektivnost [13–18].

1.1.3. Sprega tačne hromatografije i masene spektrometrije (LC–MS)

Glavno ograničenje hromatografije, kada je u pitanju analiza smeša je njena nesposobnost da obezbedi nedvosmisleno identifikaciju komponenata smeše, čak i ako su one međusobno potpuno razdvojene. Identifikacija se zasniva na poređenju retencionih karakteristika (u najjednostavnijem slučaju retencionih vremena) nepoznate supstance sa referentnim materijalom koji se analizira po istim eksperimentalnim uslovima. Drugi problem je što postoji mnogo jedinjenja koja pokazuju slično ponašanje u hromatografskom sistemu, pa se i pored toga što je opseg variranja hromatografskih uslova veoma širok, nikako ne mogu razdvojiti, pa samim tim ni identifikovati i kvantifikovati korišćenjem samo hromatografske metode.

Sa druge strane, moć masene spektrometrije počiva na činjenici da je maseni spektar jedinjenja dovoljno specifičan da omogući njegovu identifikaciju. Takođe, ova metoda zahteva malu količinu uzorka i vrlo je osetljiva. Posebno je korisna kod analize jedinjenja koja nemaju specifične hromofore. Međutim, ako se ispitivano jedinjenje nalazi u složenoj smeši, u masenom spektru će se naći joni koji potiču od svih komponenata smeše, pa je identifikacija mnogo teža, ako ne i nemoguća. Iz svih ovih razloga značajan napredak je postignut kombinovanjem sposobnosti razdvajanja komponenti smeša hromatografskom metodom sa sigurnom identifikacijom koju omogućuje maseni spektrometar. Ovom spregom je omogućena identifikacija i kvantifikacija jedinjenja koja imaju iste retencione karakteristike, a različite masene spektre, iako nisu potpuno razdvojene u hromatografskom sistemu.

Prva kombinacija hromatografije i masene spektrometrije se pojavila krajem 1950-ih godina i to kao kombinacija gasne hromatografije i masene spektrometrije (GC–MS). Relativno lako kombinovanje ove dve tehnike ogleda se u tome što obe tehnike zahtevaju da uzorci koji se analiziraju budu u gasovitom stanju, odnosno isparljivi i termički stabilni, jer se analize rade na povišenim temperaturama. Ovo je uslovalo da se uzorak koji izlazi iz GC sistema može direktno povezati na MS detektor, bez ikakvog interfejsa.

Ovo nije slučaj kod kombinacije tačne hromatografije i masene spektrometrije, jer uzorci iz HPLC sistema izlaze u tečnom stanju i ne mogu se direktno preneti u MS detektor, već je potrebno umetanje određenog interfejsa čija je uloga otklanjanje mobilne faze i prevođenje uzorka u gasovito stanje. Najčešće korišćeni interfejsi su ESI

i APCI, koji su ujedno i jonski izvori. I pored korišćenja interfejsa prilikom kombinovanja HPLC i MS tehnike može se javiti nekoliko problema.

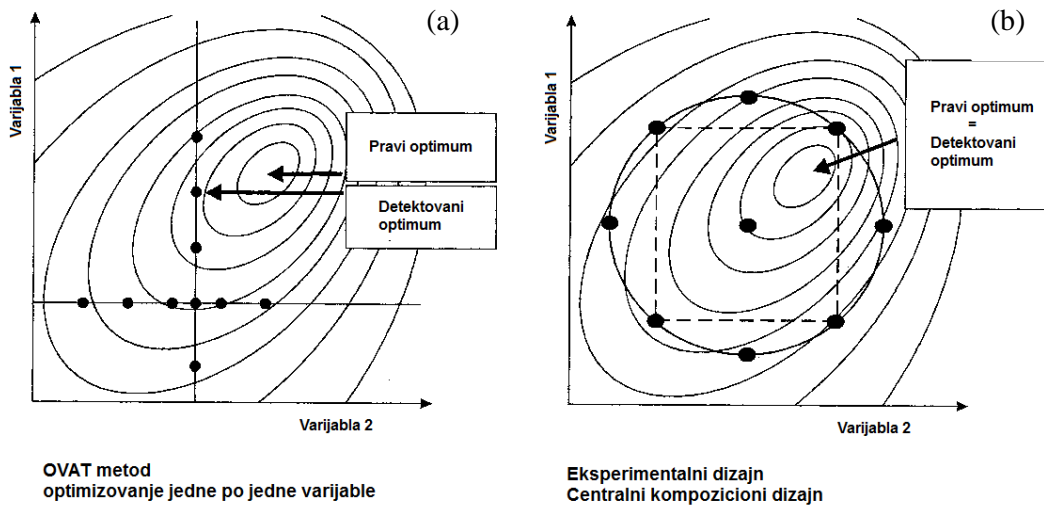
Prvi problem je što se termolabilne supstance koje se analiziraju HPLC metodom mogu degradirati prevođenjem u gasovito stanje i jonizacijom koja se radi na povišenoj temperaturi. Drugi problem je što HPLC metode koriste protok mobilne faze od obično 1 mL min^{-1} , a kod ESI tehnike jonizacije neophodan je mali protok zbog raspršivanja tečnosti u električnom polju. Korišćenjem ESI kao interfejsa oba problema su rešena. Do degradacije termolabilnih supstanci ne dolazi, jer se jonizacija dešava direktno iz rastvora. Za smanjenje protoka obično se koriste posebne račve koje omogućavaju da u ESI interfejs, koji se postavlja između HPLC i MS sistema, ulazi mobilna faza brzinom od $100\text{--}200 \mu\text{L min}^{-1}$. Kada je APCI u pitanju, on može da radi i pri protocima do 2 mL min^{-1} , a struktura i način rada instrumenta sprečavaju degradaciju analita.

Isto tako, rastvarači koji se koriste za MS moraju imati nisku temperaturu isparavanja i mali površinski napon zbog mogućnosti stabilnog raspršivanja. Zato se dosta koriste acetonitril i metanol, a mobilne faze koje sadrže samo vodenu komponentu treba izbegavati. Takođe, u HPLC analizama se često koriste puferi, kao što su fosfatni, sulfatni ili boratni, koji nisu isparljivi i nagomilavaju se na samom interfejsu. Zbog toga se ovi puferi moraju zameniti isparljivijim, kao što je amonijum-acetat, karbonat ili formijat. Koncentracija pufera ne treba biti ni prevelika ni pre mala, jer prisustvo pufera olakšava raspršivanje kapljica, ali pri velikim koncentracijama pufera smanjuje se osetljivost detektora, usled kompeticije molekula analita i pufera pri jonizaciji. Za postizanje određenih pH vrednosti mobilne faze, koje će omogućiti jonizaciju molekula analita još u mobilnoj fazi, preporučuju se trifluorosirćetna, mravlja ili sirćetna kiselina (za formiranje pozitivnih jona) i amonijum-hidroksid (za formiranje negativnih jona) [13–18].

1.2. PRIMENA HEMOMETRIJE U RAZVOJU ANALITIČKIH METODA

Hemometrija predstavlja hemijsku disciplinu koja koristi matematičke, statističke i druge logičke metode za dizajniranje i odabir optimalnih eksperimenata i procesa merenja da bi se dobio maksimum relevantnih informacija analiziranjem dostupnih hemijskih podataka [19,20].

Hemometrija je, zbog svog sistematičnog pristupa, našla primenu u razvoju analitičkih metoda i to u optimizaciji i ispitivanju robusnosti metode. Klasičan pristup optimizaciji metode podrazumevao je optimizovanje jedne po jedne promenljive (eng. *one-variable-at-a-time*, *OVAT*), dok se ostale promenljive održavaju na konstantnom nivou. Nedostaci ovog pristupa su što se ne uzima u obzir uticaj međusobnih interakcija promenljivih na posmatrani sistem, analizira se uzak opseg mogućih vrednosti promenljivih i detektovana optimalna vrednost promenljive često nije i prava optimalna vrednost (Slika 2a).



Slika 2. Poređenje dobijene i stvarne optimalne vrednosti promenljive kod klasičnog pristupa optimizaciji metode (a) i primenom eksperimentalnog dizajna (b) [21].

S druge strane primenom hemometrije, odnosno eksperimentalnog dizajna jedna promenljiva se može optimizovati u predefinisanoj opsegu izvođenjem relativno malog broja eksperimenata u kojima se vrednosti više promenljivih menjaju u isto vreme. Ovim se postiže istovremena optimizacija više promenljivih koji imaju uticaj na ponašanje sistema i otkrivanje njihove prave optimalne vrednosti, jer se uzima u obzir uticaj parametarskih interakcija na posmatrani sistem (Slika 2b) [21].

1.2.1. Teorijske osnove eksperimentalnog dizajna

Eksperimentalni dizajn predstavlja metodologiju planiranja i izvođenja eksperimenata u cilju dobijanja maksimalne količine informacija iz što manjeg broja

eksperimenata [22]. Za dobro sprovođenje eksperimentalnog dizajna bitno je poznavati njegove teorijske osnove.

Sprovođenje eksperimentanlog dizajna zasniva se na opštoj teoriji sistema, po kojoj je sistem ograničena celina koja se sastoji od ulaza (eng. *inputs*), izlaza (eng. *outputs*) i transformacija koje se među njima dešavaju unutar te ograničene celine. Intenzitet ulaza i izlaza naziva se nivo.

Ulazi su veličine koje mogu, ali i ne moraju, imati uticaja na sistem i mogu biti označeni kao promenljive ili faktori. Promenljive su kvalitativne ili kvantitativne nezavisno promenljive koje mogu preuzeti jednu od beskonačnog broja ponuđenih vrednosti, dok se faktori definišu kao promenljive koje utiču na određeni rezultat ili proces, odnosno imaju uticaja na sistem. Izlazi su veličine na koje može, ali i ne mora, da utiče sistem. Izlazi na koje sistem ima uticaja nazivaju se odgovori sistema. Transformacija predstavlja vezu izmenu faktora i odgovora sistema. Matematička funkcija koja opisuje ponašanje sistema i povezuje nivoe faktora i nivoe odgovora sistema naziva se funkcija odgovora ili matematički model [23,24].

Najjednostavniji matematički model koji povezuje faktore (nezavisno promenljive označene sa x) i odgovore sistema (zavisno promenljive označene sa y), je linearni model ili polinom prvog reda:

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

gde je k ukupan broj promenljivih, ε greška, b_0 odsečak, a $b_1x_1, b_2x_2, b_3x_3, \dots, b_kx_k$ su linearni članovi.

Sledeći, složeniji model predstavlja se polinomom drugog reda i naziva se interakcioni model. Interakcioni model sadrži odsečak, linearne članove i članove interakcija.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_kx_k + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 \dots + b_{(k-1)k}x_{(k-1)}x_k + \varepsilon \quad (2)$$

gde su $b_{12}x_1x_2, b_{13}x_1x_3, b_{23}x_2x_3 \dots b_{(k-1)k}x_{(k-1)}x_k$ članovi interakcija.

Treći tip modela je kvadratni model i, za razliku od interakcionog modela, sadrži još i kvadratne članove, zbog čega može da opiše i nelinearne veze između faktora i odgovora sistema.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_kx_k + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + \dots + b_{(k-1)k}x_{(k-1)}x_k + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + \dots + b_{kk}x_k^2 + \varepsilon \quad (3)$$

gde su $b_{11}x_1^2, b_{22}x_2^2 \dots b_{kk}x_k^2$ kvadratni članovi [23,25].

Eksperimentalno dobijene vrednosti odgovora sistema, koje se označavaju sa y , retko kada odgovaraju u potpunosti odgovorima sistema dobijenim računski iz polinoma koji opisuje model, a koji se označavaju sa \hat{y} [23].

Koeficijenti u polinomina ($b_1, b_2 \dots b_k, b_{12}, b_{13} \dots b_{(k-1)k}, b_{11}, b_{22} \dots b_{kk}$) mogu biti pozitivni ili negativni što ukazuje da li su faktor i odgovor sistema u direktnoj ili obrnutoj srazmeri. Ukoliko je koeficijent pozitivan, sa povećanjem vrednosti ispitivanog faktora, povećava se i vrednost odgovora sistema i obrnuto u slučaju negativne vrednosti koeficijenta modela.

Koeficijenti linearnih članova govore o direktnoj vezi između ispitivanih faktora i odgovora sistema. Koeficijenti kvadratnih članova su odgovorni za zakrivljenost površine odgovora i pojavu minimuma i maksimuma. Zahvaljujući tome mogu se odrediti optimalni nivoi ispitivanih faktora. Koeficijenti članova interakcija se odnose na eventualno prisutne interakcije između faktora. Značajnost ovih koeficijenata se može proceniti preko površine odgovora sistema. Ukoliko je ona planarna, može se zaključiti da nema statistički značajnih interakcija. Ukoliko postoje interakcije između dva faktora, to znači da intenzitet uticaja jednog faktora na odgovor sistema zavisi od intenziteta drugog faktora [23,26].

Koeficijenti modela se izračunavaju uz pomoć statističkih programa koji koriste višestruku linearnu regresionu analizu (eng. *multiple linear regression, MLR*), regresionu analizu glavnih komponentata (eng. *principal components regression, PCR*) i metodu parcijalno najmanjih kvadrata (eng. *partial least squares, PLS*). Pošto faktori, kao i eksperimentalni opsezi u kojima se oni ispituju, mogu biti veoma različiti, da bi koeficijenti modela mogli biti predstavljeni na uporednoj skali i da bi se mogli lakše

tumačiti, nivoi faktora su obično kodirani. Najčešći način kodiranja je matematički, pri čemu se niži, viši i srednji nivo kodiraju oznakama -1 , $+1$ i 0 .

Značajnost faktora se procenjuje na osnovu veličine njihovih koeficijenata. Veći koeficijent znači i veći uticaj tog faktora na sistem, a značajnost se statistički procenjuje najčešće uz pomoć Studentovog t -testa, F -testa ili grafika verovatnoće normalne raspodele (eng. *normal probability plots*) [23].

U slučaju Studentovog t -testa izračunata t -vrednost se upoređuje sa tabelarnom t -vrednošću za odgovarajući broj stepeni slobode i odabranu verovatnoću. Faktore čija je izračunata t -vrednost veća od tabelarne smatramo značajnim. Značajnost faktora može se grafički prikazati upotrebom *Pareto* dijagrama [27].

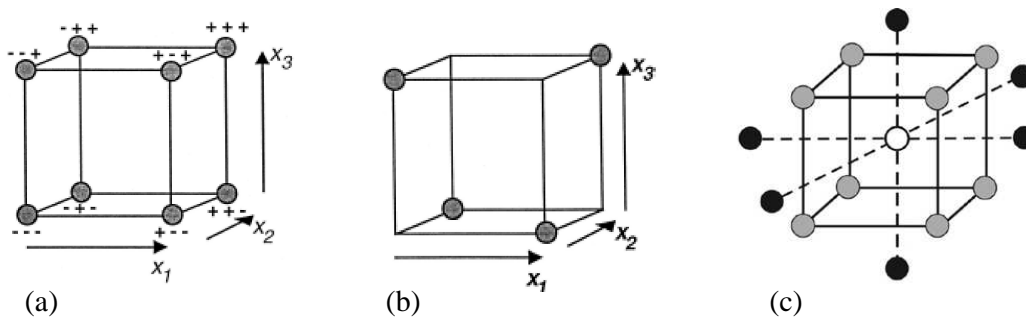
Osim procene značajnosti faktora neophodno je proceniti i da li postoji neslaganje izabranog matematičkog modela i eksperimentalnih podataka (eng. *lack of fit*). To se vrši primenom analize varijanse (eng. *analysis of variance, ANOVA*) [23].

1.2.2. Vrste eksperimentalnog dizajna

Ukoliko bi se tokom ispitivanja jednog sistema optimizovao veliki broj promenljivih koje teoretski mogu uticati na sistem to bi zahtevalo izvođenje velikog broja eksperimenata. Zbog toga početna faza svakog istraživanja obično podrazumeva *screening* fazu, čiji je cilj smanjenje broja eksperimenata na taj način što se procenjuje koje promenljive imaju značajan uticaj na ponašanje sistema i samo se one ispituju detaljnije u sledećim fazama. Kao modeli najčešće se koriste linearni i interakcioni model, pa se kao *screening* dizajn najviše koriste pun faktorski i frakcioni faktorski dizajn [22,25].

Pun i frakcioni faktorski dizajn mogu da obuhvataju ispitivanja promenljivih na dva, tri ili više nivoa. S obzirom da je cilj *screening* dizajna smanjenje broja eksperimenata, najčešće se promenljive ispituju na dva nivoa (viši i niži nivo), a nivoi se određuju na osnovu rezultata preliminarnih ispitivanja. Pun faktorski dizajn podrazumeva da se sve promenljive ispituju na svim nivoima, a ukupan broj eksperimenata ako se koriste dva nivoa promenljivih se računa kao 2^k , gde je k broj ispitivanih promenljivih. Ukoliko se ispituju tri promenljive na dva nivoa ukupan broj eksperimenata je $2^3=8$ i eksperimenti se mogu prikazati kao uglovi kocke (slika 3a). Kako raste broj promenljivih, naglo raste i broj eksperimenata koje je potrebno izvršiti,

pa se vrši frakcionisanje faktorskog dizajna, odnosno vrši se izbacivanje određenih eksperimenata iz samog dizajna. Frakcionisanje se zasniva na pretpostavci da su interakcije između tri i više promenljivih zanemarljive u poređenju sa glavnim efektom promenljive i interakcijom između dve promenljive [21]. Broj eksperimenata u takvom frakcionom faktorskom dizajnu je $2^{k-p} + C$, gde je k broj ispitivanih promenljivih, C je broj replikacija u centralnoj tački i p je ceo broj koji pokazuje kako je frakcionisan faktorski dizajn [28]. Na slici 3b je predstavljen prostorni raspored eksperimenata 2^{3-1} frakcionog faktorskog dizajna, pri čemu se uočava da eksperimenti imaju formu geometrijske figure tetrahedrona. To je najveća moguća zapremina koju mogu ograničavati četiri tačke u trodimenzionalnom prostoru. Dakle, kod frakcionog faktorskog dizajna eksperimenti pokrivaju najveću moguću zapreminu eksperimentalnog domena, iako se izvodi ograničeni broj eksperimenata [25].



Slika 3. Plan eksperimenata pri ispitivanju tri promenljive na dva nivoa u slučaju punog faktorskog dizajna (a), 2^{3-1} frakcionog faktorskog dizajna (b) i centralnog kompozicionog dizajna [25]

Detaljnija analiza sistema postiže se upotrebom optimizacione vrste dizajna kod kojih se izabrani faktori ispituju na više nivoa (najmanje tri). Cilj ove faze je da se optimizuju promenljive koje imaju značajan uticaj na ponašanje sistema i u tu svrhu se najčešće koriste pun faktorski, centralni kompozicioni ili *Box-Behnken*-ov dizajn [23,29].

Centralni kompozicioni dizajn nastaje kada se na pun faktorski dizajn doda zvezdasti dizajn (slika 3c). Ukupan broj eksperimenata sa k promenljivih 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. Ponavljanje ispitivanja u centralnoj tački omogućava određivanje eksperimentalne greške. Dužina grana u zvezdastom dizajnu (α) igra glavnu ulogu u izgledu centralnog kompozicionog dizajna. Ukoliko je $\alpha \neq 1$, svaka promenljiva će se ispitivati na pet nivoa ($-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$) [26,29,30]. Vrednost α zavisi od broja promenljivih i može se izračunati kao $\alpha = 2^{N/4}$, gde je N broj promenljivih [31].

Ova vrsta dizajna za određivanje optimuma izabranih faktora koristi kvadratni model, kao i metodologiju površine odgovora (eng. *response surface methodology*, *RSM*) koja predstavlja geometrijsku prezentaciju odgovora sistema u okviru eksperimentalnog regiona u funkciji jednog ili više faktora. Dobijeni odgovor može biti prikazan kao linija u dvodimenzionalnom prostoru (ispituje se jedan faktor), površina u trodimenzionalnom prostoru (dva faktora se ispituju) ili hiperpovršina u višedimenzionalnom prostoru (ispituje se veći broj faktora) [22,23]. Na ovaj način je jednostavno utvrditi optimalnu vrednost za određeni faktor, jer ona predstavlja minimum ili maksimum na dobijenoj površini odgovora.

1.2.3. Metodologija multikriterijumskog odlučivanja

I dok je relativno jednostavno utvrditi optimalnu vrednost za jedan faktor korišćenjem metodologije površine odgovora, problem nastaje ukoliko je potrebno optimizovati više faktora istovremeno, odnosno zadovoljiti više ciljeva u isto vreme. U hromatografiji je najčešće potrebno postići dobro razdvajanje svih ispitivanih komponenti uz najkraće moguće trajanje hromatografske analize. Ukoliko se optimalne vrednosti ispitivanih faktora nalaze u različitim delovima eksperimentalnog regiona i ne preklapaju se, veliki je problem pronaći uslove koji simultano zadovoljavaju više hromatografskih ciljeva, odnosno odgovora sistema. U ovakvim slučajevima se koristi metodologija multikriterijumskog odlučivanja (eng. *multicriteria methodology* ili *multiple response methodology*) da bi se napravio odgovarajući kompromis između zadatih hromatografskih ciljeva [27].

Deringerova funkcija poželjnih odgovora (eng. *Derringer desirability function*) je najznačajnija i najčešće korišćena metodologija multikriterijumskog odlučivanja kada je u pitanju optimizacija analitičkih metoda [30,32–37], jer je primenljiva na linearne i nelinearne matematičke modele i ne zahteva odabir prioritnog odgovora sistema. Ova

metodologija se bazira na konstruisanju funkcije poželjnih odgovora za svaki pojedinačan odgovor sistema (d_i) u koju se unose zahtevi, odnosno ciljevi koje svaki odgovor sistema treba da zadovolji, kao i relativni značaj tog odgovora. Skala za svaku pojedinačnu funkciju poželjnih odgovora se kreće od $d = 0$ za potpuno nepoželjan nivo odgovora do $d = 1$ za savršeno poželjan odgovor.

Ukoliko je cilj dobijanje maksimalnog odgovora sistema, pojedinačna funkcija poželjnog odgovora se računa prema jednačini:

$$d_i = \left[\frac{Y_i - Min_i}{Max_i - Min_i} \right]^{wt_i} \quad Min_i < Y_i < Max_i \quad (4)$$

gde je Y_i odgovor sistema predviđen od strane odabranog matematičkog modela, Max_i i Min_i su najviša i najniža dobijena vrednost za ispitivani odgovor sistema, a wt_i je relativni značaj koji je dodeljen odgovoru.

Cilj može da bude i dobijanje minimalnog odgovora sistema, gde se pojedinačna funkcija poželjnog odgovora računa prema jednačini:

$$d_i = \left[\frac{Max_i - Y_i}{Max_i - Min_i} \right]^{wt_i} \quad (5)$$

Ukoliko je cilj dobijanje tačno određene vrednosti za odgovor sistema, pojedinačna funkcija poželjnog odgovora računa prema jednačini:

$$\left. \begin{array}{l} d_i = 0, \quad \text{za } Y_i < Min_i \quad \text{ili} \quad Y_i > Max_i \\ d_i = \left(\frac{Y_i - Min_i}{T^{\min}_i - Min_i} \right)^{wt_i}, \quad \text{za} \quad Min_i < Y_i < T^{\min}_i \\ d_i = \left(\frac{Max_i - Y_i}{Max_i - T^{\max}_i} \right)^{wt_i}, \quad \text{za} \quad T^{\max}_i < Y_i < Max_i \\ d_i = 1, \quad \text{za} \quad T^{\min}_i < Y_i < T^{\max}_i \end{array} \right\} \quad (6)$$

gde su T^{\min}_i i T^{\max}_i izabrana donja i gornja granica za traženi odgovor sistema.

Ukoliko je cilj da se odgovor sistema nađe u određenom opsegu, pojedinačna funkcija poželjnog odgovora računa prema jednačinama:

$$d_i = 0, \text{ for } Y_i = Min_i \quad (7)$$

$$d_i = 1, \text{ for } Min_i < Y_i < Max_i \quad (8)$$

Uz pomoć pojedinačni funkcija poželjnih odgovora računa se ukupna funkcija poželjnih odgovora (D) preko formule:

$$D = (d_1^{w_1} \times d_2^{w_2} \times \dots \times d_i^{w_i})^{1/\sum w_i} \quad (9)$$

gde je i broj posmatranih odgovora sistema. Ukupna funkcija poželjnih odgovora predstavlja težinsku geometrijsku sredinu pojedinačnih funkcija poželjnih odgovora [34,37,38]. Kao i pojedinačne, tako i ukupna funkcija poželjnih odgovora može da ima vrednosti od $D = 0$ kada svi odgovori sistema imaju nepoželjnu vrednost do $D = 1$ za kada svi odgovori sistema imaju poželjnu vrednost. Što je D vrednost bliža jedinici to je sistem bliži globalnom optimumu, odnosno svi odgovori sistema su bliži ciljanoj vrednosti. Ukupna funkcija poželjnih odgovora se može prikazati u vidu trodimenzionalnog prostora radi lakšeg uočavanja globalnog optimuma [36,39].

1.3. STUDIJE FORSIRANE DEGRADACIJE

Studije forsirane degradacije ili stres studije su važan deo procesa razvoja leka. Ove studije se sprovode u cilju razvoja i validacije metoda za praćenje stabilnosti leka (eng. *stability-indicating method*), otkrivanja mogućih mehanizama, odnosno puteva degradacije leka i definisanja njegove suštinske stabilnosti, kao i identifikacije potencijalnih degradacionih proizvoda. Podaci dobijeni iz ove studije predstavljaju korisne informacije prilikom definisanja uslova čuvanja leka, primarnog i sekundarnog pakovanja leka, načina proizvodnje i kompatibilnosti sa određenim ekscipijensima [40,41].

1.3.1. Eksperimentalni uslovi za sprovođenje forsirane degradacije

Studije forsirane degradacije se sprovode na farmaceutskim aktivnim supstancama i farmaceutskim doziranim oblicima u čvrstom obliku, kao i u rastvorima ili suspenzijama. Iako regulativa, a pre svega ICH smerinice [42] zahtevaju studije forsirane degradacije u određenim fazama razvoja leka, ne postoje jasna uputstva za njihovo izvođenje.

Eksperimentalni uslovi za sprovođenje studije forsirane degradacije moraju da obuhvate ispitivanje osetljivosti leka na hidrolizu, oksidaciju, termalnu degradaciju, vlagu i svetlost. U literaturi se mogu pronaći protokoli iz prakse koji preporučuju način

spvođenja forsirane degradacije farmaceutske aktivne supstance i farmaceutskog doziranog oblika, kao što je prikazano u tabeli 2 [41].

Tabela 2. Protokol za sprovođenje forsirane degradacije farmaceutske aktivne supstance i farmaceutskog doziranog oblika [41]

Uslovi	Farmaceutska aktivna supstanca		Farmaceutski dozirani oblik	
	čvrsta faza	rastvor/suspencija	čvrst dozirani oblik	tečan dozirani oblik
kisela/neutralna				
/bazna hidroliza	-	+	-	o
oksidacija	o	+	+	+
fotostabilnost	+	o	+	+
termalna degradacija	+	-	+	+
termalna+vlaga	+	-	+	-

- nije potrebno raditi, + potrebno je raditi, o opciono

Propisano je da se studija izvodi na jednoj seriji proizvoda i eksperimentalni uslovi treba da budu mnogo ekstremniji nego u ubrzanim studijama stabilnosti, ali tačne uslove za sprovođenje studije treba da definiše proizvođač na osnovu fizičko-hemijskih karakteristika leka [40–42].

Ispitivanje osetljivosti na hidrolizu vrši se na rastvorima ili, ukoliko je supstanca nerastvorna, na suspenzijama farmaceutske aktivne supstance u odgovarajućem rastvaraču. Ispitivanja treba da obuhvate široki opseg pH vrednosti da bi se proverila mogućnost hidrolize u kiselj, neutralnoj i baznoj sredini. Za ispitivanja u kiselj sredini najčešće se koriste rastvori HCl ili H₂SO₄ u koncentraciji 0,1–1 mol L⁻¹, dok se za baznu sredinu mogu koristiti NaOH, KOH ili LiOH u istoj koncentraciji. Uzorci se mogu grejati izvesno vreme na određenoj temperaturi, jer povišena temperatura ubrzava reakcije hidrolize. Prilikom ovih eksperimenata treba voditi računa o izboru rastvarača, jer pojedini rastvarači, kao što je metanol mogu da interferiraju i stupaju u reakcije sa nastalim proizvodima degradacije, posebno u kiselj sredini [41].

Osetljivost na oksidaciju se može ispitati u atmosferi kiseonika ili u prisustvu peroksida. Prisustvo slobodnih radikala, metalnih jona i povišena temperatura ubrzavaju

oksidaciju. Ukoliko se koristi vodonik peroksid za degradaciju, preporučena koncentracija je 0,3–3% [41].

Ispitivanja termalne degradacije i uticaja vlage vrše se primenom temperature iznad 50 °C i relativne vlažnosti iznad 75% [41,42].

Studije fotostabilnosti je neophodno izvoditi u skladu sa ICH Q1B smernicom [43] prema kojoj je za formalne studije stabilnosti uzorak potrebno izlagati svetlosti ukupnog zračenja ne manjeg od 1,2 miliona luks časova i integriranoj bliskoj ultraljubičastoj energiji ne manjoj od 200 Wh m⁻². Za forsiranu degradaciju zračenje treba da bude barem dva puta veće od zračenja predloženog ICH smernicom [41].

Cilj svakog eksperimenta je da se postigne odgovarajući nivo degradacije farmaceutske aktivne supstance (5–20%) za relativno kratak vremenski period, izlaganjem uzorka ekstremnijim uslovima. Smatra se da ovaj procenat degradacije predstavlja reprezentativne sliku koja odgovara onoj degradaciji koja bi se dogodila i pri realnim uslovima čuvanja. Degradacija manja od 5% otežava identifikaciju primarnih nečistoća, jer su one prisutne u maloj količini, dok veliki procenat degradacije povećava mogućnost stvaranja sekundarnih i tercijalnih degradacionih proizvoda, što nepotrebno komplikuje interpretaciju rezultata [41,44]. Vremenski period izlaganja *stress* agensu zavisice od osetljivosti supstance. Izlaganje treba da traje dok se ne postigne željena degradacija, a maksimum izlaganja se može naći u literaturi [41,44] i prikazan je u Tabeli 3. Ukoliko se supstanca ne razgradi nakon ovog perioda smatra se da je stabilna prema navedenom *stress* agensu.

Tabela 3. Uslovi i vreme izlaganja uzorka stres uslovima u studijama forsirane degradacije

Uslovi	Vreme izlaganja
0,1–1 M HCl do 70 °C	1–14 dana
0,1–1 M NaOH do 70 °C	1–14 dana
Vodeni rastvor do 70 °C	1–14 dana
0,3–3% H ₂ O ₂ do 30 °C	1–7 dana
Temperatura do 70 °C	1–3 nedelje
Temperatura do 70 °C i 75% RH	1–3 nedelje
Svetlost	2–3 puta više od ICH uslova

Preporučljivo je istraživanja sprovoditi pri koncentraciji farmaceutske aktivne supstance od 0,1–1 mg mL⁻¹, jer se pri ovoj koncentraciji mogu detektovati i najmanje količine nastalih proizvoda degradacije. Zajedno sa *stress* uzorkom treba izvršiti ispitivanje još tri uzorka i to slepe probe, slepe probe koja se podvrgava *stress* uslovima i standardnog rastvora za poređenje. Pri tome, slepa proba sadrži samo odgovarajući rastvarač, slepa proba koja se podvrgava *stress* uslovima sadrži rastvarač i *stress* agens, i standardni rastvor za poređenje sadrži farmaceutski aktivnu supstancu u rastvaraču bez izlaganja *stress* agensu. Za farmaceutski dozirani oblik slepa proba sadrži i placebo, čime se omogućava identifikacija proizvoda degradacije koji potiču od placeba i uvid u kompatibilnost ekscipijenasa [41,45].

Prilikom ispitivanja *stress* uzoraka treba voditi računa o ravnoteži mase (eng. *mass balance*) o čemu govori ICH smernica koja kaže da je potrebno *izračunati zbir sadržaja farmaceutske aktivne supstance i nastalih proizvoda degradacije da bi se videlo koliko je ta vrednost blizu 100% od početne vrednosti sadržaja aktivne supstance u uzorku pre izlaganja stress uslovima, da bi se procenila greška metode* [42], odnosno da bi se dokazalo da je metoda u stanju da detektuje sve nastale degradacione proizvode (npr. da nije došlo do koeluiranja supstanci). Poteškoće u postizanju ravnoteže mase mogu nastati usled različitih ekstinkcionih koeficijenata nastalih degradacionih proizvoda, nastanka isparljivih degradacionih proizvoda ili proizvoda bez UV hromofore, ne eluiranja supstance sa kolone, slabe rastvorljivosti u rastvaraču itd [45].

1.3.2. Metode za praćenje stabilnosti

Metoda za praćenje stabilnosti farmaceutske proizvoda (eng. *stability-indicating method*) je validirana, kvantitativna analitička metoda koja može detektovati promene u hemijskim, fizičkim i mikrobiološkim karakteristikama farmaceutske aktivne supstance ili farmaceutske doziranog oblika, koje mogu nastati tokom vremena, i koja je specifična te može tačno odrediti sadržaj aktivne supstance, degradacionih proizvoda i drugih komponenata od interesa [46].

Razvoju metode za praćenje stabilnosti leka prethodi analiza hemijske strukture ispitivane supstance i predviđanje mogućih puteva degradacije. Na osnovu ovih informacija postavljaju se uslovi pri kojima će se izvoditi studije forsirane degradacije,

koje će poslužiti da se dokaže selektivnost metode za praćenje stabilnosti. *Stress* uzorci se zatim analiziraju metodom za praćenje stabilnosti. U ove svrhe se najčešće koriste HPLC metode sa PDA ili MS detektorom, koji omogućavaju praćenje čistoće svakog eluiranog pika. Hromatografski uslovi se koriguju da bi se uklonilo koeluiranje pikova i dobili hromatografski čisti pikovi. Ovom prilikom treba voditi računa da metoda treba da omogući razdvajanje i kvantifikovanje samo degradacionih proizvoda koji su značajni, odnosno ključni (eng. *key degradants*), jer su to degradacioni proizvodi koji će verovatno nastati i pri realnim uslovima čuvanja [41,45]. Kriterijumi za procenu značajnosti degradacionih proizvoda u različitim fazama razvoja leka dati su u Tabeli 4. Samo degradacioni proizvodi koji zadovolje oba uslova data u Tabeli 4 smatraju se ključnim degradacionim proizvodima [41].

Tabela 4. Kriterijumi za odabir ključnih degradacionih proizvoda u različitim fazama razvoja leka [41]

Faza	Predklinička ispitivanja-Faza 2		Faza 2 - Registracija	
	API	DP	API	DP
% degradacionog proizvoda u odnosu na ukupnu degradaciju	>10%	>10%	>10%	>10%
% degradacionog proizvoda u odnosu na najzastupljeniji degradacioni proizvod	>25%	>10%	>10%	>10%

API – farmaceutska aktivna supstanca, DP – farmaceutski dozirani oblik

U sledećoj fazi je potrebno identifikovati značajne degradacione proizvode. Najčešće metode za identifikaciju proizvoda degradacije su LC–MS, LC–MS/MS ili LC–NMR. Ovde treba imati na umu da regulativa zahteva identifikaciju samo onih degradacionih proizvoda za koje je dokazano da nastaju u toku dugoročnih i ubrzanih studija stabilnosti u količini većoj od identifikacionog praga [42].

Nakon što se izvrši odabir ključnih degradacionih proizvoda za koje je potrebno prikazati da je metoda za praćenje stabilnosti odgovarajuća za njihovo razdvajanje od aktivne supstance i kvantifikaciju, pristupa se optimizaciji i validaciji metode. Metoda se u novije vreme optimizuje primenom eksperimentalnog dizajna, koji omogućava sistematičan pristup optimizaciji. Nakon optimizacije metoda se validira da bi se pokazalo da odgovara planiranoj nameni praćenja stabilnosti. Tom prilikom određuju se

selektivnost, linearnost, opseg, tačnost, preciznost, limiti detekcije, kvantifikacije i robusnost u skladu sa ICH smernicama [4].

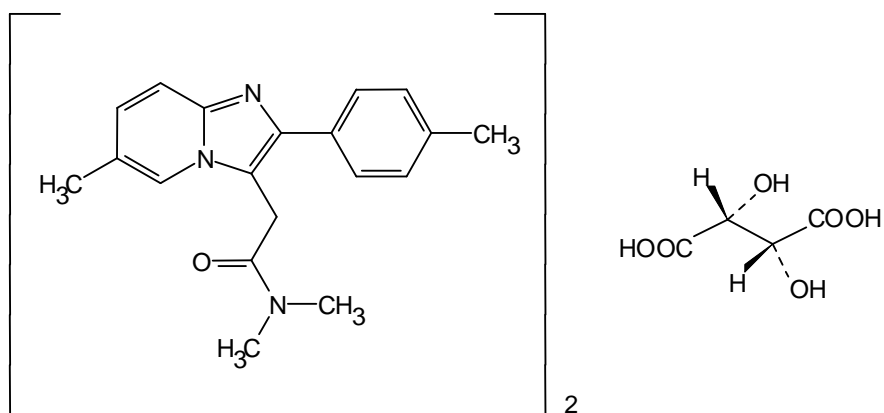
Kod validirane HPLC metode za ispitivanje degradacionih proizvoda integralni deo metode je provera pogodnosti sistema koja pokazuje da li hromatografski sistem u datom trenutku u potpunosti odgovara planiranoj nameni. Parametri koji se ispituju su najčešće rezolucija, relativno retenciono vreme, faktori kapaciteta i simetrije, odnos signal/šum, broj teoretskih platoa i relativna standardna devijacija ponovljenih injektovanja. Ovi faktori moraju da zadovolje kriterijume definisane pri razvoju i validaciji metode [8].

1.4. ANALITIKA ZOLPIDEM-TARTARATA

Zolpidem-tartarat je nebenzodiazepinski sedativ i hipnotik, koji se koristi za kratkotrajno lečenje nesаницe. Mehanizam dejstva ostvaruje vezivanjem na benzodiazepinsko vezujuće mesto na GABA_A receptoru u CNS-u [47,48].

1.4.1. Struktura i osobine zolpidem-tartarata

Zolpidem-tartarat (lat. *zolpidemi tartras*) hemijski predstavlja bis[N,N-dimetil-2-[6-metil-2-(4-metilfenil)imidazo[1,2-a]piridin-3-il]acetamid] (2R,3R)-2,3-dihidroksibutandioat, dok mu je molekulska formula C₄₂H₄₈N₆O₈ [8]. Molekulska masa zolpidem-tartarata je 765, a zolpidem baze 307 [10]. Hemijska struktura zolpidem-tartarata je prikazana na slici 4.



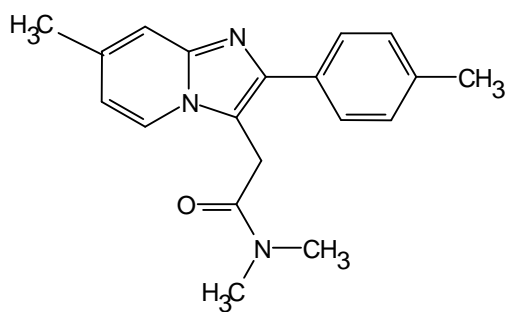
Slika 4. Strukturna formula zolpidem-tartarata [8].

Zolpidem-tartarat je beo ili skoro beo higroskopan, kristalni prašak. Teško je rastvoran u vodi (23 mg mL^{-1} na temperaturi od $20 \text{ }^\circ\text{C}$), umereno rastvoran u metanolu, gotovo nerastvoran u metilen hloridu. Tačka topljenja zolpidem-tartarata je $193 \text{ }^\circ\text{C}$ – $197 \text{ }^\circ\text{C}$, a pH zasićenog rastvora na $20 \text{ }^\circ\text{C}$ je 4,4–4,6. Konstanta disocijacije (pK_a) zolpidem-tartarata je 2,42, a zolpidema 6,2. Particioni koeficijent (Log P) za zolpidem-tartarat je 2,4, a za zolpidem 3,85 (oktanol/voda). [8,10,49]. Zolpidem-tartarat ne pokazuje polimorfne osobine. Što se stereochemijskih osobina tiče, zolpidem ne poseduje asimetrični centar i javlja se u jednoj, optički neaktivnoj formi. Ne pokazuje ni cis-trans izomeriju, a po strukturi zolpidem-tartarat predstavlja so L-(+)-vinske kiseline.

1.4.2. Nečistoće zolpidem-tartarata

Nečistoće koje se mogu javiti u sirovini zolpidem-tartarata mogu se podeliti u četiri grupe: sintetske nečistoće, degradacioni proizvodi, rezidualni rastvarači i neorganske nečistoće.

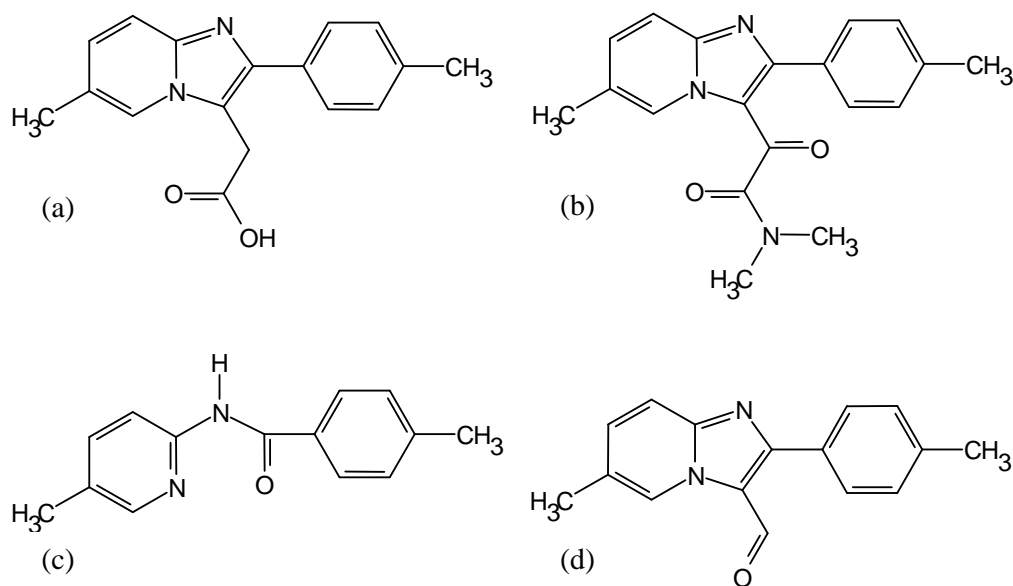
U sintetske nečistoće spadaju polazne sirovine i intermedijeri iz procesa sinteze, nečistoće koje nastaju kao produkti hidrolize i paralelnih reakcija tokom procesa sinteze i nečistoće koje nastaju usled prisustva izomerije kod polaznih sirovina [3,50,51], što dovodi do stvaranja izomernih nečistoća zolpidem-tartarata. Jedna od izomernih nečistoća je i N,N-dimetil-2-[7-metil-2-(4-metilfenil)imidazo[1,2-*a*]piridin-3-il]acetamid, odnosno izozolpidem ili nečistoća A, koja je definisana kao specificirana nečistoća zolpidem-tartarata u Evropskoj farmakopeji [8]. Strukturno se ova nečistoća razlikuje od zolpidem-tartarata samo po tome što ima metil grupu u položaju 7 heterocikla, a ne u položaju 6 (slika 5). Pošto je ona sintetska nečistoća ne ispituje se u gotovom proizvodu.



Slika 5. Strukturna formula nečistoće A

Degradacija zolpidem-tartarata se može dešavati na dva načina: hidrolizom tercijarne amidne grupe i fotooksidacijom. Hidrolizom tercijarne amidne grupe nastaje 2-[6-metil-2-(4-metilfenil)imidazo[1,2-a]piridin-3-il]sirćetna kiselina, odnosno zolpacid (slika 6a). Ova nečistoća je i sintetska nečistoća, jer predstavlja intermedijer iz procesa sinteze.

Neutralni rastvori zolpidem-tartarata stajanjem na svetlosti dobijaju žutu boju usled fotooksidacije [52], pri čemu nastaju oksozolpidem (N,N-dimetil-2-[6-metil-2-(4-metilfenil)imidazo[1,2-a]piridin-3-il]-2-oksoacetamid), zolpiridin (5-metil-2-(4-metilbenzamid)piridin) i zolpaldehid (6-metil-2-(4-metilfenil)imidazo[1,2-a]piridin-3-karboksaldehid). Hemijske strukture degradacionih proizvoda prikazane su na slici 6.



Slika 6. Hemijske strukture degradacionih proizvoda zolpidema: zolpacida (a), oksozolpidema (b), zolpiridina (c) i zolpaldehida (d).

1.4.3. Pregled literaturnih podataka

Zolpidem je često predmet zloupotreba, zbog svog sličnog delovanja sa benzodiazepinima. Izaziva visok nivo tolerancije i zavisnosti. S obzirom da se učestalo koristi u kriminalnim radnjama kao što su silovanja, pljačke ili kockarske prevare, često se ispituje prisustvo zolpidema u biološkom materijalu. Najzastupljenije su hromatografske metode sa različitim detektorima u kojima se uporedo vrši razdvajanje

zolpidema od drugih komponenti prisutnih u uzorku, kao i njegova identifikacija i kvantifikacija.

Razvijena je i validirana RP-HPLC metoda sa fluorescentnom detekcijom za određivanje sadržaja zolpidema u humanoj plazmi nakon čvrsto-tečne ekstrakcije. Razdvajanje je izvršeno na Shiseido CapcellPak UG C18 (150 × 4,6 mm, 5 μm) koloni, uz izokratsko eluiranje mobilnom fazom u sastavu acetonitril: 50 mM kalijum-fosfat (4:6, v/v), čiji je pH podešen na 6,0. Talasna dužina ekscitacije je bila 254 nm, a emisije 400 nm. Kvantifikacija je rađena metodom internog standarda, a interni standard je bio trazodon. Pri ovim uslovima retenciono vreme zolpidema je 4,7 minuta [53].

Slična RP-HPLC metoda sa fluorescentnom detekcijom (ekscitacija na 320 nm, a emisija na 388 nm) za određivanje sadržaja zolpidema u humanoj plazmi, ali nakon tečno-tečne ekstrakcije, je validirana uz interni standard kinin. Razdvajanje je izvršeno na YMC-Pack C18 koloni (5 μm, 150 × 4,6 mm) na temperaturi od 40 °C uz izokratsko eluiranje mobilnom fazom acetonitril:20 mM fosfatni pufer pH 3,0 (27:73, v/v) [54].

Još jedna RP-HPLC metoda sa fluorescentnom detekcijom (ekscitacija na 244 nm, a emisija na 388 nm) za određivanje zolpidema u humanoj plazmi je razvijena i validirana, gde se nakon taloženja proteina sa metanolom, izokratsko eluiranje na koloni Nucleosil C18 (3 μm, 150 × 4,6 mm) vrši mobilnom fazom sastava metanol:30 mM kalijum fosfat:triethylamin (30:69:1, v/v/v), čiji je pH vodene faze podešen na 6,8 orto-fosfornom kiselinom. Pri ovim uslovima zolpidem eluira na 4,7 min. pri protoku od 0,7 mL min⁻¹ [55].

Ispitivanje zolpidema nakon tečno-tečne ekstrakcije iz pljuvačke izvršeno je LC-MS/MS metodom na Novapak C18 koloni (5 μm, 150 mm × 2,1 mm). Kao interni standard je korišćen diazepam-d5, separacija je izvršena tokom ukupnog trajanja analize od 6 min pod izokratskim uslovima mobilnom fazom acetonitril : 2 mM amonijum formijat pH 3,6 (90:10 v/v). Detekcija je izvršena preko protonovanih molekulskih jona *m/z* 308 i 290 za zolpidem odnosno interni standard, kao i fragmenata *m/z* 235 i 263 za zolpidem i *m/z* 154 i 198 za interni standard [56].

Jednostavna i robusna LC-MS/MS metoda za određivanje zolpidema u humanoj plazmi je razvijena na koloni Beta basic C8 (5 μm, 4,6 × 50 mm). Nakon čvrsto-tečne ekstrakcije na Oasis HLB kertridžima, zolpidem je eluiran pomoću mobilne faze acetonitril-10 mM amonijum-acetat pH 4,6 (80:20, v/v) pri protoku 0,7 mL min⁻¹. Za

kvantifikaciju je korišćen interni standard escitalopram, a nakon elektrosprej jonizacije praćeni su joni m/z 308,1 i m/z 235,1 za zolpidem, a m/z 325,1 i m/z 262,1 za interni standard [57].

Zolpidem i zaleplon su analizirani u krvi u forenzičke svrhe LC–MS metodom nakon hemijske jonizacije pod atmosferskim pritiskom. Nakon tečno-tečne ekstrakcije u jednom koraku ispitivane supstance su razdvojene gradijentnim eluiranjem na koloni Inertsil ODS, pomoću mobilnih faza u čijem su sastavu amonijum-formijatni pufer i acetonitril. Kao interni standard je korišćen metakvalon, a kvantifikacija zolpidema je rađena u SIM tehnikom preko molekuskog jona m/z 308 [58].

Razvijena je LC–MS/MS metoda za određivanje zolpidema u urinu i kosi koristeći kolonu Xterra MS C18 i gradijentno eluiranje sa mobilnom fazom koja sadrži acetonitril i formijatni pufer. Detekcija je postignuta na trostrukom kvadrupolu uz elektrosprej jonizaciju, a detektovani su protonovani molekularni jon m/z 308,2 i fragmenti m/z 235,3 i 263,2 [59].

Karakterizacija smeše zolpidema, zopiklona i flunitrazepama i njihovih metabolita vršena je u pljuvački, nakon deproteinizacije, snimanjem MS^n . Korišćena su dva tipa masenih analizatora: jonski trap i ToF. Na MS spektru zolpidema može se videti jedan glavni jon, protonovani molekularni jon m/z 308. MS^2 spektar pokazuje dva glavna jona m/z 263,1 i 235,2, MS^3 spektar pokazuje jone m/z 248,2 i 235,3, a MS^4 spektar pokazuje jedan jon m/z 220,6. Razdvajanje i određivanje sadržaja navedenih lekova je izvršeno LC–MS metodom na C18 koloni (150 × 4,6 mm) uz gradijentno eluiranje mobilnom fazom u sastavu metanol/voda/mravlja kiselina u trajanju od 20 min [60].

LC–MS/MS metoda za istovremenu analizu smeše 33 benzodiazepina i hipnotika, kao i njihovih metabolita nakon tečno-tečne ekstrakcije iz krvi je razvijena i validirana. Kao interni standard je korišćen metil-bromazepam, maseni analizator je bio jonski trap, a jonski izvor APCI. Metoda je optimizovana na koloni Xterra MS C-18 (150mm × 2,1 mm, 3,5 μ m) uz gradijentno eluiranje mobilnom fazom koja se sastojala od metanola i 0.006 M mravlje kiseline pH 3, čiji je odnos varirao od 30–60% (v/v) metanola. Kod zolpidema su praćeni protonovani molekularni jon m/z 308 i fragmenti m/z 263 i 235 [61].

Skrining više od 70 lekova koji deluju na CNS u ljudskoj plazmi upotrebom LC–MS metode sa jonskim trapom izvršen je nakon taloženja proteina plazme acetonitrilom. Razdvajanje je izvršeno na Intersil ODS-3 (50 mm × 2,0 mm, 3 μm) uz gradijentno eluiranje mobilnom fazom A u sastavu 5% acetonitrila u 10 mM amonijum acetatu pH 5,0 i mobilnom fazom B u sastavu 90% acetonitrila u 10 mM amonijum acetatu pH 5,0. Retenciono vreme zolpidema je 10 min, a na masenom detektoru prate se njegov protonovani molekulski jon m/z 308 i fragment m/z 263 [62].

LC–MS/MS metoda za skrining 238 lekova u krvi posle tečno-tečne ekstrakcije je razvijena. Razdvajanje je izvršeno na koloni Genesis C₁₈ (100 mm × 2,1 mm, 4 μm) uz gradijentno eluiranje mobilnom fazom koja se sastojala od acetonitrila i amonijum acetatnog pufera (10 mM, 0,1% mravlja kiselina, pH 3,2). Ukupno trajanje analize je 18 min uz protok mobilne faze od 0,2 mL min⁻¹. Retenciono vreme zolpidema je 4,7 min, a na trostrukom kvadrupolu se prati njegov protonovani molekulski jon m/z 308 i fragment m/z 235 [63].

Skrining 16 benzodiazepina i hipnotika u ljudskoj kosi vršen je LC–MS/MS metodom posle tečno-tečne ekstrakcije. Mobilna faza se sastoji od acetonitrila i 0,1% mravlje kiseline. Gradijentnim eluiranjem na koloni XTerra MS C18 (3,5 μm, 100 mm × 2,1 mm) pri protoku 0,2 mL min⁻¹ komponente se razdvajaju, a retenciono vreme zolpidema je 8,4 min. Na masenom detektoru se prate njegov protonovani molekulski jon m/z 308 i dva fragmenta m/z 235 i 263 [64].

Validirana je analitička LC–MS/MS metoda za određivanje 27 benzodiazepina, njihovih metabolita i zolpidema iz ljudske dlake i dlake pacova. Razdvajanje je vršeno gradijentnim eluiranjem na koloni Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 mm × 150 mm, 5 μm) na temperaturi od 40 °C. Mobilna faza se sastojala od 2 mM amonijum formijata i 0,2% mravlje kiseline u vodi (A) i 2 mM amonijum formijata i 0,2% mravlje kiseline u acetonitrilu (B). Nakon elektrosprej jonizacije, detekcija je vršena u jonskom trapu, a za zolpidem su praćeni joni m/z 308, 235 i 236 [65].

Brza, kvantitativna metoda za skrining 43 benzodiazepina, njihovih metabolita, zolpidema i zopiklona u humanoj plazmi upotrebom UPLC–MS sistema je razvijena i validirana uz gradijentno eluiranje na koloni Acquity UPLC BEH C18 (100 mm × 2,1 mm, 1,7 μm). Prečišćavanje uzorka je vršeno čvrsto-tečnom ekstrakcijom. Mobilna faza A se sastojala od 0,05% mravlje kiseline u vodi, a mobilna

faza B od 0,05% mravlje kiseline u acetonitrilu. Retenciono vreme za zolpidem je bilo 1,56 min, a praćen je njegov protonovani molekulski jon m/z 308. U opsegu od 0,5–250 ng mL⁻¹ prosečan prinos zolpidema je 90,8% [66].

Zolpidem i njegova dva metabolita su određivani, tokom farmakokinetičke studije, u serumu pacova izokratskom RP-HPLC metodom na OD-5-100 C18 koloni (100 mm × 2,1 mm, 5 μm). Nakon tečno-tečne ekstrakcije supstance su eluirane mobilnom fazom u sastavu metanol:acetonitril:(26 mM natrijum-acetat pH 2,0 kome je dodat 0,26 mM tetrabutilamonijum fosfat) (13:10:77, v/v/v) [67].

Za skrining velikog broja lekova u ljudskoj kosi u forenzičke svrhe su primenjene dve metode RP-HPLC metoda na PDA detektoru i GC-MS metoda. Prah ljudske kose je inkubiran 12 sati na 56 °C u destilovanoj vodi (za kisele supstance) ili 0,1 M hlorovodoničnoj kiseline (za neutralne i bazne supstance). Nakon čvrsto-tečne ekstrakcije na C₁₈ kertridžima supstance su analizirane. RP-HPLC metoda je podrazumevala gradijentno eluiranje tokom 28 min na Symmetri C₈ koloni (250 × 4,6 mm, 5 μm) na temperaturi 30 °C, mobilnom fazom koja se sastojala od acetonitrila i fosfatnog pufera pH 3,8. GC-MS metoda je koristila CP SIL 8 CB kolonu (25 m × 0,25 mm, 0,25 μm debljina filma) uz protok od 1,3 mL min⁻¹ helijuma kao gasa nosača. Temperatura detektora je bila 300 °C, a ukupno trajanje analize 24 min. Zolpidem je u ovom primeru ispitan GC-MS metodom [68].

GC-MS metoda sa elektronskom jonizacijom za određivanje 14 benzodiazepina, njihovih metabolita, kao i zoleplona i zolpidema iz krvi nakon njihove derivatizacije je razvijena i validirana na kapilarnoj koloni DB-35 ms (30 m × 0,32 mm, 0,25 μm debljina filma). Inicijalna temperatura kolone je bila 120 °C tokom 1 min, a posle je rasla 15 °C min⁻¹ do 330 °C. Helium je korišćen kao gas nosač pri protoku od 1,5 mL min⁻¹. Retenciono vreme zolpidema je bilo 15,12 min, a praćen je njegov molekulski jon m/z 307 i fragmenti m/z 235 i 236 [69].

Za određivanje zolpidema u biološkim tečnostima razvijena je GC-MS metoda na kapilarnoj koloni HP-5 MS (30 m × 0,25 mm, 0,25 mm debljina filma), sa helijumom kao gasom nosačen pri protoku od 1 mL min⁻¹. Kao interni standard je korišćen klozapin, a na detektoru su za zolpidem praćeni joni m/z 307, 219 i 235 [70].

Validirana je metoda za semikvantitativnu i kvantitativnu analizu 51 leka, među kojima je i zolpidem, u krvi nakon tečno-tečne ekstrakcije uz pomoć GC-MS metode.

Korišćena je kapilarna kolona DB-35 ms (30 m × 0,32 mm, 0,25 μm debljina filma) i elektronska jonizacija. Supstance su kvantifikovane SIM tehnikom, a za zolpidem su praćeni joni m/z 307, 235 i 236 [71].

Zolpidem i zopiklon u humanoј plazmi su određivani gasnom hromatografijom posle tečno-tečne ekstrakcije. Razdvajanje je izvršeno na kapilarnoj koloni OV-1 (25 m × 0,32 mm, 0,2 μm debljina filma). Temperatura injektora i detektora je bila 270 °C, a kolone 235 °C. Gas nosač je bio helijum. Retenciono vreme zolpidema je bilo 10,02 min [72].

Određivanje zolpidema iz krvi i želudačnog sadržaja je vršen GC metodom uz meperidin kao interni standard. Korišćena je staklena kolona punjena sa 3% OV-17 na Chromasorb WHP nosaču [73].

Za ispitivanje zolpidema i njegova četiri metabolita u urinu razvijena je i validirana metoda kapilarne elektroforeze sa laser-indukujućim fluoresentnim detektorom. Razdvajanje je izvršeno na kapilari promera 50 μm i dužine 67 cm uz pomoć 50 mM fosfatnog pufera pH 5,6 [74].

Brza metoda za istovremeno određivanje 49 lekova i šest metabolita, uključujući i zolpidem, u otpadnoj vodi primenom ultra-efikasne tečne hromatografije kombinovane sa tandem masenom spektroskopijom (UPLC–MS/MS) je razvijena i validirana. Ovom metodom se svih 55 supstanci razdvaja za manje od 9 minuta (6,3 min prate pozitivne i 2,7 min negativne jone) na koloni Acquity BEH C18 (100 mm × 2,1 mm, 1,7 μm), uz gradijentno eluiranje. Zolpidem je detektovan i identifikovan preko molekulskog jona m/z 308 i fragmenata m/z 235 i 236 [75].

Osim u biološkim tečnostima, u literaturi se mogu pronaći podaci i o određivanju sadržaja zolpidem-tartarata i nečistoća u farmaceutskim proizvodima. Za određivanje sadržaja zolpidem-tartarata u tabletama, u prisustvu degradacionih proizvoda koji nastaju hidrolizom tercijarne amidne grupe (zolpacid i dimetilamin) primenjene su dve metode: HPTLC i HPLC sa UV-detekcijom. HPTLC metoda koristi mobilnu fazu metanol:voda (20:80 v/v) i nakon eluiranja ploča se skenira na denzitometru na 315 nm. Rf vrednost za zolpidem-tartarat je 0,3, a za zolpacid 0,6. HPLC metoda je validirana na Bondapack C18 koloni (4,6 × 250 mm, 10 μm), uz protok mobilne faze od 1,2 mL min⁻¹. Mobilna faza je bila smeša acetonitril:0.01 M KH₂PO₄ (40:60 v/v), čiji je pH podešen na 3,5. Detekcija je vršena na

245 nm, a kvantifikacija je rađena metodom internog standarda (cisaprid). Pri ovim uslovima retenciono vreme za zolpidem-tartarat je 6,7 min., a za zolpacid 4,1 min. Rezultati su pokazali da obe metode imaju dobru preciznost i tačnost i da prisustvo nečistoća ne interferira prilikom određivanja zolpidem-tartarata [76].

Za inprocesnu kontrolu sinteze zolpidema razvijena je RP-HPLC metoda za razdvajanje i određivanje zolpidema i njegovih osam sintetskih intermedijera, među kojima je i zolpacid. Razdvajanje je izvršeno na Kromasil C18 (150 × 4,6 mm, 5 μm) koloni uz gradientno eluiranje sa mobilnom fazom acetonitril:0.02 M amonijum-acetat (pH 8,0) pri protoku od 1 mL min⁻¹. Talasna dužina detekcije je bila 241 nm [77].

Zolpidem u tabletama se može određivati i elektrohemijski, diferencijalnom pulsnom voltametrijom na elektrodi od staklastog ugljenika. Oksidativno ponašanje zolpidema na elektrodi u puferu pH 8 omogućava njegovo tačno određivanje, bez interferencija sa komponentama ekscipijensa u koncentracijama $5,0 \times 10^{-7}$ M do $1,0 \times 10^{-5}$ M [78].

Određivanje zolpidem-tartarata u tabletama i biološkim tečnostima vršeno je potenciometrijski pomoću polimernih membranskih elektroda. Tokom validacije je dokazano da se zolpidem-tartarat može tačno odrediti u prisustvu komponenti ekscipijensa, ali i njegovih degradacionih proizvoda, pa se metoda može smatrati *stability-indicating* metodom [79].

Jednostavna spektrofotometrijska metoda za određivanje zolpidem-tartarata u tabletama je razvijena i validirana. Ispitivanje tačnosti je rađeno metodom standardnog dodatka. *Recovery* vrednosti koje su blizu 100% ukazuju na dobru tačnost metode [80].

Pregledom literature je ustanovljeno da, osim u USP 35 [12], nema drugih podataka o metodi za istovremeno određivanje sadržaja zolpidem-tartarata i degradacionih proizvoda zolpacida, oksozolpidema, zolpaldehida i zolpiridina u tabletama. Metoda iz USP 35 kao mobilnu fazu koristi fosfatni pufer, koji nije podesan prilikom rada sa masenim detektorom, jer je neisparljiv i taloži se u jonskom izvoru. Primena masenog detektora je veoma važna prilikom izvođenja studije forsirane degradacije na zolpidem-tartaratu, radi praćenja nastajanja degradacionih proizvoda, puteva degradacije i razvoja *stability-indicating* metode, o čemu nema podataka u literaturi.

2. CILJ RADA

Ciljevi ovog istraživanja su bili:

1. Razvoj i optimizacija RP-HPLC metode sa UV i masenom detekcijom za određivanje zolpidem-tartarata i ključnih degradacionih proizvoda: zolpacida, oksozolpidema, zolpiridina i zolpaldehida uz primenu *screening* i optimizacionih vrsta eksperimentalnog dizajna i metodologije multikriterijumskog odlučivanja.

2. Validacija predložene RP-HPLC metode i potvrda njene primenljivosti za određivanje sadržaja zolpidem-tartarata i degradacionih proizvoda u farmaceutskom doziranom obliku film-tabletama zolpidem-tartarata.

3. Ispitivanje stabilnosti zolpidem-tartarata pri različitim ekstremnim uslovima (pH, temperatura, svetlost, oksidacija) i ispitivanje mogućnosti nastajanja novih degradacionih proizvoda, sprovođenjem studije forsirane degradacije prema preporukama ICH regulative.

4. Identifikacija novonastalih degradacionih proizvoda zolpidem-tartarata primenom RP-HPLC metode sa UV i masenom detekcijom i definisanje puteva degradacije zolpidem-tartarata.

5. Razvoj i optimizacija metode za ispitivanje stabilnosti zolpidem-tartarata (eng. *stability-indicating method*), odnosno za razdvajanje i određivanje zolpidem-tartarata i njegovih ključnih potencijalnih degradacionih proizvoda.

6. Validacija predložene *stability-indicating* metode u cilju potvrde njene primenljivosti u rutinskoj analizi.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. APARATI I PRIBOR

Za sprovođenje istraživanja su korišćeni sledeći aparati i pribor:

3.1.1. Hromatografski sistem sa kvadrupolnim masenim detektorom

Tečni hromatograf: Agilent 1100 Series LC–MSD sistem (*Agilent Technologies Deutschland GmbH*, Nemačka) kojeg sačinjavaju:

- Binarna pumpa: Agilent 1100 Series
- Degaser: Agilent 1100 Series
- Termostatirani autosampler: Agilent 1100 Series
- Termostat za kolonu: Agilent 1100 Series
- UV detektor-PDA: Agilent 1100 Series
- MS detektor: Agilent kvadrupolni maseni analizator (G1946D)
- Integracija: Agilent ChemStation Software Rev.A.10.01.
- Kolona: Luna C18(2) 100A, 250 x 4,6 mm, 5 µm (*Phenomenex Inc.*, SAD)

Po potrebi kvadrupolni maseni analizator može da se ukloni iz konfiguracije aparata i da se ispitivanje vrši samo uz upotrebu UV detektora.

3.1.2. Hromatografski sistem sa jonskim trapom

Tečni hromatograf: Surveyor HPLC system (*Thermo Fisher Scientific*, SAD) kojeg sačinjavaju:

- Kvatenerna pumpa: Thermo
- Autosampler: Thermo
- Termostat za kolonu: Thermo
- UV detektor-PDA: Thermo
- MS detektor: Thermo LCQ Advantage jonski trap
- Integracija: Thermo Xcalibur® software package, version 1.3
- Kolona: Luna C18(2) 100A, 250 x 4,6 mm, 5 µm (*Phenomenex Inc.*, SAD)

3.1.3. Statistički programi

- Design-Expert 7.0.0, *StatEase*, SAD
- Statistica 8.0 Software 2008 edition, *StatSoft*, SAD
- Excel 2003 u okviru paketa Microsoft Office 2003, *Microsoft*, SAD

3.1.4. Ostala oprema i pribor

- Elektronska analitička vaga: Mettler, tip XP-205 TDR KL (I) (*Mettler-Toledo AG, Švajcarska*)
- pH-metar sa kombinovanom staklenom elektrodom: Metrohm tip 780 (*Metrohm, Švajcarska*)
- Sistem za prečišćavanje vode: EasyPure RF (*Barnstead, SAD*)
- Ultrazvučno kupatilo: tip USK (*EI Niš, Srbija*)
- Inkubator StabiliTherm EB1-53 (*Thermo Electron Industries S.A.S, Francuska*)
- Komora za ispitivanje fotostabilnosti Sanyo PSC022.AHA.C (*Sanyo Gallenkamp PLC, Velika Britanija*)
- Sistem za filtriranje mobilne faze: Millipore Nylon Membrane, 0,45 µm (*Millipore, Irska*)
- Sistem za filtriranje uzoraka: Millitex Suringe Driven Filter Unit, Nylon Membrane, 0,45 µm (*Millipore, SAD*)

3.1.5. Rastvarači i reagensi

Za pripremu mobilne faze u svim fazama istraživanja korišćeni su sledeći rastvarači i reagensi:

- Metanol - gradient grade (*Merck, Nemačka*)
- Voda - HPLC grade, dobijena dodatnim prečišćavanjem demineralizovane vode u aparatu EasyPure RF
- Amonijum-acetat (p.a.) (*Merck, Nemačka*)
- Koncentrovani amonijum hidroksid (p.a.) (*Merck, Nemačka*)
- Glacijalna sirćetna kiselina (p.a.) (*Merck, Nemačka*)

Za sprovođenje studije forsirane degradacije su korišćeni sledeći rastvarači i reagensi:

- Acetonitril - gradient grade (*Merck, Nemačka*)
- 0,1 M i 1 M hlorovodonična kiselina (p.a.) (*Merck, Nemačka*)
- 0,1 M i 1 M natrijum hidroksid (p.a.) (*Merck, Nemačka*)
- Vodonik peroksid 30% (p.a.) (*Merck, Nemačka*)

3.1.6. Standardne supstance

U eksperimentalnom delu rada za pripremu standardnih rastvora koji su služili za poređenje sa rastvorom uzorka korišćene su sledeće standardne supstance:

- Zolpidem-tartarat, radni standard (*Pliva*, Hrvatska)
- Zolpacid, radni standard (*Sanofi Winthrop Industrie*, Francuska)
- Oksozolpidem, radni standard (*Sanofi Winthrop Industrie*, Francuska)
- Zolpaldehid, radni standard (*Sanofi Winthrop Industrie*, Francuska)
- Zolpiridin, radni standard (*Sanofi Winthrop Industrie*, Francuska)

3.1.7. Farmaceutski dozirani oblik

Određivanje sadržaja zolpidem-tartarata i njegovih degradacionih proizvoda, kao i studija forsirane degradacije izvršena je na sledećem komercijalnom proizvodu:

- *Stilnox*® film-tablete, proizvođača *Sanofi Winthrop Industrie*, Francuska; deklarirana količina zolpidem-tartarata je 10 mg po film-tableti; pakovanje: 20 film-tableta

U specifikaciji proizvođača (u toku roka upotrebe proizvoda/shelf-life) navedeni su sledeći zahtevi:

- zolpidem-tartarat: 9,5 – 10,5 mg/tableta
- zolpacid: najviše 0,2%
- nespecificirane nečistoće, pojedinačno: najviše 0,2%
- nečistoće, ukupno: najviše 0,5%

3.1.8. Komponente placeba

Prema registracionoj dokumentaciji u sastav *Stilnox*® film-tableta ulaze sledeći ekscipijensi (u zagradi su navedeni proizvođači ekscipijenasa, koji su korišćeni u ovom istraživanju):

- Laktoza monohidrat (*Zorka*, Srbija)
- Mikrokrystalna celuloza (*Merck*, Nemačka)
- Hipromeloza (*Merck*, Nemačka)
- Magnezijum-stearat (*Merck*, Nemačka)
- Titan-dioksid (*Merck*, Nemačka)
- Natrijum skrob glikolat (*Merck*, Nemačka)

- Makrogol 400 (*Merck*, Nemačka)

3.2. PRIPREMA RASTVORA ZA OPTIMIZACIJU RP-HPLC METODE

3.2.1. Priprema mobilnih faza

Mobilne faze korišćene pri optimizaciji metode pripremane su prema planu eksperimenata u frakcionom faktorskom i centralnom kompozicionom dizajnu. 0,01 mM, 2,55 mM, 6,28 mM, 10 mM i 12,54 mM vodeni rastvori amonijum-acetata su pripremljeni rastvaranjem 0,77 mg, 196,35 mg, 483,56 mg, 770,0 mg i 965,58 mg amonijum-acetata u 1 litru vode. Metanol i vodeni rastvori amonijum-acetata su mešani prema planu eksperimenata u sledećim zapreminskim odnosima: 53,18 : 46,82; 60 : 40; 70 : 30; 80 : 20 i 86,82 : 13,18. Uz pomoć glacijalne sirćetne kiseline i koncentrovanog amonijum hidroksida pH mobilnih faza je podešen na 2,64; 4,0; 6,0; 8,0 i 9,36. Pripremljene mobilne faze su pre upotrebe profiltrirane kroz membranski filter (0,45 μm).

3.2.2. Priprema standardnih rastvora za optimizaciju metode

Osnovni standardni rastvor svakog od ispitivanih degradacionih proizvoda pripremljen je pojedinačno, tačnim odmeravanjem i prenošenjem 10 mg standardnih supstanci zolpacida, oksozolpidema, zolpaldehida i zolpiridina u odmerne sudove od 25 mL. U sud je zatim dodato 15 mL mobilne faze, rastvor je tretiran na ultrasoničnom kupatilu tokom 5 minuta i dopunjen do oznake mobilnom fazom. Tako dobijeni rastvori su imali koncentraciju od 0,4 mg mL⁻¹ i obeleženi su kao osnovni rastvor-1. Od svakog osnovnog rastvora-1 je otpipetirano po 2,5 mL i preneto u jedan odmerni sud od 25 mL, koji je zatim dopunjen do oznake mobilnom fazom. Ovako pripremljen rastvor je imao koncentraciju od 0,04 mg mL⁻¹ za svaku nečistoću i obeležen je kao osnovni rastvor-2.

Osnovni rastvor zolpidem-tartarata je pripremljen tačnim odmeravanjem i prenošenjem 50 mg standardne supstance zolpidem-tartarata u odmerni sud od 25 mL. U sud je zatim dodato 15 mL mobilne faze, rastvor je tretiran na ultrasoničnom kupatilu tokom 5 minuta i dopunjen do oznake mobilnom fazom. Tako dobijeni rastvor je imao koncentraciju od 2,0 mg mL⁻¹.

Radni standardni rastvor za optimizaciju metode pripremljen je piperiranjem 1,0 mL osnovnog rastvora-2 nečistoća i 2,0 mL osnovnog rastvora zolpidem-tartarata u odmerni sud od 10 mL i sud je dopunjen do oznake mobilnom fazom. Tako dobijeni standardni rastvor je imao koncentraciju $4,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ za nečistoće i $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ za zolpidem-tartarat.

Rastvor uzorka je pripremljen odmeravanjem na analitičkoj vagi 10 tableta i izračunavanjem prosečne mase tablete (deklarisana prosečna masa je oko 126 mg). Tablete su sprašene u tarioniku i 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 25 mL. U sud je dodato oko 15 mL mobilne faze, sud je tretiran na ultrasoničnom kupatilu tokom 15 minuta i nakon toga dopunjen do oznake mobilnom fazom i filtriran kroz membranski filter ($0,45 \mu\text{m}$). Očekivana koncentracija zolpidem-tartarata je $400 \mu\text{g mL}^{-1}$.

3.3. PRIPREMA RASTVORA ZA VALIDACIJU RP-HPLC METODE

3.3.1. Priprema mobilne faze

10 mM vodeni rastvor amonijum-acetata je pripremljen rastvaranjem 770,0 mg amonijum-acetata u 1 litru vode. Metanol i 10 mM vodeni rastvor amonijum-acetata su pomešani u zapreminskom odnosu 68,4 : 31,6. Uz pomoć glacijalne sirćetne kiseline pH mobilne faze je podešen na 5,4. Pripremljena mobilna faza je pre upotrebe profiltrirana kroz membranski filter ($0,45 \mu\text{m}$).

3.3.2. Priprema standardnih rastvora za validaciju metode

Osnovni standardni rastvori za validaciju metode pripremani su na isti način kao osnovni standardni rastvori za optimizaciju metode (v. poglavlje 3.2.2.). Svi osnovni rastvori su razblaživani mobilnom fazom neposredno pre upotrebe do koncentracionih nivoa zahtevanih u postupku validacije metode. Tokom postupka validacije osnovni standardni rastvori su čuvani u frižideru na temperaturi $2 - 8 \text{ }^{\circ}\text{C}$, u odmernim sudovima od zatamljenog stakla radi zaštite od svetlosti.

Svi radni standardni rastvori su pripremani neposredno pre upotrebe, u odmernim sudovima od zatamljenog stakla, jer je aktivna supstanca zolpidem-tartarat podložna degradaciji pod uticajem svetlosti.

3.3.2.1. Priprema rastvora za ispitivanje linearnosti metode

Radni rastvori za ispitivanje linearnosti su pripremljeni pipetiranjem po 0,10; 0,25; 0,50; 1,0; 2,5; i 5,0 mL osnovnog rastvora-2 nečistoća i po 1,4; 1,6; 1,8; 2,0; 2,2 i 2,4 mL osnovnog rastvora zolpidem-tartarata u šest odmernih sudova od 10 mL i dopunjavanjem do oznake mobilnom fazom. Poslednji, sedmi rastvor za ispitivanje linearnosti je dobijen pipetiranjem po 1,0 mL osnovnih rastvora-1 svake nečistoće i 2,6 mL osnovnog rastvora zolpidem-tartarata u odmerni sud od 10 mL i dopunjavanjem do oznake mobilnom fazom. Tako dobijeni rastvori za ispitivanje linearnosti su imali koncentracije 0,40; 1,0; 2,0; 4,0; 10,0; 20,0 i 40,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za nečistoće i 280; 320; 360; 400; 440; 480 i 520 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za zolpidem-tartarat.

3.3.2.2. Priprema rastvora za ispitivanje selektivnosti metode

Za procenu selektivnosti predložene RP-HPLC metode, pripremljena je smeša koja je sadržavala komponente placeba (ekscipijense) u odnosu koji odgovara njihovom sadržaju u tabletama. Smeša je tretirana na isti način kao i tabletna masa za izradu rastvora uzorka (*v. poglavlje 3.2.2.*).

Rastvor placeba je pripremljen tačnim odmeravanjem 116 mg placeba u odmerni sud od 25 mL. U odmerni sud je dodato oko 15 mL mobilne faze, rastvor je tretiran na ultrasoničnom kupatilu tokom 15 minuta i nakon toga dopunjen do oznake mobilnom fazom i filtriran kroz membranski filter (0,45 μm).

Radni rastvor standarda za ispitivanje selektivnosti je pripremljen piperiranjem 1,0 mL osnovnog rastvora-2 nečistoća i 2,0 mL osnovnog rastvora zolpidem-tartarata u odmerni sud od 10 mL i sud je dopunjen do oznake mobilnom fazom. Tako dobijeni rastvor za ispitivanje selektivnosti je imao koncentracije 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za nečistoće i 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za zolpidem-tartarat.

3.3.2.3. *Priprema rastvora za ispitivanje preciznosti i tačnosti metode*

Radni rastvori za ispitivanje preciznosti i tačnosti su pripremljeni pipetiranjem po 0,10 i 1,0 mL osnovnog rastvora-2 nečistoća i po 1,4 i 2,0 mL osnovnog rastvora zolpidem-tartarata u dva odmerni suda od 10 mL. Poslednji, treći rastvor za ispitivanje preciznosti i tačnosti je dobijen pipetiranjem po 1,0 mL osnovnih rastvora-1 svake nečistoće i 2,6 mL osnovnog rastvora zolpidem-tartarata u odmerni sud od 10 mL. U svaki odmerni sud je dodato po 46 mg placeba (što odgovara odnosu komponenti u tabletama), sud je tretiran na ultrasoničnom kupatilu tokom 15 minuta i nakon toga dopunjen do oznake mobilnom fazom i filtriran kroz membranski filter (0,45 μm). Tako dobijeni rastvori za ispitivanje preciznosti i tačnosti su imali koncentracije 0,40; 4,0 i 40,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za nečistoće i 280; 400 i 520 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za zolpidem-tartarat. Napravljena su po tri rastvora svake koncentracije.

3.3.2.4. *Radni rastvori za ispitivanje limita detekcije i limita kvantifikacije*

Radni rastvori za ispitivanje limita detekcije i limita kvantifikacije za nečistoće su pripremljeni pipetiranjem po 0,25 mL osnovnog rastvora-2 nečistoća i 0,50 mL osnovnog rastvora zolpidem-tartarata u odmerni sud od 25 mL i dopunjavanjem do oznake mobilnom fazom. Od ovog rastvora je pipetirano po 0,50; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; i 8,0 mL u šest odmernih sudova od 10 mL i sudovi su dopunjeni mobilnom fazom do oznake. Tako dobijeni rastvori za ispitivanje limita detekcije i limita kvantifikacije za nečistoće su imali koncentracije 0,02; 0,04; 0,08; 0,16; 0,24 i 0,32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za nečistoće i 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 24,0 i 32,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za zolpidem-tartarat.

Radni rastvori za ispitivanje limita detekcije i limita kvantifikacije za zolpidem-tartarat su pripremljeni pipetiranjem po 0,10 mL svakog radnog rastvora za ispitivanje limita detekcije i limita kvantifikacije za nečistoće u šest odmernih sudova od 10 mL i sudovi su dopunjeni mobilnom fazom do oznake. Tako dobijeni rastvori za ispitivanje limita detekcije i limita kvantifikacije za zolpidem-tartarat su imali koncentracije 0,02; 0,04; 0,08; 0,16; 0,24 i 0,32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za zolpidem-tartarat.

3.3.3. Priprema mobilnih faza za ispitivanje robusnosti

Mobilna faza sa 58% metanola je pripremljena mešanjem metanola i 10 mM vodenog rastvora amonijum-acetata u zapreminskom odnosu 58 : 42. Uz pomoć glacijalne sirćetne kiseline pH mobilne faze je podešen na 5,4.

Mobilna faza sa 78% metanola je pripremljena mešanjem metanola i 10 mM vodenog rastvora amonijum-acetata u zapreminskom odnosu 78 : 22. Uz pomoć glacijalne sirćetne kiseline pH mobilne faze je podešen na 5,4.

Mobilna faza sa pH vrednošću od 5,2 je pripremljena mešanjem metanola i 10 mM vodenog rastvora amonijum-acetata u zapreminskom odnosu 68,4 : 31,6. Uz pomoć glacijalne sirćetne kiseline pH mobilne faze je podešen na 5,2.

Mobilna faza sa pH vrednošću od 5,6 je pripremljena mešanjem metanola i 10 mM vodenog rastvora amonijum-acetata u zapreminskom odnosu 68,4 : 31,6. Uz pomoć glacijalne sirćetne kiseline pH mobilne faze je podešen na 5,6.

9 mM vodeni rastvor amonijum-acetata je pripremljen rastvaranjem 690 mg amonijum-acetata u 1 litru vode. Da bi se dobila mobilna faza koja sadrži 9 mM amonijum-acetat, prethodno opisani rastvor je izmešan sa metanolom u zapreminskom odnosu 31,6 : 68,4 i pH mobilne faze je podešen na 5,4 uz pomoć glacijalne sirćetne kiseline.

11 mM vodeni rastvor amonijum-acetata je pripremljen rastvaranjem 850 mg amonijum-acetata u 1 litru vode. Da bi se dobila mobilna faza koja sadrži 11 mM amonijum-acetat, prethodno opisani rastvor je izmešan sa metanolom u zapreminskom odnosu 31,6 : 68,4 i pH mobilne faze je podešen na 5,4 uz pomoć glacijalne sirćetne kiseline.

Sve mobilne faze su pre upotrebe profiltrirane kroz membranski filter (0,45 μm).

3.3.4. Priprema rastvora uzorka

Rastvor uzorka je pripremljen na način opisan u poglavlju 3.2.2. Očekivana koncentracija zolpidem-tartarata je bila 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Za ispitivanja na masenom detektoru rastvor je razblažen 10 puta mobilnom fazom.

3.4. PRIPREMA RASTVORA ZA STUDIJU FORSIRANE DEGRADACIJE

3.4.1. Priprema rastvora stres agenasa

Kao stres agensi za studiju forsirane degradacije su korišćeni komercijalno dostupni, pripremljeni rastvori 0,1 M i 1 M hlorovodonične kiseline i natrijum hidroksida. Rastvori vodonik peroksida su dobijeni razblaživanjem 30% rastvora vodonik peroksida demineralizovanom vodom u odgovarajućem odnosu da bi se dobili 0,3%, 3% i 10% rastvor vodonik peroksida.

3.4.2. Priprema standardnih rastvora za studiju forsirane degradacije

Za određivanje procenta degradacije i identifikaciju degradacionih proizvoda pripreman je standardni rastvor za poređenje koji je sadržavao $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ zolpidem-tartarata i po $4,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ zolpacida, oksozolpidema, zolpiridina i zolpaldehida. Rastvor je pre svakog ispitivanja sveže pripreman na način opisan u poglavlju 3.2.2. *Priprema standardnih rastvora za optimizaciju metode*. Ovaj rastvor je korišćen za ispitivanja na PDA detektoru, dok je za masenu detekciju rastvor razblažen 10 puta mobilnom fazom (koncentracija zolpidem-tartarata je bila $40 \mu\text{g mL}^{-1}$, a nečistoća $0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$).

3.4.3. Priprema uzoraka za studiju forsirane degradacije

Osnovni rastvor zolpidem-tartarata koji je korišćen za studiju forsirane degradacije je pripremljen tačnim odmeravanjem i prenošenjem 50 mg standardne supstance zolpidem-tartarata u odmerni sud od 25 mL. U sud je zatim dodato 15 mL rastvarača (smeša metanola i vode u zapreminskom odnosu 70 : 30), rastvor je tretiran na ultrasoničnom kupatilu tokom 5 minuta i dopunjen rastvaračem do oznake. Tako dobijeni rastvor je imao koncentraciju od $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$.

Pošto se tokom istraživanja pokazalo da metanol interferira sa degradacionim proizvodima nastalim hidrolizom u kiseloj sredini, osnovni rastvor zolpidem-tartarata za studiju forsirane degradacije u kiseloj sredini je pripreman na isti način kao što je prethodno opisano, osim što se kao rastvarač koristila smeša acetonitrila i vode u zapreminskom odnosu 70 : 30.

Svi uzorci su nakon izlaganja stres agensu razblaženi mobilnom fazom kako bi finalna koncentracija zolpidem-tartarata, računato u odnosu na nepromenjenu supstancu bila $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ za ispitivanja na PDA detektoru, odnosno $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ za ispitivanja na masenom detektoru.

3.4.3.1. Priprema uzoraka za ispitivanje hidrolize u neutralnoj sredini i termalne degradacije

2,0 mL osnovnog rastvora zolpidem-tartarata je preneto u odmerni sud od 5 mL i pomešano sa 2 mL demineralizovane vode. Rastvor je zaštićen od svetlosti i čuvan na sobnoj temperaturi. Nakon propisanog vremenskog perioda 0.4 mL rastvora je pomešano sa 0.6 mL mobilne faze i injektovano u HPLC sistem. Procedura je ponovljena sa rastvorom koji je čuvan u inkubatoru, na povišenoj temperaturi od 70°C .

Termalna degradacija je praćena i na farmaceutskoj aktivnoj supstanci u čvrstom stanju i na farmaceutskom doziranom obliku film-tabletama. Prašak zolpidem-tartarata je u tankom sloju od 1 mm raspoređen u Pertijevoj šolji i izlagan povišenoj temperaturi od 70°C propisano vreme. Nakon toga je prašak rastvoren u mobilnoj fazi u koncentraciji od $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ i injiciran u HPLC sistem.

Na sličan način su i film-tablete izlagane povišenoj temperaturi od 70°C , nakon čega su pravljeni radni rastvori stresiranog uzorka na način opisan u poglavlju 3.3.4. *Priprema rastvora uzorka.*

3.4.3.2. Priprema uzoraka za ispitivanje hidrolize u kiseljoj sredini

2,0 mL osnovnog rastvora zolpidem-tartarata je preneto u odmerni sud od 5 mL i pomešano sa 2 mL $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ odnosno $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ HCl. Rastvor je zaštićen od svetlosti i čuvan na sobnoj temperaturi. Nakon propisanog vremenskog perioda 0.4 mL rastvora je neutralisano sa 0.2 mL $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ odnosno $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH, razblaženo sa 0.4 mL mobilne faze i injektovano u HPLC sistem. Procedura je ponovljena sa rastvorom koji je čuvan u inkubatoru, na povišenoj temperaturi od 70°C .

3.4.3.3. Priprema uzoraka za ispitivanje hidrolize u baznoj sredini

Uzorci za ispitivanje hidrolize u baznoj sredini su pripremani na isti način kao uzorci za ispitivanje hidrolize u kiseljoj sredini, osim što je kao stres agens korišćen

0,1 mol L⁻¹ odnosno 1,0 mol L⁻¹ NaOH, a neutralizacija je rađena sa 0,1 mol L⁻¹ odnosno 1,0 mol L⁻¹ HCl.

3.4.3.4. Priprema uzoraka za ispitivanje oksidacije

2,0 mL osnovnog rastvora zolpidem-tartarata je preneto u odmerni sud od 5 mL i pomešano sa 2 mL 0,3%, 3% odnosno 10% H₂O₂. Rastvor je zaštićen od svetlosti i čuvan na sobnoj temperaturi. Nakon propisanog vremenskog perioda 0.4 mL rastvora je pomešano sa 0.6 mL mobilne faze i injektovano u HPLC sistem. Procedura je ponovljena sa rastvorom koji je čuvan u inkubatoru, na povišenoj temperaturi od 40 °C.

3.4.3.5. Priprema uzoraka za ispitivanje fotodegradacije

2,0 mL osnovnog rastvora zolpidem-tartarata je preneto u plastični odmerni sud od 5 mL i pomešano sa 2 mL demineralizovane vode. Rastvor je zatim stavljen u komoru za ispitivanje fotostabilnosti i izložen ukupnoj količini zračenja od 1.2 miliona luks časova i integrisanoj energiji bliske UV oblasti od 200 watt sati po kvadratnom metru kako propisuje ICH smernica [43]. Nakon toga 0.4 mL rastvora je pomešano sa 0.6 mL mobilne faze i injektovano u HPLC sistem.

Fotodegradacija je praćena i na farmaceutskoj aktivnoj supstanci u čvrstom stanju i film-tabletama. Prašak zolpidem-tartarata je u tankom sloju od 1 mm raspoređen u Pertijevoj šolji i izlagan zračenju prema ICH smernici. Nakon toga je prašak rastvoren u mobilnoj fazi u koncentraciji od 400 µg mL⁻¹ i injiciran u HPLC sistem.

Na sličan način su i film-tablete izlagane zračenju prema ICH smernici, nakon čega su pravljene radni rastvori stresiranog uzorka na način opisan u delu 3.3.4. *Priprema rastvora uzorka.*

3.4.3.6. Priprema kontrolnih uzoraka za studiju forsirane degradacije

Tokom studije forsirane degradacije uporedo sa stresiranim uzorcima analizirano je i nekoliko vrsta kontrolnih uzoraka: kontrolni uzorci u vremenu nula, tamna kontrola, slepa proba i stresirani uzorak placeba.

Kontrolni uzorci u vremenu nula su pripremani na isti način kao i stresirani uzorci, ali su injicirani sveži, odmah nakon pripremanja.

Tamna kontrola je služila za poređenje sa uzorcima koji su bili izloženi fotodegradaciji. Ovi uzorci su pripremani na isti način i analizirani u istim vremenskim tačkama kao i stresirani uzorci, ali su u međuvremenu čuvani zaštićeni od svetlosti u frižideru, da bi se sprečila degradacija.

Slepa proba je sadržavala sve komponente kao i stresirani uzorak, osim same supstance zolpidem-tartarata. Slepa proba je pripremana na isti način i analizirana u istim vremenskim tačkama kao i stresirani uzorci.

Stresirani uzorak placebo je služio kao slepa proba pri ispitivanju forsirane degradacije farmaceutskog doziranog oblika. Ovaj uzorak sadrži sve komponente tabletno mase, osim zolpidem-tartarata. Pripreman je na isti način kao stresirani uzorak, osim što se umesto tabletno mase koristila smeša komponenti placebo.

3.5 PRIPREMA RASTVORA ZA OPTIMIZACIJU *STABILITY-INDICATING* METODE

3.5.1. Priprema mobilnih faza

Mobilne faze korišćene pri optimizaciji *stability-indicating* metode pripremane su prema planu eksperimenata u frakcionom faktorskom i punom faktorskom dizajnu. 5 mM i 10 mM vodeni rastvori amonijum-acetata su pripremljeni rastvaranjem 385,0 mg i 770,0 mg amonijum-acetata u 1 litru vode. Metanol i voda, odnosno vodeni rastvori amonijum-acetata su mešani prema planu eksperimenata u sledećim zapreminskim odnosima: 60 : 40; 70 : 30 i 80 : 20. Uz pomoć glacijalne sirćetne kiseline i koncentrovanog amonijum hidroksida pH mobilnih faza je podešen na 4,0; 6,0 i 8,0. Pripremljene mobilne faze su pre upotrebe profiltrirane kroz membranski filter (0,45 µm).

3.5.2. Priprema standardnih rastvora za optimizaciju *stability-indicating* metode

Standardni rastvori korišćeni za optimizaciju *stability-indicating* metode su pripremani na način opisan u delu 3.2.2. Priprema standardnih rastvora za optimizaciju metode.

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

3.6.1. Priprema mobilne faze

10 mM vodeni rastvor amonijum-acetata je pripremljen rastvaranjem 770,0 mg amonijum-acetata u 1 litru vode. Metanol i 10 mM vodeni rastvor amonijum-acetata su pomešani u zapreminskom odnosu 75,8 : 24,2. Uz pomoć amonijum hidroksida pH mobilne faze je podešen na 7,87. Pripremljena mobilna faza je pre upotrebe profiltrirana kroz membranski filter (0,45 μm).

3.6.2. Priprema standardnih rastvora za validaciju *stability-indicating* metode

Standardni rastvori korišćeni za validaciju *stability-indicating* metode su pripremani na način opisan u delu 3.3.2. Priprema standardnih rastvora za validaciju metode.

3.7. HROMATOGRAFSKI POSTUPAK

3.7.1. Hromatografski uslovi

Hromatografski uslovi korišćeni za razdvajanje i određivanje zolpidem-tartarata i njegovih degradacionih proizvoda zolpacida, oksozolpidema, zolpiridina i zolpaldehida, kao i ispitivanje stresiranih uzoraka uz upotrebu PDA detektora su:

<i>Kolona:</i>	Luna C18 (2) 100A, 250 x 4,6 mm, 5 μm
<i>Mobilna faza:</i>	metanol—10 mM $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ (68,4 : 31,6; v/v) pH 5,4 podešen sa glacijalnom sirćetnom kiselinom
<i>Temperatura kolone:</i>	35 °C
<i>Protok:</i>	1 mL min^{-1}
<i>Talasna dužina:</i>	254 nm
<i>Volumen injiciranja:</i>	10 μL

U studijama forsirane degradacije za praćenje degradacionih proizvoda korišćen je kvadrupolni maseni detektor pri sledećim optimalnim uslovima:

<i>Jonski izvor:</i>	ESI, analiziranje pozitivnih jona
<i>Protok gasa za sušenje:</i>	12,0 L min ⁻¹
<i>Temperatura gasa za sušenje:</i>	350 °C
<i>Pritisak gasa za raspršivanje:</i>	35 psig
<i>Napon na kapilari:</i>	3000 V
<i>Napon ubrzanja:</i>	170 V i 240 V
<i>Maseni analizator:</i>	Kvadrupolni maseni analizator
<i>Volumen injiciranja:</i>	40 µL

Identifikacija nepoznatih degradacionih proizvoda za koje nisu bile dostupne standardne supstance vršena je LC—MSⁿ metodom na jonskom trapu pri sledećim uslovima:

<i>Jonski izvor:</i>	ESI, analiziranje pozitivnih jona
<i>Protok gasa za sušenje:</i>	20 L min ⁻¹
<i>Temperatura kapilare:</i>	200 °C
<i>Protok gasa za raspršivanje:</i>	60 L min ⁻¹
<i>Napon na kapilari:</i>	4.5 kV
<i>Volumen injiciranja:</i>	5 µL

Optimalni hromatografski uslovi u *stability-indicating* metodi su:

<i>Kolona:</i>	Luna C18 (2) 100A, 250 x 4,6 mm, 5 µm
<i>Mobilna faza:</i>	metanol—10 mM NH ₄ CH ₃ COO (75,8 : 24,2; v/v) pH 7.87 podešen sa amonijum hidroksidom
<i>Temperatura kolone:</i>	35 °C
<i>Protok:</i>	1 mL min ⁻¹
<i>Talasna dužina:</i>	254 nm
<i>Volumen injiciranja:</i>	10 µL

3.7.2. Postupak rada

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

Identifikacija supstanci na PDA detektoru je vršena prema retencionim vremenima i UV-spektrima, poređenjem rastvora uzorka sa standardnim rastvorima ispitivanih supstanci. Kvantifikacija je vršena metodom eksternog standarda poređenjem površine pika ispitivane supstance iz rastvora uzorka sa odgovarajućim pikom iz standardnog rastvora.

Praćenje degradacionih proizvoda nastalih studijom forsirane degradacije vršeno je upotrebom kvadrupolnog masenog detektora sa elektrosprej jonizatorom, analiziranjem pozitivnih jona. Identifikacija dobijenih degradacionih proizvoda je vršena preko molekulskih i fragmentnih jona i njihove relativne zastupljenosti, poređenjem sa odgovarajućim standardnim rastvorima.

Praćenje i identifikacija nepoznatih degradacionih proizvoda za koje nisu bile dostupne standardne supstance vršena je LC—MSⁿ metodom, upotrebom jonskog trapa. Identifikacija je izvršena snimanjem višestrukih masenih spektara, odnosno preko molekulskih i fragmentnih jona i njihove relativne zastupljenosti, kao i praćenjem dalje fragmentacije nastalih fragmenata.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

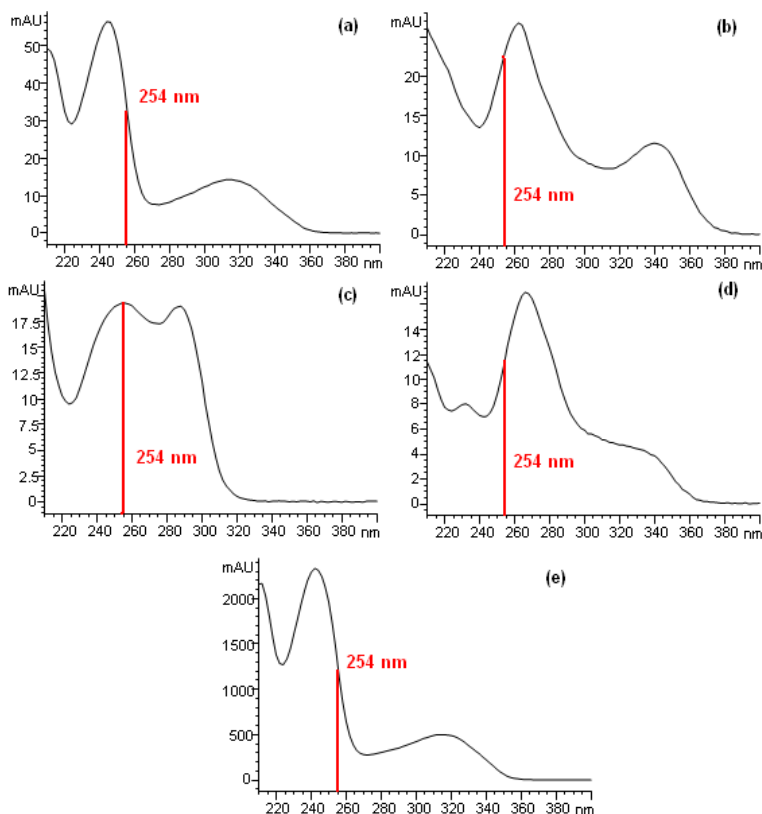
4.1. RAZVOJ I OPTIMIZACIJA RP-HPLC METODE ZA ODREĐIVANJE ZOLPIDEM-TARTARATA I NJEGOVIH DEGRADACIONIH PROIZVODA

Slične hemijske strukture zolpidem-tartarata, zolpacida, oksozolpidema, zolpiridina i zolpaldehida veoma otežavaju pronalaženje hromatografskih uslova za njihovo simultano razdvajanje i određivanje. Relativno polarne osobine zolpacida, zbog prisutne karboksilne grupe u bočnom lancu, dovode do brzog eluiranja ove komponente na C₁₈ kolonama i preklapanja sa pikom mobilne faze. Sa druge strane, zolpaldehid kao najmanje polarna supstanca, zbog prisutne aldehydne grupe u bočnom lancu, ima tendenciju jakog vezivanja za stacionarnu fazu, čime se produžava ukupno trajanje hromatografske analize. Iz navedenih razloga bilo je neophodno da se ispita hromatografsko ponašanje ispitivanih supstanci u odnosu na različite promenljive koje mogu uticati na to ponašanje, u cilju pronalaženja hromatografskih uslova za dobru separaciju ispitivanih supstanci uz što kraće trajanje hromatografske analize.

Sistematičan pristup razvoju takve metode podrazumeva upotrebu hemometrije, odnosno eksperimentalnog dizajna. Razvoj metode uz upotrebu eksperimentalnog dizajna je podrazumevao dve faze: *screening* fazu i optimizacionu fazu. U *screening* fazi cilj je bio da se ispituju i identifikuju promenljive, koje imaju značajan uticaj na hromatografsko ponašanje ispitivanih supstanci. U optimizacionoj fazi cilj je bio da se pronađu optimalne vrednosti za promenljive za koje se u *screening* fazi utvrdilo da su značajne. Da bi se odredili nivoi svake od ispitivanih promenljivih u eksperimentalnom dizajnu, odnosno da bi se odredio opseg u kojem će se pratiti kako te promenljive utiču na hromatografsko ponašanje ispitivanih supstanci, bilo je potrebno izvršiti određena preliminarna ispitivanja i pregledati dostupnu literaturu.

4.1.1. Preliminarna ispitivanja

Prvi faktor koji je trebalo izabrati je talasna dužina detekcije. Snimljen je UV-spektar metanolnih rastvora svih ispitivanih supstanci u opsegu 200–400 nm. Upoređivanjem UV-spektara došlo se do zaključka da bi optimalna talasna dužina za detekciju bila 254 nm, jer svih pet ispitivanih supstanci imaju dobru apsorbciju na toj talasnoj dužini (slika 7). PDA detektor je izabran da bi se tokom ispitivanja proveravala i obezbedila čistoća svih eluiranih pikova.



Slika 7. UV-spektri zolpacida (a), oksozolpidema (b), zolpidina (c), zolpaldehida (d) i zolpidem-tartrata (e)

Sledeći korak je bio izbor odgovarajuće stacionarne faze. Pregledom literature ustanovljeno je da je zolpidem, kao slabo polarno jedinjenje ispitivan korišćenjem kolona punjenih nepolarnim stacionarnim fazama, kao što su C₁₈ i C₈ kolone. Pošto i ostala ispitivana jedinjenja spadaju u slabo polarne ili nepolarne supstance, za preliminarne studije su izabrane nepolarne RP-HPLC kolone. Izbor je bio takav da je obuhvatao različite tipove stacionarnih faza (napr. klasični silikagel, endkapovani silikagel, hibridna stacionarna faza, monolitne kolone, različita dužina kolone, veličina čestica itd.). Smeša ispitivanih jedinjenja je analizirana na sledećim kolonama:

- Zorbax SB-C8, 150x4,6 mm, 5µm (klasični silikagel)
- Zorbax SB-C8, 250x4,6 mm, 5µm (klasični silikagel)
- Zorbax SB-C18, 150x4,6 mm, 5µm (klasični silikagel)
- Zorbax SB-C18, 250x4,6 mm, 5µm (klasični silikagel)
- Xterra RP-18, 150x4,6 mm, 5µm (hibridna kolona)

- Xterra RP-18, 250x4,6 mm, 5 μ m (hibridna kolona)
- Chromolith RP-18, 100x4,6 mm, 5 μ m (monolitna kolona)
- Discovery HS C18, 250x4,6 mm, 5 μ m (endkapovani silikagel)
- Luna C18(2) 100A, 150 x 4.6 mm, 3 μ m (endkapovani silikagel)
- Luna C18(2) 100A, 250 x 4.6 mm, 5 μ m (endkapovani silikagel)

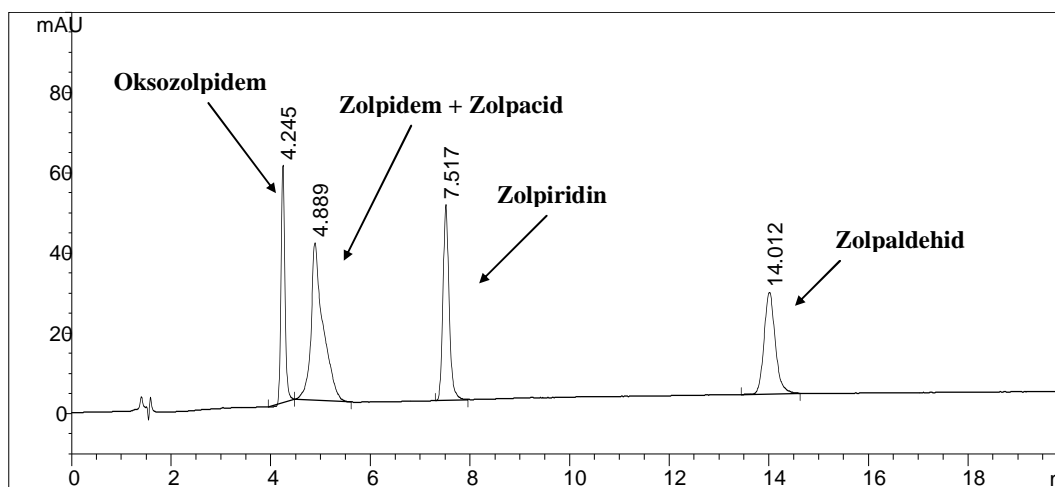
Na Zorbax kolonama zolpacid je, kao najpolarnija komponenta, sa mobilnom fazom metanol:voda (65 : 35 v/v) izlazio veoma rano i preklapao se sa pikom mobilne faze, dok se zolpaldehid, kao najnepolarnija komponenta, dugo zadržavao na koloni i bio je potreban veliki procenat organskog rastvarača u mobilnoj fazi da bi se on eluirao. Povećanjem procenta metanola u mobilnoj fazi na 70% dolazi do smanjenja retencije svih komponenti, ali i do preklapanja pikova. Na Xterra kolonama i Chromolith koloni sve komponente su se kratko zadržavale na koloni, pa je zolpidem koeluirao sa pikom mobilne faze, a i simetrija pika nije bila zadovoljavajuća. Na Discovery HS C18 koloni sa mobilnom fazom metanol:voda (70 : 30 v/v) dobilo se odgovarajuće razdvajanje ispitivanih supstanci, ali je simetrija pikova bila vrlo loša. Na Luna C18 koloni dimenzija 150 x 4.6 mm i veličine čestica 3 μ m sa mobilnom fazom metanol:voda (65 : 35 v/v) dobilo se zadovoljavajuće razdvajanje i simetrija pikova, ali je pritisak na koloni bio veliki (preko 320 bar), pa se odlučilo da se upotrebi kolona sa istom vrstom stacionarne faze Luna C18(2), ali koja ima sferične čestice silikagela veličine 5 μ m i dimenzije 250 x 4.6 mm. Ova kolona je stabilna u širokom opsegu pH 1,5–10. Na ovoj koloni eluiranjem sa mobilnom fazom metanol : 10 mM vodeni rastvor amonijum-acetata (70 : 30 v/v) dobilo se dobro razdvajanje i simetrija pikova, pa je odlučeno da se dalja ispitivanja vrše na ovoj koloni.

Daljim pregledom literature ustanovljeno je da je zolpidem ispitivan uz pomoć mobilnih faza sa različitim procentom organskog rastvarača (25–90 %). Zbog toga je praćen uticaj sadržaja organskog rastvarača na retencije ispitivanih supstanci. Kao organski rastvarač, metanol je dobio prednost nad acetonitrilom, jer je jeftiniji i samim tim čini metodu ekonomičnijom. Pri udelu metanola od 50% u mobilnoj fazi supstance su se dugo zadržavale na koloni i za njihovo eluiranje je bilo potrebno više od 60 minuta. Povećavanjem procenta metanola u mobilnoj fazi retencionna vremena ispitivanih supstanci su se smanjivala i došlo se do zaključka da bi udeo metanola između 60–80% u mobilnoj fazi bio idealan, jer se retenciono vreme poslednje

supstance smanjilo na oko 15 minuta. Veliki udeo metanola u mobilnoj fazi, neophodan da bi se eluirale ispitivane supstance sa nepolarnih C₁₈ kolona, je bio očekivan, zbog relativno nepolarnih osobina ispitivanih supstanci.

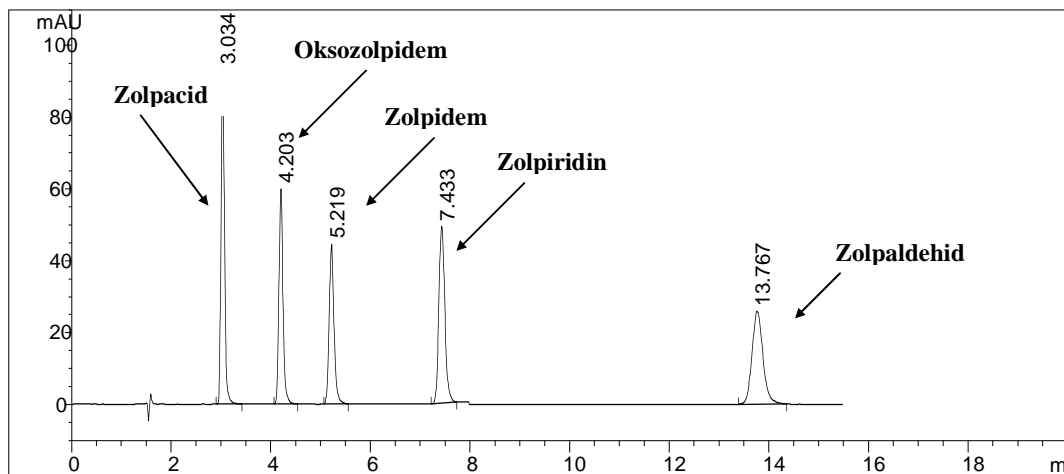
Osim različitog procenta organskog rastvarača, literaturni podaci su ukazali i na različite pH vrednosti mobilnih faza, koje su korišćene za ispitivanje zolpidem-tartarata. Opseg pH vrednosti se kretao od 2–8, ali su ispitivanja najčešće vršena u slabo kiseloj sredini. Zbog toga je odlučeno da se ispita hromatografsko ponašanje ispitivanih supstanci u širem opsegu pH mobilne faze, koji će obuhvatiti raspon od slabo bazne do slabo kisele sredine, jer je tada zolpidem prisutan u rastvoru u nejonizovanom obliku, zbog prisutne tercijarne amidne funkcionalne grupa, koja mu daje slabo bazna svojstva.

Prvo je korišćena mobilna faza sa pH, koji je slabo bazan. Sa mobilnom fazom metanol:voda (65 : 35 v/v) pH 7,8 (podešen sa NH₄OH) došlo je do preklapanja pika zolpacida i zolpidema (slika 8).



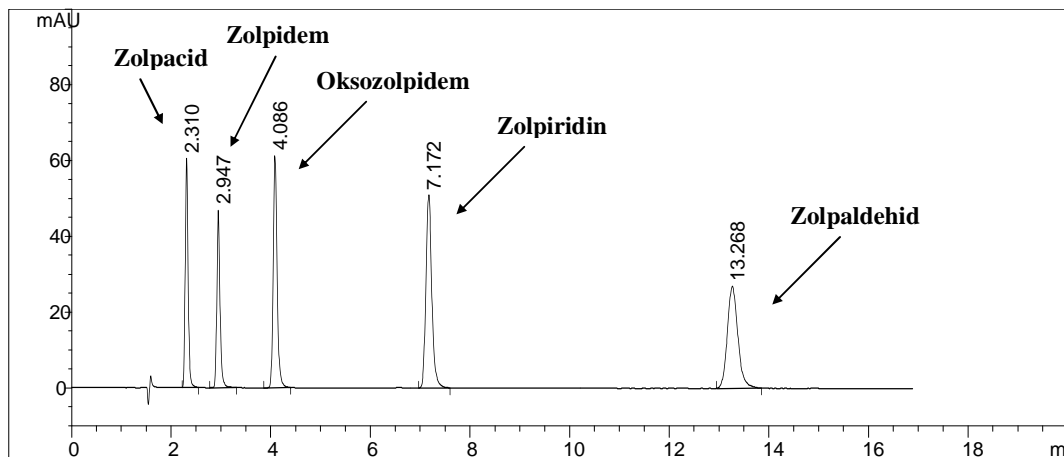
Slika 8. Hromatogram smeše zolpidem-tartarata, zolpacida, oksozolpidema, zolpiridina i zolpaldehida ($c=8 \mu\text{g mL}^{-1}$), na koloni Luna C18(2) 100A, 150 x 4.6 mm, 3 μm sa mobilnom fazom metanol:voda (65 : 35 v/v) pH 7,8 (NH₄OH)

Kada je pH iste mobilne faze dodatno smanjen na 7,0 supstance su bile dobro razdvojene, retencije su bile zadovoljavajuće, a redosled eluiranja supstanci se promenio u odnosu na eluiranje sa mobilnom fazom pH 7,8 (slika 9). Ovo smanjenje pH mobilne faze najviše je uticalo na retenciju zolpacida, što je bilo i očekivano, jer zbog prisutne karboksilne grupe u strukturi, zolpacid predstavlja najpolarniju od ispitivanih supstanci i na njega promena pH mobilne faze najviše deluje.



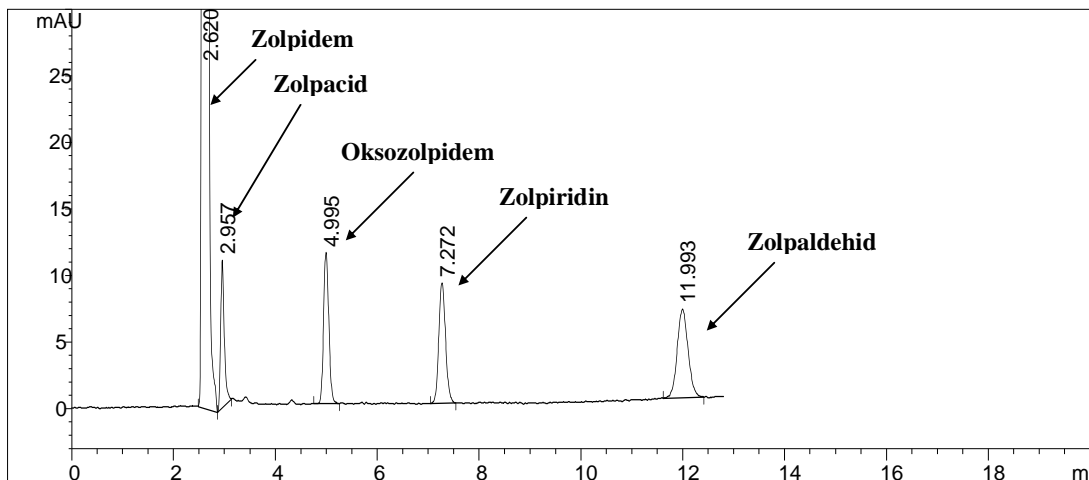
Slika 9. Hromatogram smeše zolpidem-tartrata, zolpacida, oksozolpidema, zolpiridina i zolpaldehida ($c=8 \mu\text{g mL}^{-1}$), na koloni Luna C18(2) 100A, 150 x 4.6 mm, 3 μm sa mobilnom fazom metanol:voda (65 : 35 v/v) pH 7,0

Dalje smanjenje pH na 5,5 (slabo kisela sredina) je, pored uticaja na retenciju zolpacida, delovalo i na retenciju zolpidema, zbog prisutne tercijarne amidne funkcionalne grupe u strukturi. Omogućeno je dobro razdvajanje supstanci, ali prvi pik od zolpacida rano izlazi sa kolone, pa mu je faktor kapaciteta ispod 0,5. U odnosu na mobilnu fazu čiji je pH bio 7,0 redosled eluiranja supstanci je bio drugačiji (slika 10).



Slika 10. Hromatogram smeše zolpidem-tartrata, zolpacida, oksozolpidema, zolpiridina i zolpaldehida ($c=8 \mu\text{g mL}^{-1}$), na koloni Luna C18(2) 100A, 150 x 4.6 mm, 3 μm sa mobilnom fazom metanol:voda (65 : 35 v/v) pH 5,5 (CH_3COOH)

Dodatnim smanjenjem pH mobilne faze na 4,0 dolazi ponovo do promene u redosledu eluiranja supstanci, pri čemu zolpidem-tartarat pokazuje neretenciono ponašanje, odnosno eluira se zajedno sa pikom mobilne faze (slika 11). Ovo neretenciono ponašanje zolpidem-tartarta se objašnjava prisustvom bazne tercijarne amidne funkcionalne grupe u njegovoj strukturi, koja u kiseljoj sredini vezuje proton i prevodi zolpidem u jonizovani oblik.



Slika 11. Hromatogram smeše zolpidem-tartarata ($c=40 \mu\text{g mL}^{-1}$), zolpacida, oksozolpidema, zolpiridina i zolpaldehida ($c=0.4 \mu\text{g mL}^{-1}$), na koloni Luna C18(2) 100A, 250 x 4.6 mm, 5 μm sa mobilnom fazom metanol:voda (70 : 30 v/v) pH 4,0 (CH_3COOH)

Preliminarna ispitivanja, rađena promenom pH mobilne faze, su pokazala da ova promena ima najviše uticaja na retenciju zolpacida i zolpidem-tartarata, dok na oksozolpidem, zolpiridin i zolpaldehyd slabije utiče. Ovo se objašnjava time što zolpacid i zolpidem-tartarat zbog prisutne karboksilne, odnosno tercijarne amidne funkcionalne grupe imaju izraženije polarne osobine u odnosu na oksozolpidem, zolpiridin i zolpaldehyd, pa prisustvo kiseline ili baze u mobilnoj fazi utiče na njihovo pojavljivanje u jonizovanom, odnosno nejjonizovanom obliku. Promenom pH vrednosti menja se i redosled eluiranja komponenti, pa je bilo neophodno detaljno ispitati uticaj pH na hromatografsko ponašanje ispitivanih supstanci i to u opsegu 4–8 pH jedinica, u kojem je verovatno da će komponente biti u nejjonizovanom obliku.

Dalji razvoj metode išao je ka tome da se proveri da li je neophodno dodavanje modifikatora u mobilnu fazu. Sa mobilnom fazom metanol:voda (70 : 30 v/v) nije se dobio odgovarajući hromatogram, jer je zolpacid rano eluirao, preklapajući se sa pikom mobilne faze i pik je imao lošu simetriju, što je ukazivalo na potrebu dodavanja modifikatora u mobilnu fazu. Pošto je plan istraživanja bio da se razvije metoda koja će biti pogodna za rad na masenom detektoru, kao modifikatori nisu mogli da se koriste neisparljivi puferi, kao što je fosfatni pufer. Zato je izabran amonijačno-acetatni pufer, odnosno umesto vode koristio se vodeni rastvor amonijum-acetata, čime se dobio zadovoljavajući izgled hromatograma. Odlučeno je da će se optimalna koncentracija amonijum-acetata u mobilnoj fazi odrediti upotrebom eksperimentalnog dizajna u rasponu 0–10 mM, jer je to opseg koji je primenljiv u radu sa masenim detektorom.

Sledeći faktor koji je razmatran bila je temperatura kolone. Ispitivanje je pokazalo da povećanje temperature kolone dovodi do smanjenja ukupne dužine trajanja analize, jer se smanjuju retencionna vremena svih komponenti. S obzirom da promena temperature različito utiče na ispitivane supstance, njen uticaj je bilo potrebno dodatno ispitati i to u opsegu 25–45 °C, jer je u tom opsegu simetrija pikova bila zadovoljavajuća.

Tokom svih preliminarnih ispitivanja volumen injiciranja (10 µL) i protok mobilne faze (1 mL min⁻¹) su održavani na konstantnim vrednostima. S obzirom da promena protoka generalno veoma utiče na retenciono ponašanje supstanci, odlučeno je da se ova promenljiva detaljnije uključi u ispitivanje tokom razvoja i optimizacije metode upotrebom eksperimentalnog dizajna i to u opsegu 0,5–1 mL min⁻¹, jer su to protoci koji su primenljivi za rad sa masenim detektorom.

4.1.2. Razvoj metode primenom eksperimentalnog dizajna

Preliminarna ispitivanja su ukazala na to koji hromatografski faktori mogu imati uticaj na hromatografsko ponašanje ispitivanih supstanci, kao i na to u kom opsegu je potrebno dodatno ispitati njihov uticaj da bi se definisali optimalni hromatografski uslovi za razdvajanje i određivanje ispitivanih supstanci. S obzirom da je, tokom preliminarnih ispitivanja, menjan jedan po jedan faktor, dok su drugi faktori održavani na konstantnom nivou (*OVAT* metoda), ovaj način nije omogućio da se ispita uticaj faktorskih interakcija na hromatografsko ponašanje ispitivanih supstanci, odnosno šta

se dešava kada se menja više faktora u isto vreme. Zbog toga je u razvoj i optimizaciju metode uključen eksperimentalni dizajn, koji omogućava da se svaki faktor ispita i optimizuje u unapred definisanom opsegu, sprovođenjem serije eksperimenata u kojima se vrednosti više faktora menjaju u isto vreme [21].

4.1.2.1. Primena frakcionog faktorskog dizajna u screening fazi

Preliminarna ispitivanja su ukazala da temperatura kolone, protok mobilne faze, kao i njen sastav u smislu pH, udela metanola i koncentracije amonijum-acetata mogu imati uticaja na hromatografsko ponašanje ispitivanih supstanci. Zato je odlučeno da se u *screening* fazi detaljnije ispita uticaj ovih faktora. S obzirom da je bilo potrebno ispitati pet faktora na dva nivoa izabran je 2^{5-2} frakcioni faktorski dizajn, jer je omogućio izvođenje minimalnog broja eksperimenata. Ukupno je izvedeno 8 eksperimenata uz dodatna 3 ponavljanja u nultoj tački da bi se izračunala standardna greška. Ispitivani faktori i njihovi nivoi, odnosno opsezi u kojima su analizirani su prikazani u tabeli 5.

Tabela 5. Ispitivani faktori i njihovi nivoi analizirani u 2^{5-2} frakcionom faktorskom dizajnu

Faktori	Ispitivani nivoi		
	Niži nivo	Srednji nivo	Viši nivo
	-1	0	+1
(A) Metanol u mobilnoj fazi (%)	60	70	80
(B) pH vrednost mobilne faze	4	6	8
(C) Temperatura kolone (°C)	25	35	45
(D) Koncentracija amonijum-acetata (mM)	0	5	10
(E) Protok mobilne faze (mL min ⁻¹)	0,5	0,75	1

Niži, srednji i viši nivo ispitivanih faktora su kodirani i obeleženi sa -1, 0 i +1, da bi se omogućilo upoređivanje odgovarajućih koeficijenata matematičkog modela. Plan eksperimenata za 2^{5-2} frakcioni faktorski dizajn je prikazan u tabeli 6.

Tabela 6. Plan eksperimenata za 2^{5-2} frakcioni faktorski dizajn

№	Faktor				
	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>
1	+1	-1	+1	-1	+1
2	+1	-1	-1	-1	-1
3	-1	-1	+1	+1	-1
4	+1	+1	+1	+1	+1
5	-1	+1	-1	-1	+1
6	-1	+1	+1	-1	-1
7	-1	-1	-1	+1	+1
8	+1	+1	-1	+1	-1

A – Metanol u mobilnoj fazi (%); *B* – pH vrednost mobilne faze; *C* – Temperatura kolone (°C);
D – Koncentracija amonijum-acetata u mobilnoj fazi (mM); *E* – Protok mobilne faze (mL min⁻¹)

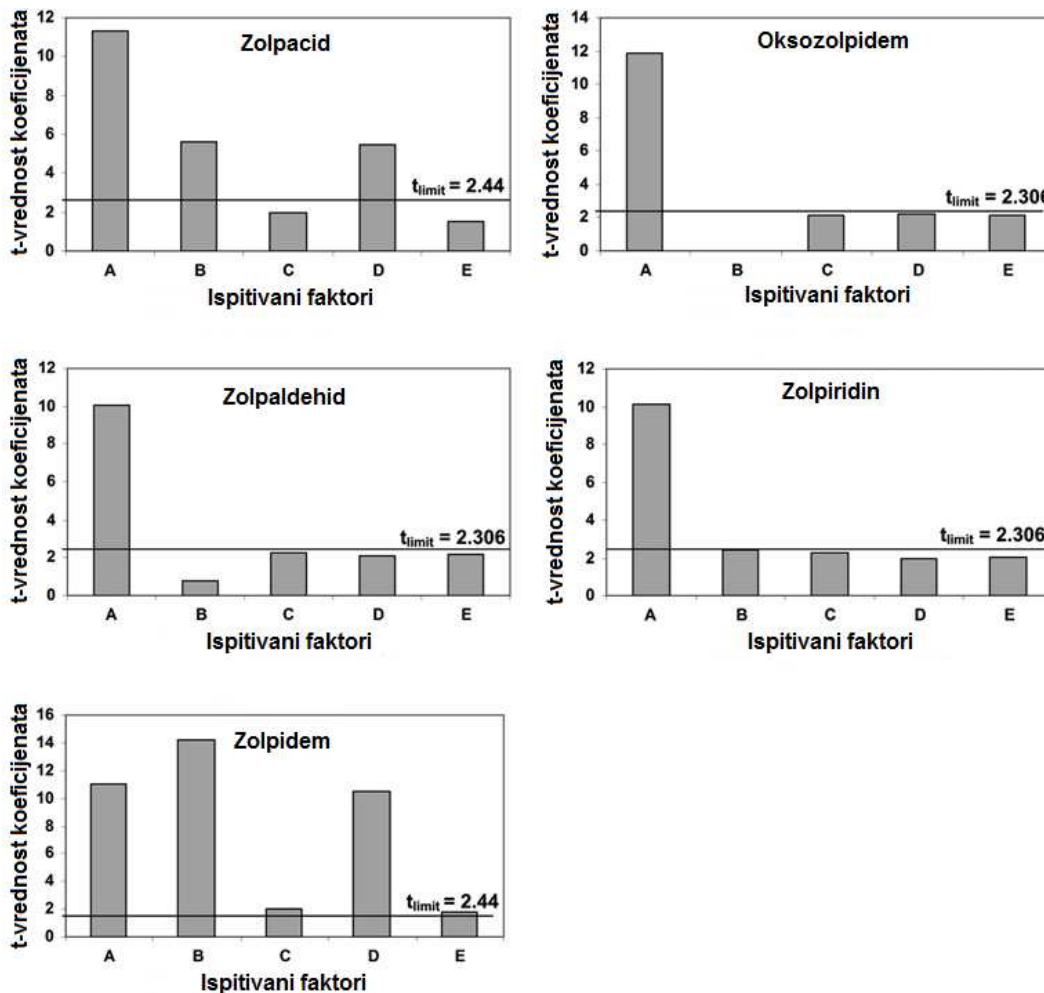
Eksperimenti su izvođeni nasumično, odnosno randomizirano i bez ponavljanja. Odgovor sistema koji se pratio u 2^{5-2} frakcionom faktorskom dizajnu je bio retencioni faktor ispitivanih komponenti. Dobijene vrednosti su prikazane u tabeli 7.

Tabela 7. Retencioni faktori ispitivanih supstanci dobijeni 2^{5-2} frakcionim faktorskim dizajnom

№	Retencioni faktori (<i>k</i>)				
	Zolpacid	Zolpidem tartarat	Oksozolpidem	Zolpiridin	Zolpaldehid
1	0.25	0.00	0.90	1.37	2.31
2	0.28	0.00	0.96	1.50	2.67
3	0.51	0.31	2.20	4.21	8.83
4	0.26	0.68	0.57	1.03	1.72
5	1.15	4.33	2.90	6.33	13.60
6	0.94	3.62	2.56	5.25	10.46
7	0.57	0.32	2.58	5.00	11.68
8	0.30	0.74	0.60	1.13	1.97

Svi podaci su analizirani upotrebom statističkog softvera Design-Expert 7.0.0. Tom prilikom su, uz pomoć višestruke linearne regresione analize, izračunati koeficijenti matematičkih modela za sve dobijene retencione faktore ispitivanih supstanci. Značajnost dobijenih koeficijenata, a samim tim i odgovarajućih faktora procenjena je Studentovim *t*-testom. Za svaki od koeficijenata modela izračunata je *t*-vrednost i upoređena sa kritičnom tabelatnom *t*-vrednošću. Koeficijenti, odnosno

faktori čija je izračunata t -vrednost veća od tabelarne t -vrednosti smatraju se statistički značajnim. Radi vizuelizacije i bolje prezentacije, izračunate t -vrednosti su prikazane grafički u vidu Pareto dijagrama (slika 12.).



Slika 12. Pareto dijagrami izračunatih t -vrednosti za koeficijente matematičkih modela retencionih faktora ispitivanih supstanci, gde je A – metanol u mobilnoj fazi (%); B – pH vrednost mobilne faze; C – temperatura kolone ($^{\circ}\text{C}$); D – koncentracija amonijum-acetata u mobilnoj fazi (mM); E – protok mobilne faze (mL min^{-1})

Faktori čije izračunate t -vrednosti prelaze odgovarajući limit, odnosno kritičnu tabelatnu t -vrednost, koja je na slici 12 predstavljena kao t_{limit} , smatraju se statistički značajnim, što znači da imaju značajan uticaj na hromatografsko ponašanje ispitivanih supstanci. Sa Pareto dijagrama se vidi da procenat metanola u mobilnoj fazi značajno

utiče na retencije svih ispitivanih supstanci, dok pH mobilne faze i koncentracija amonijum-acetata utiču na zolpacid i zolpidem. Zbog toga su ova tri faktora dalje detaljno ispitivana i optimizovana u optimizacionom dizajnu.

Sa druge strane, temperatura kolone i protok mobilne faze ne utiču značajno na retencije ispitivanih supstanci, osim donekle na zolpidem, pa je odlučeno da se u daljim eksperimentima ovi faktori održavaju na konstantnim vrednostima. Odlučeno je da se koristi temperatura kolone od 35 °C, jer je simetrija pikova bolja nego na temperaturi od 25 °C, dok dalje povećavanje temperature skraćuje trajanje kolone. Što se protoka tiče, odlučeno je da se koristi maksimalni mogući protok zbog skraćivanja ukupnog trajanja analize, pa je izabran protok od 1 mL min⁻¹, kao najveći protok koji je preporučljivo koristiti sa masenim detektorom.

4.1.2.2. Primena centralnog kompozicionog dizajna u optimizacionoj fazi

Za optimizaciju faktora koji su pokazali statistički značajan uticaj na hromatografsko ponašanje ispitivanih supstanci, a to su procenat metanola u mobilnoj fazi, pH mobilne faze i koncentracija amonijum-acetata, primenjen je centralni kompozicioni dizajn i metodologija površine odgovora. Centralni kompozicioni dizajn je izabran zbog njegove visoke efikasnosti u odnosu na broj izvršenih eksperimenata [33]. S obzirom da se vršila optimizacija tri faktora lokalizacija $\pm\alpha$ nivoa je izračunata preko jednačine $\alpha = 2^{N/4}$, gde je N broj promenljivih [31], pa su u ovom slučaju $\pm\alpha$ nivoi bili lokalizovani na $\pm(1,68)$.

Svi eksperimenti su izvođeni nasumično, odnosno randomizirano i bez ponavljanja da bi se smanjio efekat nekontrolisanih promenljivih koji može da poveća eksperimentalnu grešku određivanja [37]. Ponavljanja su vršena isključivo u centralnoj tački i to 6 puta, tako da je ukupan broj izvedenih eksperimenata bio 20.

Ispitivani faktori i njihovi nivoi, odnosno opsezi u kojima su analizirani su prikazani u tabeli 8, a plan eksperimenata za centralni kompozicioni dizajn je prikazan u tabeli 9.

Tabela 8. Ispitivani faktori i njihovi nivoi analizirani u centralnom kompozicionom dizajnu

Faktori	Ispitivani nivoi				
	$-\alpha$ (-1,68)	-1	0	+1	$+\alpha$ (+1,68)
(A) Metanol u mobilnoj fazi (%)	53,18	60	70	80	86,82
(B) pH vrednost mobilne faze	2,64	4	6	8	9,36
(D) Koncentracija amonijum-acetata (mM)	0,01	2,55	6,28	10	12,54

Tabela 9. Plan eksperimenata za centralni kompozicioni dizajn

№	Faktor		
	A	B	D
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	$-\alpha$	0	0
10	$+\alpha$	0	0
11	0	$-\alpha$	0
12	0	$+\alpha$	0
13	0	0	$-\alpha$
14	0	0	$+\alpha$
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0

A – Metanol u mobilnoj fazi (%); B – pH vrednost mobilne faze; D – Koncentracija amonijum-acetata u mobilnoj fazi (mM)

U cilju prikupljanja što većeg broja informacija praćeno je nekoliko odgovora sistema: rezolucija između kritičnih pikova i retencioni faktori ispitivanih supstanci. Dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 10.

Tabela 10. Odgovori hromatografskog sistema dobijeni u centralnom kompozicionom dizajnu

№	Retencioni faktori (<i>k</i>)					Rezolucija	
	Zolpacid	Zolpidem tartarat	Oksozolpidem	Zolpiridin	Zolpaldehid	$R_{1/2}$	$R_{2/3}$
1	0.36	0.00	2.36	4.44	10.68	2.96	/
2	0.24	0.00	0.93	1.59	3.07	2.74	/
3	1.33	3.93	2.93	6.42	13.60	11.66	4.27
4	0.34	0.65	0.61	1.21	2.14	2.97	0.83
5	0.27	0.00	1.98	3.94	9.32	2.28	/
6	0.14	0.00	0.65	1.18	2.18	1.36	/
7	0.95	4.21	2.83	6.04	12.86	15.67	6.06
8	0.25	0.76	0.59	1.24	2.29	5.23	1.72
9	1.64	5.63	6.50	14.15	33.82	16.28	2.67
10	0.42	0.50	0.53	0.86	1.35	0.91	0.00
11	0.00	0.00	0.85	0.61	2.68	0.00	7.68
12	0.38	2.09	1.48	3.08	6.10	12.09	3.99
13	0.60	1.26	1.33	2.79	5.44	6.33	0.71
14	0.47	0.82	1.37	2.88	5.64	3.17	4.45
15	0.47	1.08	1.13	2.34	4.48	5.25	0.44
16	0.46	1.09	1.12	2.33	4.46	5.38	0.34
17	0.46	1.09	1.12	2.33	4.47	5.45	0.37
18	0.45	1.09	1.11	2.32	4.46	5.47	0.40
19	0.46	1.09	1.12	2.33	4.46	5.38	0.34
20	0.45	1.09	1.11	2.32	4.46	5.47	0.40

$R_{1/2}$ – rezolucija između zolpacida i zolpidem-tartarata, $R_{2/3}$ – rezolucija između zolpidem-tartarata i oksozolpidema

Uz pomoć višestruke regresione analize definisana je veza između kodiranih faktora i ispitivanih odgovora sistema, koja se najbolje može opisati sledećim matematičkim modelima, odnosno polinomima:

$$k_{zolpacid} = 0,460 - 0,290x_1 + 0,180x_2 - 0,064x_3 - 0,180x_1x_2 + 0,035x_1x_3 - 0,035x_2x_3 + 0,180x_1^2 - 0,120x_2^2 + 0,004x_3^2 \quad (10)$$

$$k_{zolpidem} = 1,110 - 1,120x_1 + 0,960x_2 - 0,026x_3 - 0,840x_1x_2 + 0,021x_1x_3 + 0,049x_2x_3 + 0,580x_1^2 - 0,130x_2^2 - 0,140x_3^2 \quad (11)$$

$$k_{oksozolpidem} = 1,130 - 1,270x_1 + 0,150x_2 - 0,052x_3 - 0,220x_1x_2 + 0,023x_1x_3 + 0,068x_2x_3 + 0,750x_1^2 - 0,079x_2^2 - 0,014x_3^2 \quad (12)$$

$$k_{zopoliridin} = 2,360 - 2,780x_1 + 0,580x_2 - 0,081x_3 - 0,550x_1x_2 + 0,063x_1x_3 + 0,070x_2x_3 + 1,640x_1^2 - 0,360x_2^2 - 0,013x_3^2 \quad (13)$$

$$k_{zopaldehyd} = 4,540 - 6,690x_1 + 0,830x_2 - 0,180x_3 - 0,910x_1x_2 + 0,170x_1x_3 + 0,210x_2x_3 + 4,120x_1^2 - 0,540x_2^2 - 0,130x_3^2 \quad (14)$$

$$R_{1/2} = 5,800 - 3,380x_1 + 3,410x_2 - 0,081x_3 - 2,250x_1x_2 - 0,310x_1x_3 + 1,040x_2x_3 \quad (15)$$

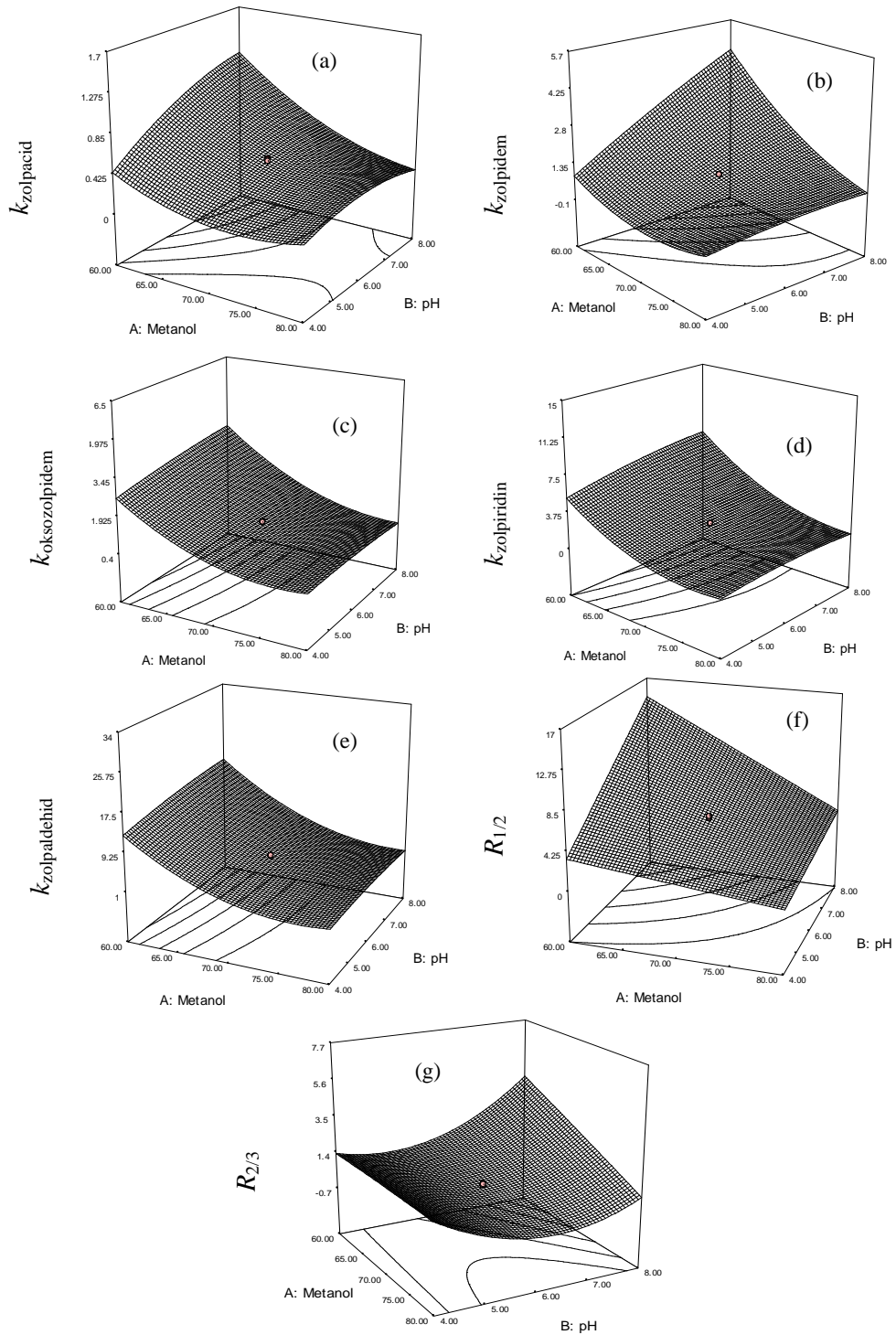
$$R_{2/3} = 0,440 - 0,900x_1 + 0,490x_2 + 0,660x_3 - 0,970x_1x_2 - 0,110x_1x_3 + 0,340x_2x_3 - 0,046x_1^2 + 1,550x_2^2 + 0,390x_3^2 \quad (16)$$

gde su $k_{zopacid}$, $k_{zolidem}$, $k_{oksozolidem}$, $k_{zopoliridin}$, i $k_{zopaldehyd}$ retencioni faktori ispitivanih supstanci, $R_{1/2}$ je rezolucija između zolpacida i zolidem-tartarata, $R_{2/3}$ rezolucija između zolidem-tartarata i oksozolidema, x_1 , x_2 i x_3 su vrednosti za procenat metanola u mobilnoj fazi, pH i koncentraciju amonijum-acetata na kodiranim nivoima.

Iz navedenih polinoma se vidi da odgovore sistema najbolje opisuje kvadratni matematički modeli, odnosno polinomi drugog reda, osim rezoluciju između zolpacida i zolidem-tartarata koju bolje opisuje interakcioni model.

Veći koeficijent u polinomu znači i veći uticaj faktora na odgovor sistema. Iz polinoma se vidi i da li faktor ima pozitivan ili negativan uticaj na odgovor sistema. Ukoliko koeficijent ima negativan predznak to znači da povećanje vrednosti faktora dovodi do smanjenja vrednosti odgovora sistema, dok kod pozitivnog predznaka povećanjem vrednosti faktora povećava se i odgovor sistema. Iz izračunatih polinoma se vidi da procenat metanola ima negativan uticaj na posmatrane retencione faktore i rezolucije. Sa druge strane, pH vrednost mobilne faze pokazuje pozitivan efekat na ispitivane odgovore sistema. Koncentracija amonijum-acetata pokazuje negativan efekat na sve posmatrane odgovore sistema, osim na rezoluciju između zolidem-tartarata i oksozolidema, gde povećanje koncentracije dovodi do povećanja rezolucije.

Radi bolje vizuelizacije optimalnih vrednosti ispitivanih faktora za sve odgovore sistema su konstruisani 3-D grafikoni, odnosno površine odgovora (slika 13).



Slika 13. 3-D grafici za retencione faktore zolpacida (a), zolpidema (b), oksozolpidema (c), zolpiridina (d), zolpaldehida (e), rezoluciju između zolpacida i zolpidema (f) i zolpidema i oksozolpidema (g) u funkciji pH i procenta metanola, pri koncentraciji amonijum-acetata od 6.28 mM.

Iz dobijenih površina odgovora se vidi da i faktorske interakcije imaju uticaja na odgovore sistema. Na retencione faktore ispitivanih supstanci veoma utiče istovremena promena procenta metanola u mobilnoj fazi i pH vrednosti, odnosno što je veća pH vrednost mobilne faze veći je i uticaj promene procenta metanola na retencione faktore. Pored ove interakcije na rezolucije veliki uticaj pokazuje i istovremena promena pH i koncentracije amonijum-acetata.

Za četiri bitna odgovora sistema koji su dodatno optimizovani, a to su kritične rezolucije ($R_{1/2}$ i $R_{2/3}$) i retencioni faktori za komponentu sa najkraćim ($k_{zolpacid}$) i najdužim retencionim vremenom ($k_{zolpaldehid}$), proverena je adekvatnost izabranog modela, odnosno koliko dobro izabrani model opisuje ponašanje hromatografskog sistema. Uz pomoć analize varijanse za svaki od odgovora sistema izračunata je suma kvadrata neslaganja dobijenog matematičkog modela sa eksperimentalnim podacima (eng. *lack-of-fit sum of squares*, SS_{lof}) i čiste eksperimentalne neizvesnosti (eng. *pure error sum of squares*, SS_{pe}), a zatim su te dve vrednosti upoređene pomoću F -testa. Za svaki odgovor sistema je izračunata F -vrednost prema sledećoj formuli:

$$F_{(m-p, n-m)} = \frac{s_{lof}^2}{s_{pe}^2} = \frac{SS_{lof} / (m-p)}{SS_{pe} / (n-m)} \quad (17)$$

gde je m broj faktorskih kombinacija korišćen u centralnom kompozicionom dizajnu, p broj koeficijenta u matematičkom modelu, n ukupan broj eksperimenta, s_{lof}^2 varijansa neslaganja dobijenog matematičkog modela sa eksperimentalnim podacima i s_{pe}^2 varijansa čiste eksperimentalne neizvesnosti.

Izračunate F -vrednosti su bile 0.9935 za $k_{zolpacid}$, 0.8931 za $k_{zolpaldehid}$, 0.7356 za $R_{2/3}$ i 0.9011 za $R_{1/2}$. Odgovarajuće tabelarne F -vrednosti sa kojima je vršeno poređenje za nivo poverenja od 95% su bile $F_{4,6}=4.010$ za $k_{zolpacid}$, $k_{zolpaldehid}$ i $R_{2/3}$, i $F_{7,6}=2.827$ za $R_{1/2}$. S obzirom da su izračunate F -vrednosti bile manje od tabelarnih zaključeno je da izabrani matematički modeli dobro opisuju ponašanje hromatografskog sistema, odnosno da eksperimentalno dobijene vrednosti ne odstupaju statistički značajno od vrednosti predviđenih modelom.

4.1.3. Primena multikriterijumskog odlučivanja u formi Deringerove funkcije

Metodologija površine odgovora je pokazala da svi ispitivani faktori, ali i njihove interakcije imaju statistički značajan uticaj na sva četiri kritična odgovora sistema, pa bi pojedinačna optimizacija faktora prema svakom od posmatranih odgovora sistema bila veoma komplikovan zadatak. Zbog toga je odlučeno da se za dalju optimizaciju metode iskoristi metodologija multikriterijumskog odlučivanja, i to Deringerova funkcija poželjnih odgovora, koja se najviše koristi u analitici lekova.

Tom prilikom su postavljena četiri cilja koja treba da zadovolji sistem i ciljevi su prikazani u tabeli 11.

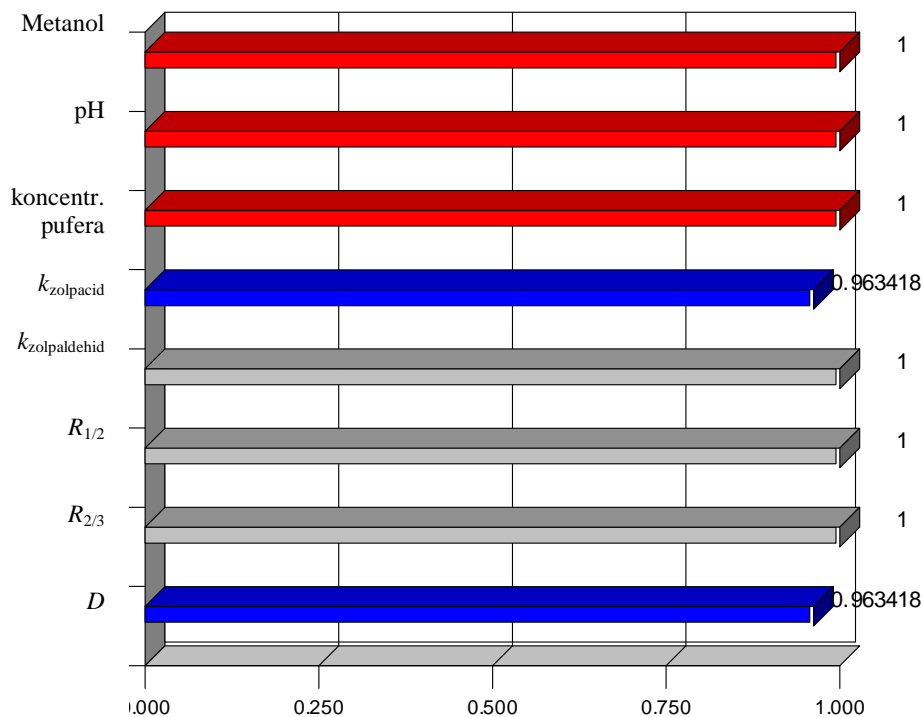
Tabela 11. Ciljevi postavljeni u svrhu multikriterijumskog pristupa optimizaciji metode

Posmatrani odgovor	Cilj	Donja granica	Gornja granica
$k_{zolpacid}$	Maksimalan odgovor	0	0,4
$k_{zolpaldehid}$	U opsegu	0	5
$R_{1/2}$	U opsegu	2	8
$R_{2/3}$	U opsegu	1,5	6

$k_{zolpacid}$ retencioni faktor zolpacida, $k_{zolpaldehid}$ retencioni faktor zolpaldehida, $R_{1/2}$ rezolucija između zolpacida i zolpidem-tartarata, $R_{2/3}$ rezolucija između zolpidem-tartarata i oksozolpidema

Prvi cilj je bio da se dobije maksimalna vrednost za retencioni faktor prvog pika (zolpacida), da bi se sprečilo njegovo preklapanje sa pikom mobilne faze. Drugi cilj je bio da se postigne najkraće moguće trajanje hromatografske analize održavanjem u željenom opsegu retencionog faktora poslednjeg pika (zolpaldehida). Treći i četvrti cilj su bili da se postigne dobra separacija zolpacida, zolpidema i oksozolpidema održavanjem njihove rezolucije u željenom opsegu. Pošto nije bilo potrebe za favorizovanjem ni jednog od ciljeva, odnosno svi ciljevi su bili podjednako značajni, svim ciljevima je dodeljena relativna značajnost od 1.

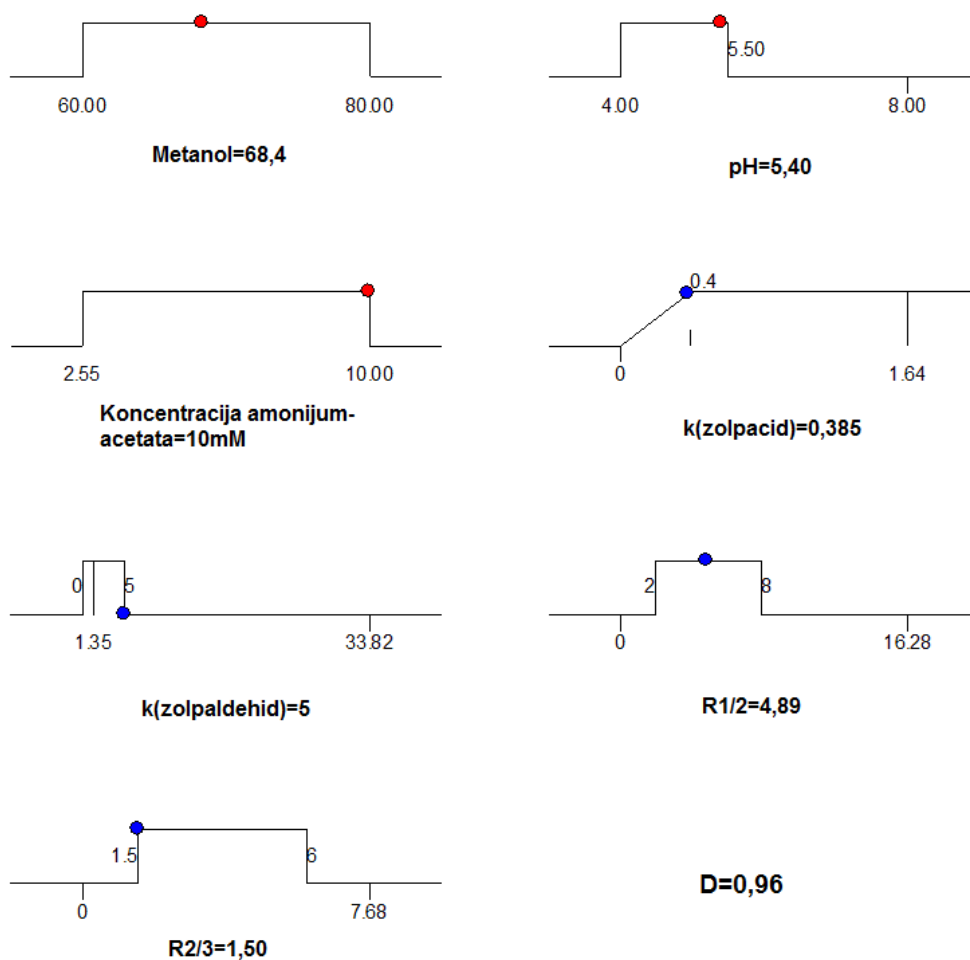
Ispunjenje zadatih ciljeva se ispitalo u istim opsezima faktora koji su korišćeni u centralnom kompozicionom dizajnu (tabela 8) osim što je za pH opseg sužen na 4–5,5 zbog bolje simetrije pikova i podesnosti za rad sa masenim detektorom. Za svaki od zadatih ciljeva izračunate su pojedinačne funkcije poželjnih odgovora (d_i) preko jednačina (4), (7) i (8), kao i ukupna funkcija poželjnih odgovora (D) preko jednačine (9) (v. poglavlje 1.2.3.). Vrednosti pojedinačnih i ukupne funkcije poželjnih odgovora su radi bolje vizuelizacije prikazane kao Pareto dijagram na slici 14.



Slika 14. Pareto dijagram vrednosti pojedinačnih (d_i) i ukupne funkcije poželjnih odgovora (D), gde su $k_{zolpacid}$ retencioni faktor zolpacida, $k_{zolpaldehid}$ retencioni faktor zolpaldehida, $R_{1/2}$ je rezolucija između zolpacida i zolpidema, a $R_{2/3}$ rezolucija između zolpidema i oksozolpidema.

Najvišu vrednost ($D=0,96$) ukupna funkcija poželjnih odgovora je imala pri sledećim vrednostima ispitivanih faktora: 68,4% metanola u mobilnoj fazi, pH mobilne faze 5,4 i koncentracija amonijum-acetata od 10 mM, pa su ovi uslovi na dalje smatrani kao globalni optimum. Pri ovim uslovima dobijeno je najkraće moguće trajanje hromatografske analize (manje od 15 minuta) uz dobro razdvajanje svih ispitivanih supstanci.

Grafički prikaz zadovoljenja hromatografskih ciljeva na pronađenom globalnom optimumu je predstavljen na slici 15.



Slika 15. Grafički prikaz zadovoljenja hromatografskih ciljeva na pronađenom globalnom hromatografskom optimumu

Dijagram 3-D zavisnosti ukupne funkcije poželjnih odgovora (D) od procenta metanola u mobilnoj fazi i pH mobilne faze, pri koncentraciji amonijum-acetata od 10 mM je prikazan na slici 16. Pri nižim koncentracijama amonijum-acetata vrednost D pada ispod 0,47, pa ove koncentracije više nisu ni razmatrane u istraživanju. Sa dijagrama se može videti da uzak deo eksperimentalnog regiona obezbeđuje vrednosti D veće od nule. Takođe, mala promena u procentu metanola i pH vrednosti mobilne faze dovodi do velikih promena u vrednosti D . Drugim rečima, na globalnom optimumu

robusnost metode bi mogla biti ugrožena, pa je odlučeno da se robusnost metode ispita pri validaciji prema zahtevima Evropske farmakopeje [8].

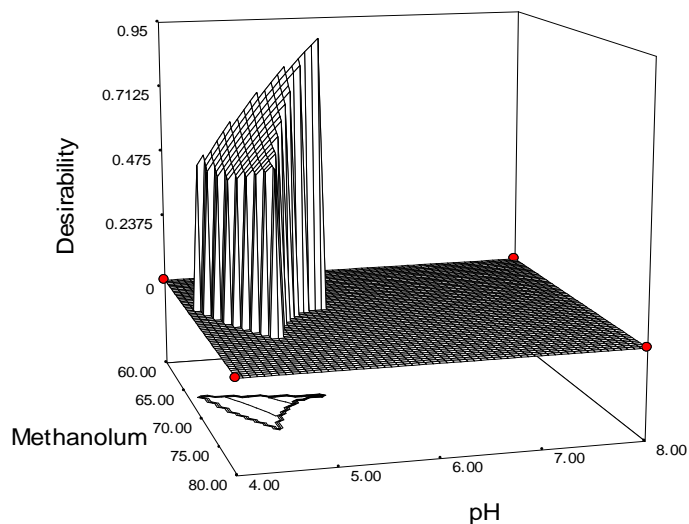
Design-Expert® Software

Desirability



X1 = A: Metanol
X2 = B: pH

Actual Factor
C: buffer concentration = 10.00



Slika 16. Dijagram 3-D zavisnosti ukupne funkcije poželjnih odgovora (D) od procenta metanola u mobilnoj fazi i pH mobilne faze pri koncentraciji amonijum-acetata od 10 mM

Razvojem metode uz pomoć eksperimentalnog dizajna i multikriterijumskog pristupa u odlučivanju identifikovani su optimalni uslovi za određivanje sadržaja zolpidem-tartarata i njegovih nečistoća zolpacida, oksozolpidema, zolpiridina i zolpaldehida u film-tabletama i to:

Kolona: Luna C18 (2) 100A, 250 x 4,6 mm, 5 μ m
Mobilna faza: metanol—10 mM $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ (68,4 : 31,6; v/v) pH 5,4
 podešen sa glacijalnom sirćetnom kiselinom
Temperatura 35 $^\circ\text{C}$
Protok: 1 mL min^{-1}
Talasna dužina: 254 nm
Volumen injiciranja: 10 μL

4.2. VALIDACIJA RP-HPLC METODE ZA ODREĐIVANJE ZOLPIDEM-TARTARATA I NJEGOVIH DEGRADACIONIH PROIZVODA

Nakon što su ustanovljeni optimalni hromatografski uslovi, RP-HPLC metoda za određivanje zolpidem-tartarata i njegovih degradacionih proizvoda je validirana u skladu sa zahtevima ICH regulative [4]. Tom prilikom su ispitivani sledeći parametri: robusnost, selektivnost, linearnost i opseg, preciznost, tačnost, limit detekcije i limit kvantifikacije.

4.2.1. Ispitivanje robusnosti

Pošto je 3-D dijagram zavisnosti ukupne funkcije poželjnih odgovora pokazao da bi metoda na globalnom optimumu mogla da bude problematična po pitanju robusnosti, ovaj parametar je prvi ispitivan prilikom validacije. Ispitivanje je urađeno prema zahtevima monografije Evropske farmakopeje 2.2.46. *Chromatographic Separation Techniques* za izokratski sistem [8], a zahtev je bio da pri namernim malim promenama hromatografskih parametara rezolucija između kritičnih pikova ne bude manja od 1,5.

Prema Ph. Eur. sastav mobilne faze može da varira $\pm 30\%$ relativno ili $\pm 2\%$ apsolutno (šta je veće), računato na rastvarač prisutan u manjoj količini. Zbog toga je robusnost ispitivana sa mobilnom fazom koja sadrži 58% metanola i 78% metanola. Uticaj koncentracije soli amonijum-acetata u mobilnoj fazi na stabilnost sistema je ispitivana variranjem $\pm 10\%$, pa je zbog toga hromatografisanje vršeno sa 9 mM i 11 mM vodenim rastvorom amonijum-acetata u mobilnoj fazi, dok je pH vrednost mobilne faze menjana $\pm 0,2$ pH jedinice od optimalne vrednosti (5,2 i 5,6).

Sledeći parametar koji je ispitivan je protok mobilne faze. Ph. Eur. dozvoljava promenu protoka za $\pm 50\%$. Zato je robusnost ispitivana pri protoku $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ i $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, kao i pri temperaturama 25°C i 45°C ($\pm 10^\circ\text{C}$ od optimalne vrednosti).

Pošto je preliminarnim ispitivanjima pokazano da je za razdvajanje zolpidem-tartarata i njegovih degradacionih proizvoda presudna uloga u izboru stacionarne faze i da su se idealna rezolucija i simetrija pikova dobili samo na Luna C18 kolonama, dalja ispitivanja na drugim stacionarnim fazama nisu rađena.

Ukupni rezultati ispitivanja robusnosti metode prikazani su u tabeli 12.

Tabela 12. Resultati ispitivanja robusnosti

Faktor	Varijacije	$R_{1/2}$	$R_{2/3}$
Metanol u mobilnoj fazi ($\pm 10\%$ od optimalnih uslova)	58 % metanol	11.6	5.65
	78 % metanol	1.73	2.35
pH vrednost mobilne faze (± 0.2 pH jedinice od optimalnih uslova)	pH 5.2	2.68	9.56
	pH 5.6	7.46	4.37
Koncentracija amonijum-acetata u mobilnoj fazi ($\pm 10\%$ od optimalnih uslova)	9 mM	5.54	4.36
	11 mM	5.82	3.01
Temperatura kolone ($\pm 10\text{ }^\circ\text{C}$)	25 $^\circ\text{C}$	5.34	7.23
	45 $^\circ\text{C}$	5.77	5.14
Protok mobilne faze ($\pm 50\%$ od optimalnih uslova)	0.5 mL min ⁻¹	6.99	6.98
	1.5 mL min ⁻¹	4.68	5.70

$R_{1/2}$ – rezolucija između zolpacida i zolpidem-tartarata, $R_{2/3}$ – rezolucija između zolpidem-tartarata i oksozolpidema

Iz tabele 12 se vidi da promenom hromatografskih faktora u opsezima koje propisuje Ph. Eur. rezolucija između kritičnih pikova ne pada ispod 1,7, čime je dokazana dobra robusnost metode.

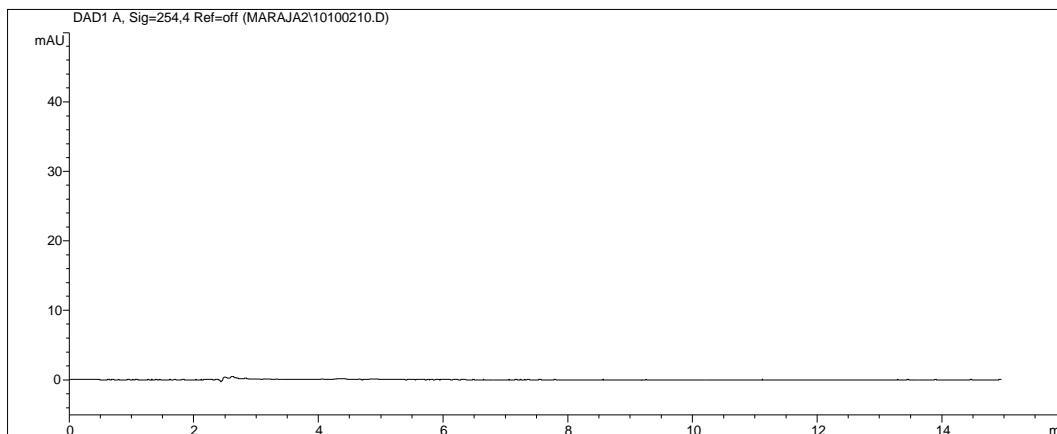
4.2.2. Ispitivanje selektivnosti

U RP-HPLC sistem koji je prethodno pripremljen i podešen, pri navedenim hromatografskim uslovima injiciran je rastvor placeba, rastvor uzorka i radni rastvor standarda za ispitivanje selektivnosti, koji sadrži zolpidem-tartarat u količini od 100% i njegove degradacione proizvode u količini od 1% u odnosu na radnu koncentraciju zolpidem-tartarata u rastvoru uzorka.

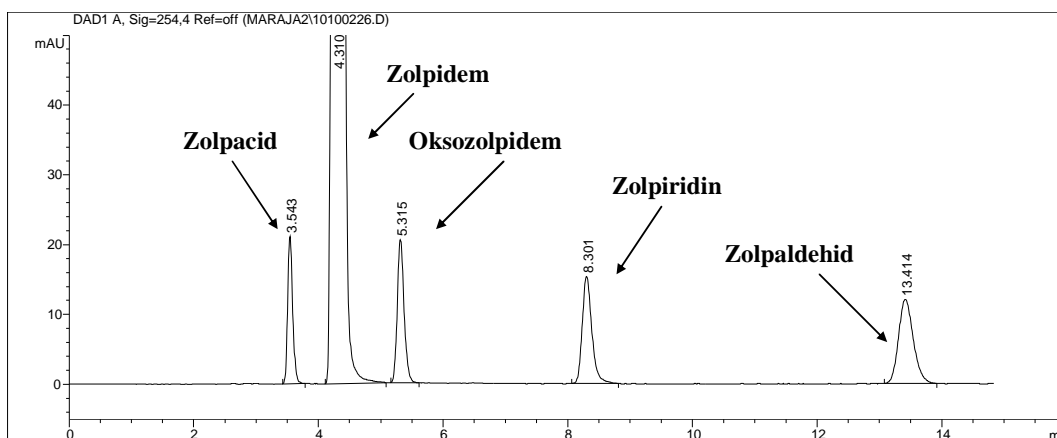
Upoređivana su retencionna vremena hromatografskih pikova sa hromatograma rastvora placeba sa retencionim vremenima pikova sa hromatograma radnog rastvora standarda za ispitivanje selektivnosti i rastvora uzorka.

Selektivnost se potvrđuje ukoliko nema interferencija od strane komponenta placeba pri ispitivanju, odnosno ukoliko na hromatogramu rastvora placeba nema pikova čija retencionna vremena odgovaraju retencionim vremenima za zolpidem-tartarat i njegove degradacione proizvode: zolpacid, oksozolpidem, zolpiridin i zolpaldehid.

Hromatogrami rastvora placeba i radnog rastvora standarda za ispitivanje selektivnosti, prikazani su na slikama 17. i 18.



Slika 17. Hromatogram placebo rastvora



Slika 18. Hromatogram radnog rastvora standarda za ispitivanje selektivnosti

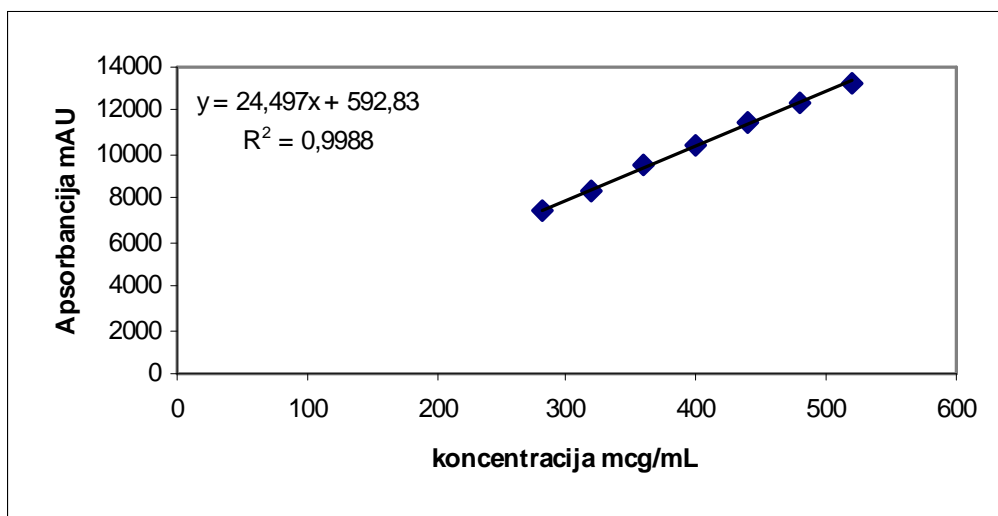
Čistoća svih eluiranih pikova je praćena upotrebom PDA detektora i dokazano je da je čistoća svih pikova bila veća od 99%. Pošto na hromatogramu rastvora placebo nema pikova čija retencionna vremena odgovaraju retencionim vremenima za zolpidem-tartarat i njegove degradacione proizvode: zolpacid, oksozolpidem, zolpiridin i zolpaldehid, čime se isključuje uticaj pomoćnih supstanci iz uzorka na razdvajanje i određivanje ispitivanih supstanci, selektivnost metode je potvrđena.

4.2.3. Ispitivanje linearnosti

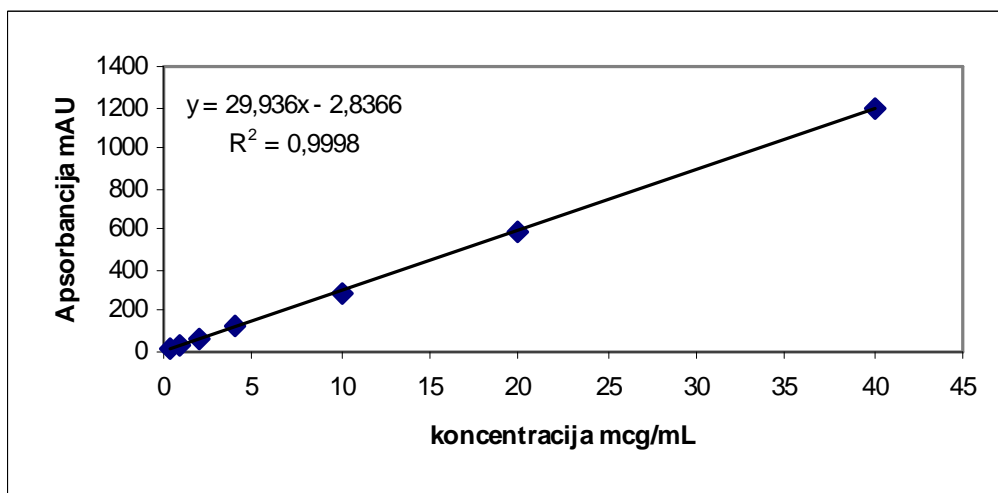
Za ispitivanje linearnosti pripremljeno je sedam standardnih rastvora, različitih koncentracija za zolpidem-tartarat i njegove degradacione proizvode: zolpacid, oksozolpidem, zolpiridin i zolpaldehid i rastvori su injicirani u hromatografski sistem.

Koncentracije rastvora su obuhvatale opseg od 70–130% za zolpidem-tartarat i 0,1–10% za njegove degradacione proizvode u odnosu na radnu koncentraciju zolpidem-tartarata u rastvoru uzorka.

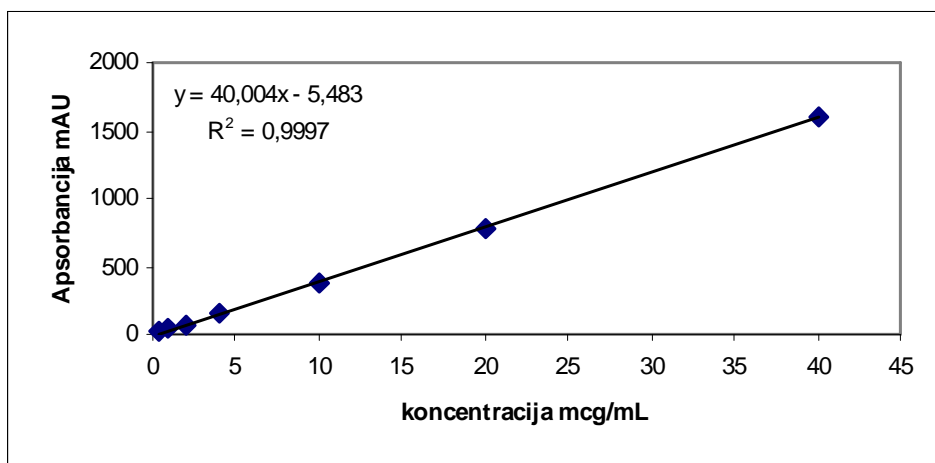
Analizirana je zavisnost površine pikova (apsorbancije) ispitivanih supstanci u funkciji koncentracije. Kalibracione krive su konstruisane metodom najmanjih kvadrata, a svaka tačka dobijena je kao srednja vrednost tri injektovanja odgovarajućih rastvora. Kalibracione krive ispitivanih jedinjenja prikazane su na slikama 19,20,21,22 i 23.



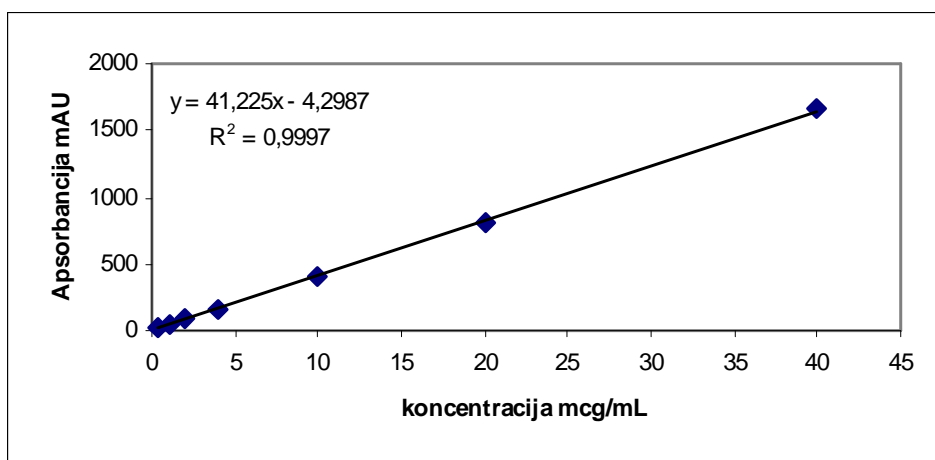
Slika 19. Kalibraciona kriva zolpidem-tartarata



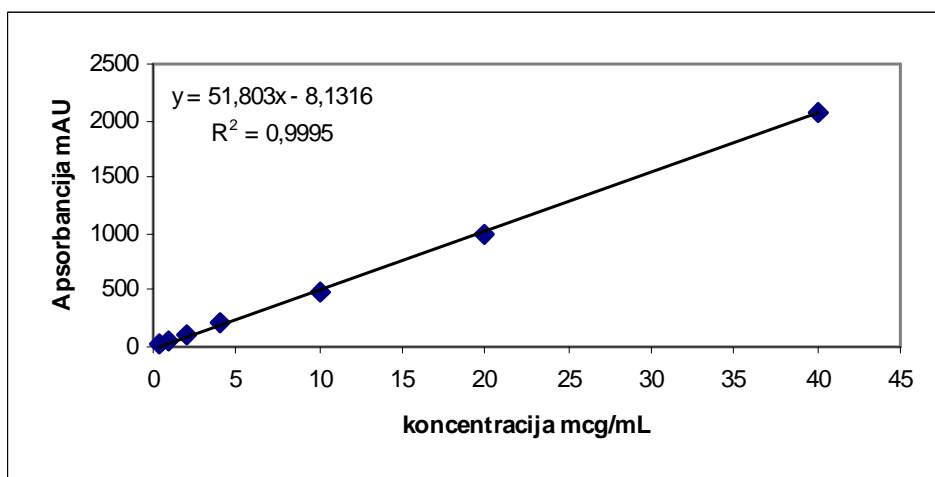
Slika 20. Kalibraciona kriva zolpacida



Slika 21. Kalibraciona kriva oksozolpidema



Slika 22. Kalibraciona kriva zolpiridina



Slika 23. Kalibraciona kriva zolpaldehida

Linearna zavisnost između površine pika i koncentracije je dokazana za sve ispitivane supstance u izabranom opsegu, jer je koeficijent linearnosti za sve ispitivane supstance bio veći od 0,998 (postavljeni zahtevi za linearnost su bili da koeficijent linearnosti bude veći od 0,995 za sve supstance). Uz pomoć Studentovog t -testa je takođe pokazano da odsečak na y osi nije statistički značajno veći od nule, jer su izračunate t -vrednosti za sve kalibracione krive (t_b) bile manje od tabelarne t -vrednosti ($t_{tab}=4.032$, $p=0.01$). Odgovarajuće jednačine pravih i parametri regresione analize za ispitivane supstance prikazani su u tabeli 13.

Tabela 13. Rezultati ispitivanja linearnosti metode

Ispitivana supstanca	Opseg koncentracija ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Kalibraciona kriva $y = ax + b$	r^2	S_a	S_b	t_b
Zolpacid	0,4–40	$y = 29.936x - 2.8366$	0,9998	0.19	3.37	0.84
Zolpidem-tartarat	280–520	$y = 24.497x + 592.83$	0,9988	0.37	152.24	3.89
Oksozolpidem	0,4–40	$y = 40.004x - 5.4830$	0,9997	0.31	5.38	1.02
Zolpiridin	0,4–40	$y = 41.225x - 4.2987$	0,9997	0.29	5.08	0.85
Zolpaldehid	0,4–40	$y = 51.803x - 8.1316$	0,9995	0.49	8.61	0.94

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, t_{tab} tabelarna t -vrednost ($t_{tab}= 4.032$, $p=0.01$)

4.2.4. Ispitivanje preciznosti

Preciznost predstavlja međusobno slaganje serije rezultata dobijenih određivanjem iz istog homogenog uzorka pod propisanim uslovima i najčešće se izražava relativnom standardnom devijacijom. Ponovljivost predstavlja preciznost procenjenju pod istim uslovima u kratkom vremenskom periodu [4]. Kao zahtev je postavljeno da RSD vrednost za ponovljenja određivanja zolpidem-tartarata bude manja od 2%, a za degradacione proizvode manja od 5%.

Preciznost odnosno ponovljivost metode je ispitivana analizom laboratorijske smeše standarda za ispitivanje preciznosti i tačnosti koji sadrže koncentracije 0,40; 4,0 i 40,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za degradacione proizvode i 280; 400 i 520 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za zolpidem-tartarat,

kao i komponente placeba u odnosu koji odgovara sastavu pomoćnih komponenti u uzorku. Pravljeni su po tri rastvora svake koncentracije i svaki je rastvor injiciran po tri puta. Obradom podataka izračunati su statistički parametri koji ukazuju na preciznost metode koji su prikazani u tabeli 14.

Tabela 14. Rezultati ispitivanja preciznosti metode

Ispitivana supstanca	Injektovano ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Nađeno $\pm SD$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	RSD (%)
Zolpacid	0.4	0.39 ± 0.00	0.65
	4	4.02 ± 0.02	0.48
	40	40.45 ± 0.25	0.61
Zolpidem-tartarat	280	284.58 ± 1.22	0.43
	400	406.82 ± 2.13	0.52
	520	525.95 ± 2.66	0.51
Oksozolpidem	0.4	0.41 ± 0.01	3.33
	4	4.03 ± 0.02	0.44
	40	40.21 ± 0.21	0.52
Zolpiridin	0.4	0.42 ± 0.01	3.50
	4	4.04 ± 0.02	0.56
	40	40.08 ± 0.23	0.58
Zolpaldehid	0.4	0.38 ± 0.00	0.26
	4	4.05 ± 0.01	0.29
	40	40.18 ± 0.23	0.58

SD standardna devijacija ($n=9$), *RSD* relativna standardna devijacija

Statističkom obradom eksperimentalno dobijenih rezultata i izračunavanjem standardne devijacije (*SD*) i relativne standardne devijacije (*RSD*), koja se za sve ispitivane supstance i sve koncentracije kretala u unapred definisanim granicama, potvrđena je dobra preciznost metode u ispitivanom opsegu.

4.2.5. Ispitivanje tačnosti

Tačnost predstavlja međusobno slaganje prave ili referentne vrednosti i rezultata dobijenog određivanjem pod propisanim uslovima, a izražava se kao procenat prinosa, odnosno *Recovery* vrednost od poznate, dodate količine analita u uzorak. Kao zahtev je postavljeno da *Recovery* vrednost za zolpidem-tartarat bude između 98–102%, a za degradacione proizvode između 95–106%.

Tačnost je ispitivana analizom istih laboratorijskih smeša standarda, koje su korišćene za ispitivanje preciznosti metode, a koje sadrže degradacione proizvode u koncentracijama 0,40; 4,0 i 40,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, zolpidem-tartarat u koncentracijama 280; 400 i 520 $\mu\text{g mL}^{-1}$, kao i komponente placeba u odnosu koji odgovara sastavu pomoćnih komponenti u uzorku. Pravljeni su po tri rastvora svake koncentracije i svaki je rastvor injiciran po tri puta. Statističkom analizom izračunati su parametri koji ukazuju na tačnost metode i koji su prikazani u tabeli 15.

Tabela 15. Rezultati ispitivanja tačnosti metode

Ispitivana supstanca	Injektovano ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Nadeno \pm SD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recovery (%)
Zolpacid	0.4	0.39 \pm 0.00	98.30
	4	4.02 \pm 0.02	100.54
	40	40.45 \pm 0.25	101.12
Zolpidem-tartarat	280	284.58 \pm 1.22	101.64
	400	406.82 \pm 2.13	101.71
	520	525.95 \pm 2.66	101.14
Oksozolpidem	0.4	0.41 \pm 0.01	102.01
	4	4.03 \pm 0.02	100.66
	40	40.21 \pm 0.21	100.52
Zolpiridin	0.4	0.42 \pm 0.01	105.31
	4	4.04 \pm 0.02	101.01
	40	40.08 \pm 0.23	100.21
Zolpaldehid	0.4	0.38 \pm 0.00	95.13
	4	4.05 \pm 0.01	101.1
	40	40.18 \pm 0.23	100.45

SD standardna devijacija ($n=9$)

Izračunavanjem procenta prinosa, odnosno *Recovery* vrednosti, koja se za sve ispitivane supstance i sve koncentracije kretala u unapred definisanim granicama, potvrđena je dobra tačnost metode u ispitivanom opsegu.

4.2.6. Ispitivanje limita detekcije i kvantifikacije

Određivanje limita detekcije i kvantifikacije urađeno je kombinacijom eksperimentalnog rada i procene odnosa signal/šum. Naime, u hromatografski sistem su injicirani rastvori koji sadrže po 0,02; 0,04; 0,08; 0,16; 0,24 i 0,32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ zolpidem-

tartarata i njegovih degradacionih proizvoda, a zatim je računat odnos signal/šum za svaku ispitivanu supstancu u svim koncentracijama. Limitom detekcije (LOD) je označena ona koncentracija koja ima odnos signal/šum najmanje 3:1, dok je limitom kvantifikacije označena ona koncentracija koja ima odnos signal/šum najmanje 10:1 (tabela 16).

Tabela 16. LOD i LOQ vrednosti za ispitivane supstance

Ispitivana supstanca	<i>LOD</i> ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	<i>LOQ</i> ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Zolpacid	0.05	0.15
Zolpidem-tartarat	0.07	0.24
Oksozolpidem	0.05	0.15
Zolpiridin	0.06	0.20
Zolpaldehid	0.08	0.26

LOD limit detekcije, *LOQ* limit kvantifikacije

Vrednosti validacionih parametara robusnosti, selektivnosti, linearnosti, preciznosti, tačnosti, limita detekcije i limita kvantifikacije, koje su bile u skladu sa unapred definisanim kriterijumima za validaciju metode, ukazali su da validirana RP-HPLC metoda odgovara njenoj planiranoj nameni za određivanje zolpidem-tartarata i njegovih degradacionih proizvoda zolpacida, oksozolpidema, zolpiridina i zolpaldehida u film-tabletama.

4.3. KVALITATIVNA I KVANTITATIVNA ANALIZA FILM-TABLETA

Za određivanje sadržaja zolpidem-tartarata i njegovih degradacionih proizvoda: zolpacida, oksozolpidema, zolpiridina i zolpaldehida predloženom RP-HPLC metodom u film-tabletama, u hromatografski sistem su injektovani radni standardni rastvor koji sadrži zolpidem-tartarat u koncentraciji od $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ i degradacione proizvode u koncentraciji $4 \mu\text{g mL}^{-1}$, kao i rastvor uzorka. Napravljena su tri rastvora uzorka i svaki je injiciran tri puta.

Pod navedenim uslovima dobijeni su dobro definisani i razdvojeni hromatografski pikovi zolpidem-tartarata i degradacionih proizvoda. Hromatografski parametri RP-HPLC analize prikazani su u tabeli 17.

Tabela 17. Hromatografski parametri za RP-HPLC analizu zolpidem-tartarata i degradacionih proizvoda

Hromatografski parametri	Zolpacid	Zolpidem-tartarat	Oksozolpidem	Zolpiridin	Zolpaldehid
t_r	3,54	4,31	5,31	8,30	13,41
t_0	2,56				
V_r	3,54	4,31	5,31	8,30	13,41
W	0,08	0,10	0,11	0,16	0,25
As	0,78	1,03	0,79	0,74	0,80
k'	0,38	0,68	1,07	2,24	4,24
N	10015	10766	12184	15553	16093
R	/	4,98	5,59	12,99	14,82

t_r retenciono vreme, t_0 retenciono vreme mobilne faze, V_r retenciona zapremina, W širina pika na polovini njegove visine (min), As simetrija pika, N broj teoretskih platoa, k' retencioni faktor, R rezolucija

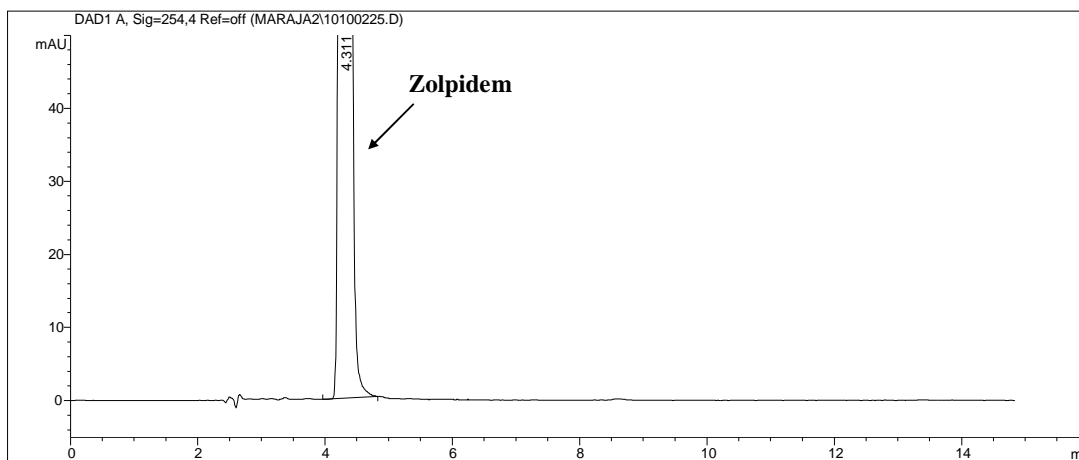
Iz tabele 17. se vidi da se svi hromatografski parametri nalaze u dozvoljenim granicama koji garantuju dobru separaciju i određivanje ispitivanih supstanci. Sve rezolucije su daleko veće od 1,5 što se smatra razdvajanjem na baznoj liniji. Prvi pik od zolpacida ima retencioni faktor od 0,38, što garantuje dobru razdvajanje od pika mobilne faze. Simetrije pikova nečistoća, koje su blizu vrednosti od 0,8 i zolpidem-tartarata bliska vrednosti od 1, omogućavaju dobru integraciju pikova i kvantifikaciju svih komponenti.

Određivanje sadržaja ispitivanih supstanci rađeno je metodom eksternog standarda, preko površine pikova. Identifikacija ispitivanih supstanci je izvršena preko retencionih vremena i UV-spektra snimljenog na PDA detektoru. Rezultati kvantitativne analize film-tableta su predstavljeni u tabeli 18, a hromatogram rastvora uzorka na slici 24.

Tabela 18. Rezultati određivanja sadržaja zolpidem-tartarata i njegovih degradacionih proizvoda u film-tabletama

Ispitivana supstanca	Očekivano ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Nađeno ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Nađeno (mg/tbl.)	Recovery (%)	RSD (%)
Zolpacid	4	Ispod LOD	Ispod LOD	/	/
Zolpidem-tartarat	4	Ispod LOD	Ispod LOD	/	/
Oksozolpidem	400	$384,8 \pm 1,2^*$	$9.62 \pm 0,03^*$	96,2	0,33
Zolpiridin	4	Ispod LOD	Ispod LOD	/	/
Zolpaldehid	4	Ispod LOD	Ispod LOD	/	/

*SD standardna devijacija ($n=9$), RSD relativna standardna devijacija



Slika 24. Hromatogram rastvora uzorka

Upoređivanjem dobijenih vrednosti za sadržaj ispitivanih supstanci sa specifikacijskim zahtevima proizvođača, ustanovljeno je da proizvod zadovoljava definisane zahteve iz specifikacije u roku upotrebe proizvoda.

4.4. STUDIJA FORSIRANE DEGRADACIJE

Studija forsirane degradacije farmaceutski aktivne supstance zolpidem-tartarata i farmaceutskog doziranog oblika film-tableta je sprovedena u skladu sa ICH smernicama [42,43] i obuhvatala je ispitivanja u rastvoru i u čvrstom stanju. Uzorci su pripremani na način opisan u delu 3.4. *Priprema rastvora za studiju forsirane degradacije*. Svi uzorci su ispitivani u sledećim vremenskim tačkama: neposredno nakon pripreme (vreme

nula), nakon 1, 4, 8, 24, 48 sati i nakon 8, 14 i 21 dan, a dalje ispitivanje je prekidano kada se dostigne nivo degradacije 5–20%. Uzorci su analizirani primenom validirane HPLC metode, pod uslovima opisanim u delu 3.7.1 *Hromatografski uslovi*, uz upotrebu PDA detektora koji je omogućio praćenje čistoće hromatografskih pikova, kao i upotrebu MS detektora koji je omogućio dodatnu identifikaciju nastalih degradacionih proizvoda.

Sumarni rezultati studije forsirane degradacije farmaceutski aktivne supstance zolpidem-tartarata su prikazani u tabeli 19.

Tabela 19. Sumarni rezultati studije forsirane degradacije farmaceutski aktivne supstance zolpidem-tartarata

Pik (RRt)	Uslovi					
	Rastvor-1M HCl na 70 °C posle 48h	Rastvor-0.1M NaOH na 70 °C posle 24h	Rastvor-70 °C posle 8 dana	Rastvor-10% H ₂ O ₂ na 40 °C posle 8 dana	Rastvor-Svetlost prema ICH	Čvrst oblik-Svetlost prema ICH
I (0.80)	/	/	/	0.15%	/	/
II (0.85)	/	/	/	0.30%	/	/
III (0.90)	8.2 %	13.8%	/	/	/	/
Zolpidem (1)	91.8%	86.2%	100%	98.7%	90.6%	99.4%
IV (1.23)	/	/	/	/	0.70%	/
V (1.28)	/	/	/	/	0.56%	/
VI (1.32)	/	/	/	0.03%	1.7%	/
VII (2.07)	/	/	/	0.44%	1.6%	0.4%
VIII (3.38)	/	/	/	0.13%	3.9%	/

RRt – relativno retenciono vreme

Pikovi su obeleženi oznakama I–VIII prema redosledu eluiranja sa kolone.

Tokom ispitivanja za sve stresirane uzorke je praćeno očuvanje ravnoteže mase (eng. *mass balance*) da bi se osiguralo da su detektovani svi proizvodi degradacije. Ravnoteža mase izražena u procentima se računa kao zbir procentualne zastupljenosti nedegradirane supstance i procentualne zastupljenosti svih degradacionih proizvoda u stresiranom uzorku. Ovaj zbir treba, u idealnom slučaju, da bude što bliži vrednosti od 100%, jer su tada detektovani svi proizvodi degradacije, odnosno nije došlo do gubitka mase tokom ispitivanja uzoraka. U slučaju ovog istraživanja vrednost ravnoteže masa za sve uzorke je bila veća od 99%, što ukazuje na pogodnost upotrebljene metode, koja je omogućila detektovanje svih nastalih proizvoda degradacije.

4.4.1. Optimizacija uslova na masenom detektoru

S obzirom da je odlučeno da će se u studiji forsirane degradacije koristiti maseni detektor bilo je neophodno optimizovati uslove pod kojima će se ispitivanje odvijati. Prvo je bilo neophodno odrediti koji tip jonskog izvora pokazuje bolje rezultate prilikom analiziranja ispitivanih uzoraka. Vršeno je poređenje rezultata korišćenjem ESI i APCI jonskog izvora. Zaključeno je da se korišćenjem oba jonska izvora dobijaju identični fragmenti, da je osetljivost nešto bolja primenom APCI, ali da je izgled hromatograma znatno bolji korišćenjem ESI (primenom APCI se dobijaju pikovi sa lošom simetrijom), čime je omogućena bolja integracija i bolja preciznost metode, pa je u daljem istraživanju korišćen ESI.

Imajući u vidu da je primenjena HPLC metoda podrazumevala upotrebu mobilne faze sa kiselim svojstvima (pH 5,4), a ispitivane supstance su imale izražene bazne osobine, u samoj mobilnoj fazi je bilo favorizovano nastajanje pozitivnih molekulskih jona uzorka, pa je ispitivanje na masenom detektoru vršeno analiziranjem pozitivnih jona.

Na kvadrupolnom masenom analizatoru optimizacija je vršena upotrebom FIA metode (eng. *flow injection analysis*, FIA). Optimizacija je sprovedena ponovljenim injiciranjem u maseni detektor po 20 μL pojedinačnih rastvora zolpidem-tartarata i svih degradacionih proizvoda (koncentracija 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$) u struji mobilne faze, bez upotrebe hromatografske kolone, pri čemu su sukcesivno menjani parametri masenog detektora. Na ovaj način su optimizovani sledeći parametri: protok gasa za sušenje, temperatura gasa za sušenje, pritisak gasa za raspršivanje, napon na kapilari i napon ubrzanja. Kao gas za raspršivanje i sušenje je korišćen azot. Ispostavilo se da je za dobijanje reprezentativnih masenih spektara i adekvatnih hromatograma potrebno primeniti visok napon ubrzanja od 240 V za zolpidem-tartarat, zolpacid, oksozolpidem i zolpaldehid, ali da se na tom naponu zolpiridin fragmentiše u potpunosti i da nije moguće detektovati njegov molekulski jon. Zbog toga je za njegovu identifikaciju potrebno primeniti niži napon ubrzanja od 170 V. Drugim rečima, da bi se omogućila potpuna i nedvosmislena identifikacija svih dobijenih degradacionih proizvoda skeniranje na masenom detektoru je potrebno vršiti na dva napona ubrzanja od 170 V i 240 V.

Za identifikaciju nepoznatih degradacionih proizvoda za koje nisu bile dostupne standardne supstance korišćen je maseni detektor sa jonskim trapom. Uslovi na ovom

detektoru su optimizovani rastvorom zolpidem-tartarata koncentracije $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Rastvor je uz pomoć šprica direktno injiciran u maseni detektor pri protoku mobilne faze od $5 \mu\text{l min}^{-1}$. Optimizovani su sledeći parametri: protok gasa za sušenje, temperatura kapilare, protok gasa za raspršivanje i napon na kapilari. Kao gas za raspršivanje i sušenje je korišćen azot, dok se kao kolizionni gas unutar jonskog trapa koristio helijum.

Optimalni uslovi na kvadrupolnom masenom analizatoru i masenom detektoru sa jonskim trapom su prikazani u delu 3.7.1. *Hromatografski uslovi*.

4.4.2. Hidroliza u neutralnoj sredini i termalna degradacija

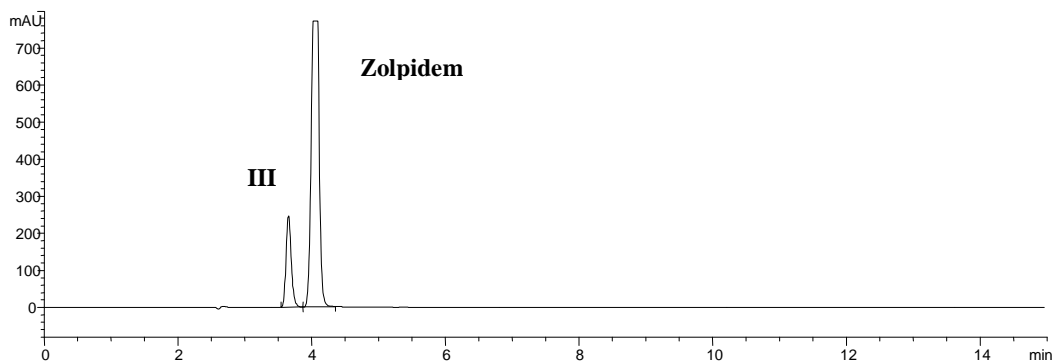
Ispitivanje hidrolize u neutralnoj sredini vršeno je sa farmaceutski aktivnom supstancom zolpidem-tartaratom u vodenom rastvoru. Ispitivanje je uporedo vršeno na sobnoj temperaturi i na povišenoj temperaturi od $70 \text{ }^\circ\text{C}$. U svakoj vremenskoj tački u hromatografski sistem je injiciran standardni rastvor, stresirani uzorak, kontrolni uzorak u vremenu nula i slepa proba. Ni nakon 8 dana uzorak nije pokazao znakove degradacije hidrolizom u neutralnoj sredini na sobnoj temperaturi, ali ni na temperaturi od $70 \text{ }^\circ\text{C}$.

Termalna degradacija je ispitivana na farmaceutski aktivnoj supstanci zolpidem-tartaratu u čvrstom obliku i na farmaceutskom doziranom obliku film-tabletama. Grejanjem na povišenoj temperaturi od $70 \text{ }^\circ\text{C}$ ni posle 21 dan uzorci nisu pokazali znakove degradacije. U svakoj vremenskoj tački su analizirani standardni rastvor, stresirani uzorak, kontrolni uzorak u vremenu nula i slepa proba.

4.4.3. Hidroliza u kiseljoj sredini

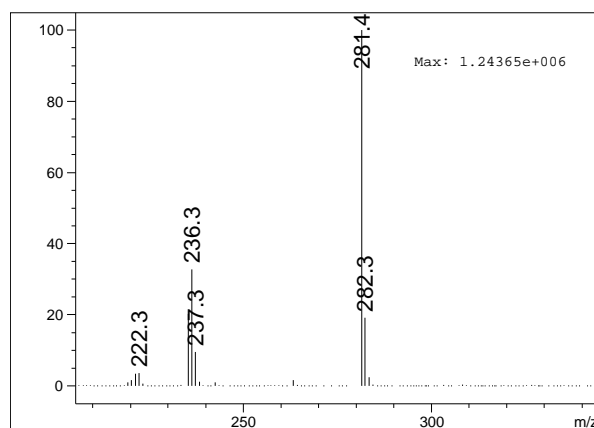
Ispitivanje hidrolize u kiseljoj sredini vršeno je sa farmaceutski aktivnom supstancom zolpidem-tartaratom u rastvoru. Prvo je ispitivanje vršeno sa $0,1 \text{ M}$ hlorovodoničnom kiselinom, ali pošto nije došlo do značajnije razgradnje posle 8 dana, koncentracija hlorovodonične kiseline je povećana na 1 M . Ispitivanje je uporedo vršeno na sobnoj temperaturi i na povišenoj temperaturi od $70 \text{ }^\circ\text{C}$. U svakoj vremenskoj tački su analizirani standardni rastvor, stresirani uzorak, kontrolni uzorak u vremenu nula i slepa proba.

Na sobnoj temperaturi znaci degradacije se pojavljuju tek posle 8 dana, pri čemu se na hromatogramu pojavljuje jedan mali pik, obeležen kao pik III na relativnom retencionom vremenu (RRt) od 0,9 u količini 0,15%. Međutim, primenom povišene temperature od 70 °C degradacija se pojavljuje već posle 1 sata (pik na RRt 0,9 u količini 0,11%), a zatim tokom vremena degradacija nastavlja da raste i dostiže 8% posle 48 sati, čime je dokazano da povišena temperatura stimuliše hidrolizu u kiseljoj sredini. Hromatogram uzorka koji je podvrgnut kiseljoj hidrolizi je prikazan na slici 25.



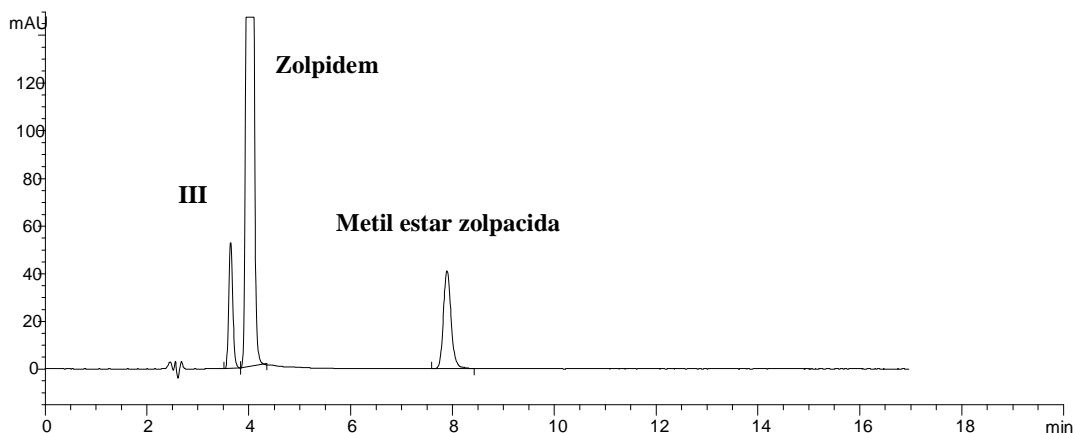
Slika 25. Hromatogram stresiranog uzorka rastvora zolpidem-tartarata tretiranog 1 M rastvorom hlorovodonične kiseline na temperaturi od 70 °C tokom 48 sati

Nastali pik III na RRt 0,9 je imao isti UV-spektar i RRt kao zolpacid. Identifikacija ovog pika je potvrđena snimanjem masenog spektra koji je pokazao prisustvo molekulskog jona (MH^+) na m/z 281 i fragmentnih jona m/z 236 i 222 (slika 26), čime je dokazano da je zolpacid glavni proizvod hidrolize zolpidem-tartarata u kiseljoj sredini.



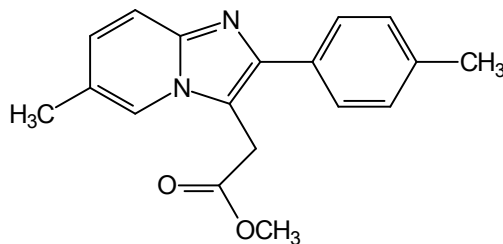
Slika 26. ESI maseni spektar zolpacida dobijen na kvadrupolnom masenom analizatoru pri naponu ubrzanja od 240V

Tokom ispitivanja hidrolize u kiseljoj sredini utvrđeno je da ukoliko se metanol koristi kao rastvarač dolazi do njegove interferencije sa zolpacidom pri čemu nastaje novi proizvod metil estar zolpacida, koji se pojavljuje kao novi pik na hromatogramu (slika 27).

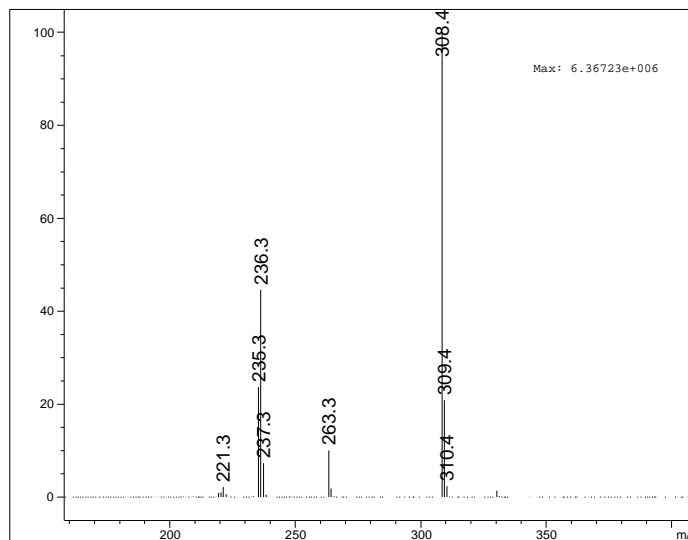


Slika 27. Hromatogram stresiranog uzorka rastvora zolpidem-tartarata tretiranog 1 M rastvorom hlorovodonične kiseline na temperaturi od 70 °C tokom 48 sati, kada se kao rastvarač koristi metanol.

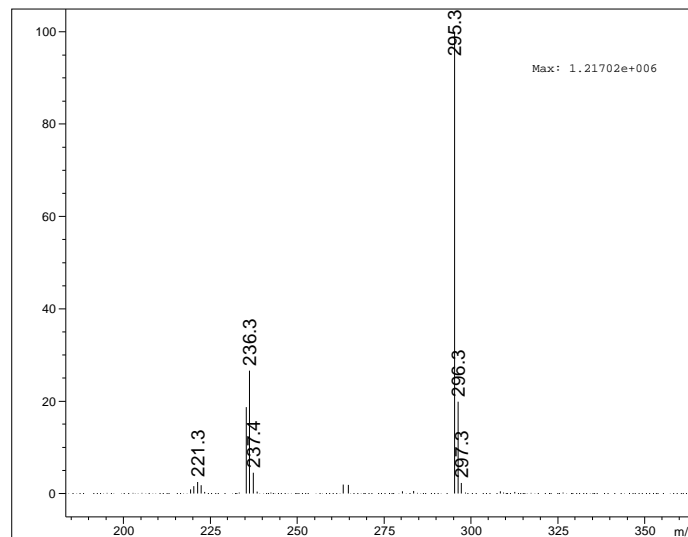
Identitet nastalog proizvoda je potvrđen snimanjem masenog spektra koji pokazuje protonovani molekulski jon (MH^+) na m/z 295, što odgovara molekulskoj masi i strukturi metil estra zolpacida (slika 28) i identične fragmentne jone kao zolpidem-tartarat na m/z 263, 236 i 221 (slika 29 i 30).



Slika 28. Hemijska struktura metil estra zolpacida koji nastaje kao proizvod interferencije metanola i zolpacida



Slika 29. ESI maseni spektar zolpidem-tartarata dobijen na kvadrupolnom masenom analizatoru pri naponu ubrzanja od 240V



Slika 30. ESI maseni spektar metil estra zolpacida dobijen na kvadrupolnom masenom analizatoru pri naponu ubrzanja od 240V

Da nastali metil estar zolpacida nije degradacioni proizvod zolpidem-tartarata, već posledica interferencije metanola, kao rastvarača sa zolpacidom je dokazano na taj način što se umesto metanola kao rastvarač koristio acetonitril i u tom slučaju na hromatogramu se nije pojavljivao pik od metil estra zolpacida, već samo od zolpacida (slika 25).

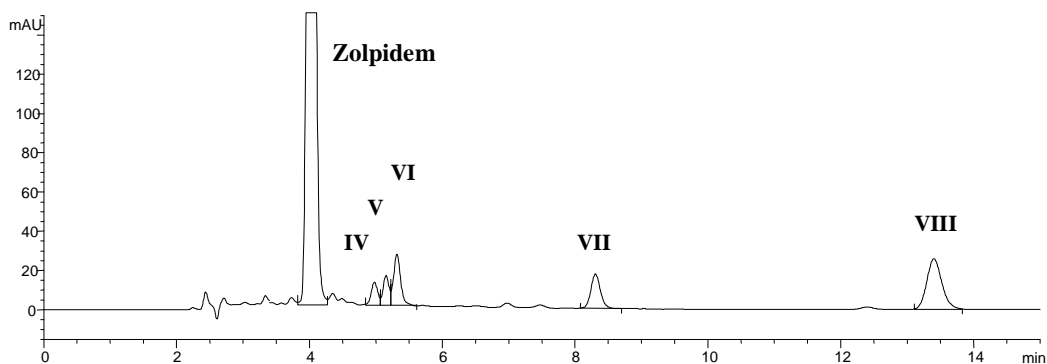
4.4.4. Hidroliza u baznoj sredini

Ispitivanje hidrolize u baznoj sredini vršeno je sa farmaceutski aktivnom supstancom zolpidem-tartaratom u rastvoru. Ispitivanje vršeno sa 0,1 M natrijum hidroksidom na sobnoj temperaturi i na povišenoj temperaturi od 70 °C. U svakoj vremenskoj tački su analizirani standardni rastvor, stresirani uzorak, kontrolni uzorak u vremenu nula i slepa proba.

Na sobnoj temperaturi degradacija ide lagano i posle 8 dana degradira se svega 2,1% aktivne supstance. Povišena temperatura ubrzava degradaciju, pa na 70 °C već posle 4 sata nastaje degradacija od 2,7%, a posle 24 sata od 13,8%. Na hromatogramu se pojavljuje isti pik III na RRt 0,9, kao kod hidrolize u kiseljoj sredini (slika 25), koji je uz pomoć masenog detektora takođe identifikovan kao zolpacid (slika 26).

4.4.5. Fotodegradacija

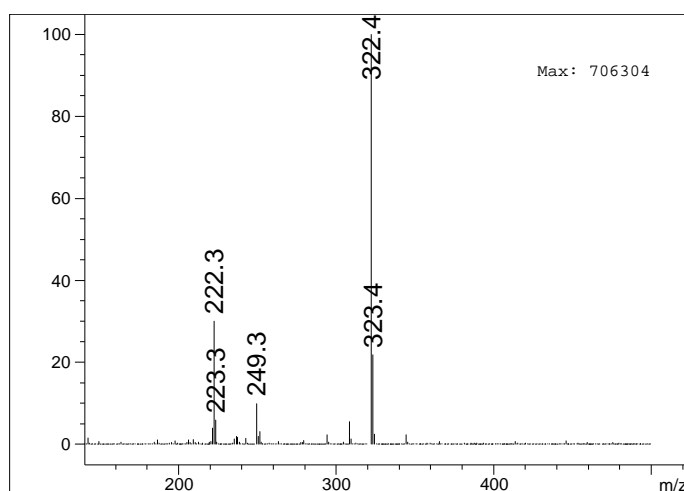
Ispitivanja fotodegradacije farmaceutski aktivne supstance zolpidem-tartarata i farmaceutskog doziranog oblika film-tableta u čvrstom obliku nisu pokazala značajnu degradaciju. Sa druge strane, farmaceutski aktivna supstanca zolpidem-tartarat u rastvoru je pokazao značajnu degradaciju pod uticajem svetlosti. Pod ICH uslovima supstanca se degradirala više od 10% u komori za ispitivanje fotostabilnosti. Ova degradacija je rezultirala formiranjem većeg broja manjih pikova na hromatogramu (slika 31).



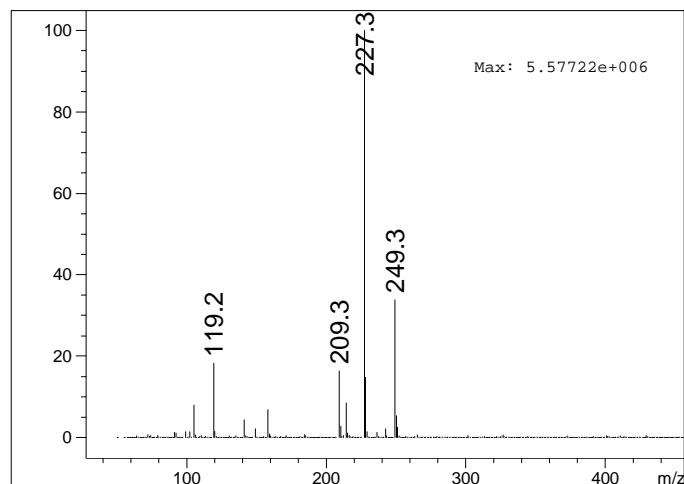
Slika 31. Hromatogram stresiranog uzorka rastvora zolpidem-tartarata tretiranog prema ICH smernicama za ispitivanje fotostabilnosti

Uporedo sa stresiranim uzorcima analizirani su standardni rastvor, tamna kontrola, kontrolni uzorak u vremenu nula i slepa proba. Prema kriterijumima opisanim u tabeli 4 pikovi na RRt 1.32, 2.07 i 3.38 (pikovi VI, VII i VIII) su procenjeni kao ključni degradacioni proizvodi. RRt, UV i maseni spektri ovih pikova su se poklapali sa pikovima oksozolpidema (pik VI), zolpiridina (pik VII) i zolpaldehida (pik VIII) sa hromatograma standardnog rastvora.

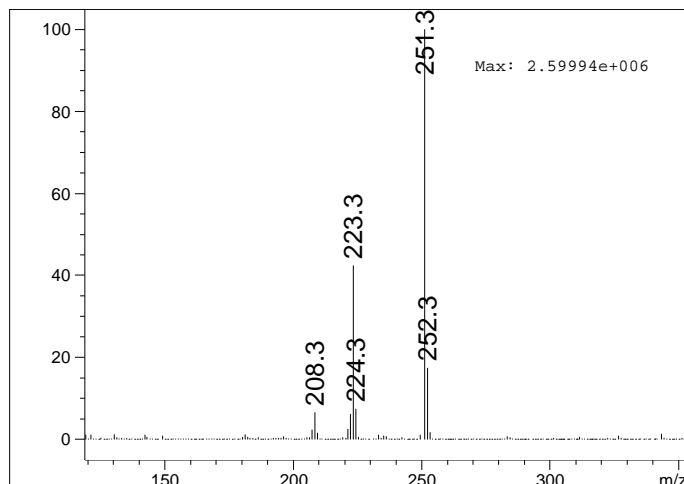
Maseni spektri oksozolpidema (protonovani molekularni jon MH^+ na m/z 322), zolpiridina (protonovani molekularni jon MH^+ na m/z 227) i zolpaldehida (protonovani molekularni jon MH^+ na m/z 251) su prikazani na slikama 32, 33 i 34.



Slika 32. ESI maseni spektar oksozolpidema dobijen na kvadrupolnom masenom analizatoru pri naponu ubrzanja od 240V



Slika 33. ESI maseni spektar zolpiridina dobijen na kvadrupolnom masenom analizatoru pri naponu ubrzanja od 170V



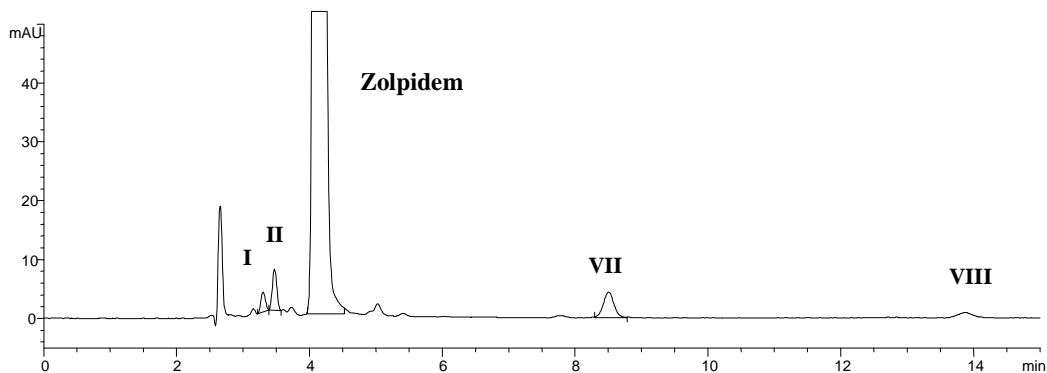
Slika 34. ESI maseni spektar zolpaldehida dobijen na kvadrupolnom masenom analizatoru pri naponu ubrzanja od 240V

LC-MSⁿ analiza je sprovedena na masenom detektoru sa jonskim trapom za pikove IV i V. Pik IV je pokazao protonovani molekulski jon (MH⁺) na m/z 298 sa fragmentima na m/z 253 i 190, dok je pik V imao protonovani molekulski jon (MH⁺) 324 sa fragmentima na m/z 251 i 223. S obzirom da su ovi pikovi bili prisutni u stresiranim uzorcima u količini koja je manja od 10% od ukupne degradacije, prema kriterijumima iz tabele 4. je procenjeno da oni nisu značajni i njihova dalja karakterizacija nije rađena.

4.4.6 Oksidativna degradacija

Preliminarna ispitivanja oksidativne degradacije su rađena sa koncentracijama vodonik peroksida od 0,3% i 3% kako je predloženo u literaturi [40,41,44], ali to nije dovelo do degradacije. Povećanjem koncentracije vodonik peroksida na 10% došlo je do blage degradacije od 1,2% na 40 °C posle 8 dana, čime je dokazano da je zolpidem-tartarat otporan na oksidativnu degradaciju.

Nekoliko malih pikova se moglo primetiti na hromatogramu. Iako dalja identifikacija ovih pikova nije bila neophodna zbog male degradacije ispod 5%, snimljeni su UV i maseni spektri ovih pikova. Identifikovani su zolpiridin (pik VII) i zolpaldehid (pik VIII) i dva nepoznata pika na RRt 0.80 i 0.85 (pikovi I i II), kao što je prikazano na slici 35.



(a)

Slika 35. Hromatogram stresiranog uzorka rastvora zolpidem-tartarata tretiranog 10% vodonik peroksidom na 40 °C posle 8 dana

UV-spektri pikova I i II su veoma slični spektru zolpidem-tartarata, što ukazuje na održanu osnovnu strukturu molekula zolpidem-tartarata. S obzirom da su pikovi nastali u oksidacionim uslovima, pretpostavka je bila da su ovi degradacioni proizvodi nastali vezivanjem kiseonika za osnovnu strukturu zolpidem-tartarata. Pretpostavka je potvrđena kada su snimljeni LC-MS spektri. Maseni spektri ovih pikova su pokazali protonovani molekulski jon (MH^+) na m/z 324 i fragmentne jone na m/z 279 i 252 sa razlikom od 16 više u odnosu na odgovarajuće jone zolpidem-tartarata (protonovani molekulski jon (MH^+) na m/z 308 i fragmenti na m/z 263 i 236), dokazujući sličan način fragmentacije i vezivanje kiseonika. LC-MSⁿ analiza je pokazala da dalja fragmentacija vodi formiranju fragmenata na m/z 236 i 223, koji su identični fragmentima zolpidema. Ovi fragmenti su rezultat odvajanja bočnih grupa u molekulu zolpidema, čime je dokazana stabilnost imidazopiridinskog prstena.

Postoji nekoliko mesta na kojima se može vezati kiseonik. Piridin ima mogućnost oksidacije u prisustvu vodonik peroksida, pri čemu nastaje N-oksid. Bočne metil grupe se takođe mogu oksidovati do metoksi grupa. Imajući u vidu da ovi pikovi nisu značajni degradacioni proizvodi njihova tačna hemijska struktura nije određivana.

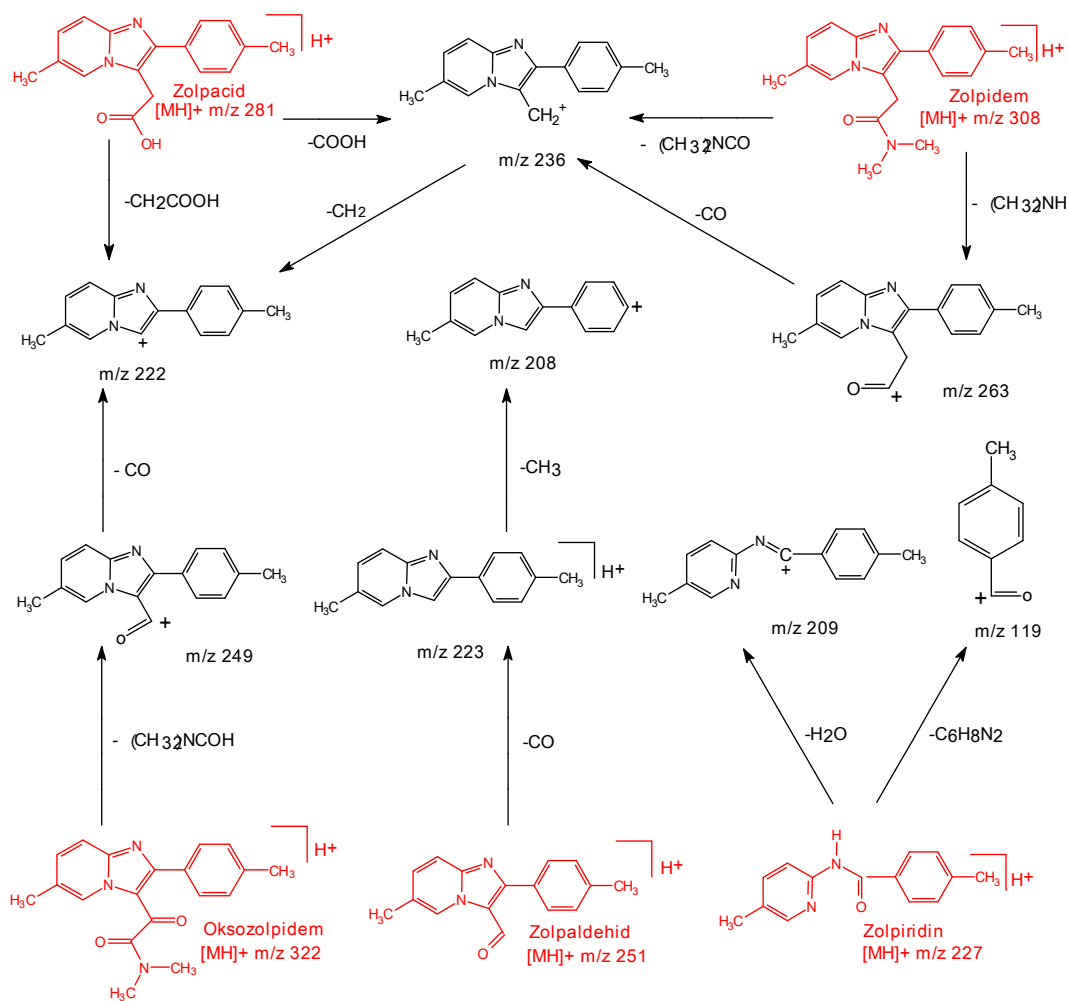
4.4.7. Fragmentacija zolpidem-tartarata i ključnih degradacionih proizvoda

Prisustvo sličnih fragmentnih jona u masenim spektrima zolpidem-tartarata i ključnih degradacionih proizvoda, kao što je prikazano u tabeli 20, ukazuje na sličnu strukturu i način fragmentacije (slika 36).

Tabela 20. Protonovani molekularni joni (MH^+) i glavni fragmentni joni zolpidem-tartarata i ključnih degradacionih proizvoda sa odgovarajućim molekulskim masama

Supstanca (RRt)	Molekulska masa	Protonovani molekularni jon (m/z)	Glavni fragmentni joni (m/z)	Napon ubrzanja
Zolpacid (0.90)	280	281	236 i 222	240 V
Zolpidem (1)	307	308	263 i 236	240 V
Oksozolpidem (1.32)	321	322	249 i 222	240 V
Zolpiridin (2.07)	250	251	223 i 208	170 V
Zolpaldehid (3.38)	226	227	209 i 119	240 V

RRt – relativno retenciono vreme



Slika 36. Način fragmentacije zolpidema i ključnih degradacionih proizvoda

Većina ključnih degradacionih proizvoda ima istu osnovnu strukturu kao zolpidem-tartarat u formi imidazopiridinskog prstena. Ova struktura je veoma stabilna prema fragmentaciji, pa nastali fragmentni joni nisu proizvod fragmentacije imidazopiridinskog prstena, već cepanja bočnih grupa u molekulu. Fragmentacija zolpidema počinje cepanjem bočne tercijalne amidne grupe (m/z 263), nastavlja se eliminacijom bočne karbonilne grupe (m/z 236) i završava odvajanjem preostale metil grupe (m/z 222). Sličan način fragmentacije je predložen i za degradacione proizvode, kako je prikazano na slici 36.

4.4.8. Predloženi put degradacije za zolpidem tartarat

Degradacija zolpidem-tartarata rezultira u formiranju četiri ključna degradaciona proizvoda: zolpacida, oksozolpidema, zolpiridina i zolpaldehida.

Amidna grupa u bočnom položaju strukture zolpidema je podložna hidrolizi u kiseljoj i baznoj sredini, pri čemu nastaje karboksilna kiselina i amin. Amidi su stabilniji od odgovarajućih estara, jer je $-NR_2$ grupa stabilnija od $-OR$ grupe estara. Zbog toga sama voda nije dovoljna da amidi hidrolizuju u značajnom procentu. Produženo zagrevanje stimuliše hidrolizu zolpidema u kiseljoj i baznoj sredini, pri čemu nastaje zolpacid [40].

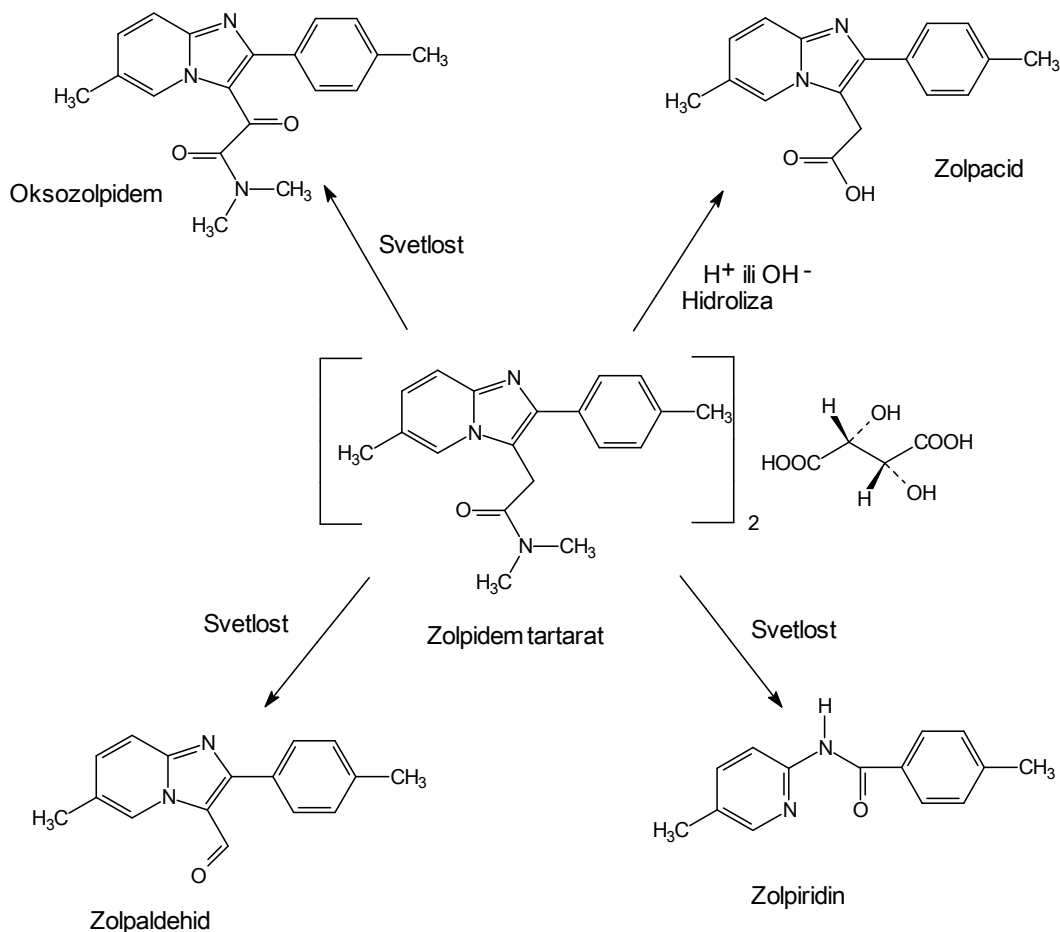
Svetlost inicira i ubrzava oksidativnu degradaciju lekova. Iz tog razloga isti degradacioni proizvodi nastaju tokom oksidacije i fotodegradacije zolpidema, ali veća količina degradacionih proizvoda nastaje pod dejstvom svetlosti [44].

Enamin u imidazopiridinskom prstenu može da stupi u fotoreakciju sa atomom kiseonika, koji nastaje fotoaktivacijom molekula kiseonika [40], što može da bude objašnjenje za nastanak zolpiridina posle izlaganja rastvora zolpidema intenzivnoj svetlosti.

Benzil grupe mogu da se autooksiduju, jer tom prilikom nastaje stabilan benzil radikal koji nastaje iz benzil hidrogena. Benzil radikal se rezonantno stabiluje uz pomoć elektrona iz benzenovog prstena. Zbog toga svaka metin ili metilen grupa, koja je podložna sp^3 hibridizaciji i koja je vezana za aril grupu ili grupu koja može da stupi u konjugaciju, predstavlja moguće mesto na kojem će doći do autooksidacije [40]. Ovaj mehanizam objašnjava nastanak oksozolpidema oksidacijom CH_2 grupe u položaju 2

bočne acetamidne strukture. Zolpaldehid nastaje cepanjem veze između dve CO grupe u oksozolpidemu.

Predloženi put degradacije zolpidem-tartarata je prikazan na slici 37.



Slika 37. Predloženi put degradacije zolpidem-tartarata

4.5. RAZVOJ I OPTIMIZACIJA *STABILITY-INDICATING* METODE ZA ZOLPIDEM-TARTARAT

Studija forsirane degradacije je imala za cilj pronalaženje novonastalih ključnih degradacionih proizvoda zolpidem-tartarata i razvijanje nove metode za praćenje stabilnosti (eng. *stability-indicating method*) farmaceutski aktivne supstance zolpidem-tartarata i njegovog odgovarajućeg farmaceutskog doziranog oblika film-tableta. S obzirom da forsiranom degradacijom nisu pronađeni novi degradacioni proizvodi,

stability-indicating metoda nije morala da se prilagođava radu sa masenim detektorom, pa je selektivnost metode mogla da se ispituje u širem opsegu pH vrednosti u odnosu na metodu koja je prethodno razvijena (v. poglavlje 4.1). Takođe, cilj je bio da se razvije metoda koja će biti robusnija i brža u odnosu na prethodno razvijenu metodu, pa samim tim i podesnija za upotrebu u rutinskoj analizi. Preliminarna ispitivanja i prethodna iskustva sa razvojem metode i hromatografskim osobinama ispitivanih supstanci su doprinela odluci da se razvoj *stability-indicating* metode vrši korišćenjem eksperimentalnog dizajna i metodologije multikriterijumskog odlučivanja. Kao *screening* dizajn je korišćen frakcioni faktorski dizajn, a kao optimizacioni pun faktorski dizajn.

4.5.1. Primena frakcionog faktorskog dizajna u screening fazi

Preliminarna ispitivanja su pokazala da su temperatura kolone i sastav mobilne faze u smislu procentualnog udela metanola u mobilnoj fazi, pH mobilne faze i koncentracije amonijum-acetata u mobilnoj fazi faktori koji u najvećoj meri mogu da utiču na hromatografsko ponašanje zolpidem-tartarata i njegovih ključnih degradacionih proizvoda, pa su ovi faktori uključeni u 2^{4-1} frakcioni faktorski dizajn. Ispitivani faktori i njihovi nivoi, odnosno opsezi u kojima su analizirani su prikazani u tabeli 21.

Tabela 21. Faktori i njihovi nivoi ispitivani u 2^{4-1} frakcionom faktorskom dizajnu

Faktori	Ispitivani nivoi		
	Niži nivo -1	Centralna tačka 0	Viši nivo +1
(A) Metanol u mobilnoj fazi (%)	60	70	80
(B) pH vrednost mobilne faze	4	6	8
(C) Temperatura kolone (°C)	25	35	45
(D) Koncentracija amonijum acetata u mobilnoj fazi (mM)	0	5	10

Nivoi za svaki od ispitivanih faktora su izabrani tokom preliminarnih ispitivanja. Ukupno je izvedeno 8 eksperimenata uz dodatna 4 ponavljanja u nultoj tački da bi se izračunala standardna greška. Plan eksperimenata za 2^{4-1} frakcioni faktorski dizajn je prikazan u tabeli 22.

Tabela 22. Plan eksperimenata za 2^{4-1} frakcioni faktorski dizajn

№	Faktor			
	A	B	C	D
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
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0
12	0	0	0	0

A – Metanol u mobilnoj fazi (%); B – pH vrednost mobilne faze; C – Temperatura kolone (°C);
D – Koncentracija amonijum-acetata u mobilnoj fazi (mM)

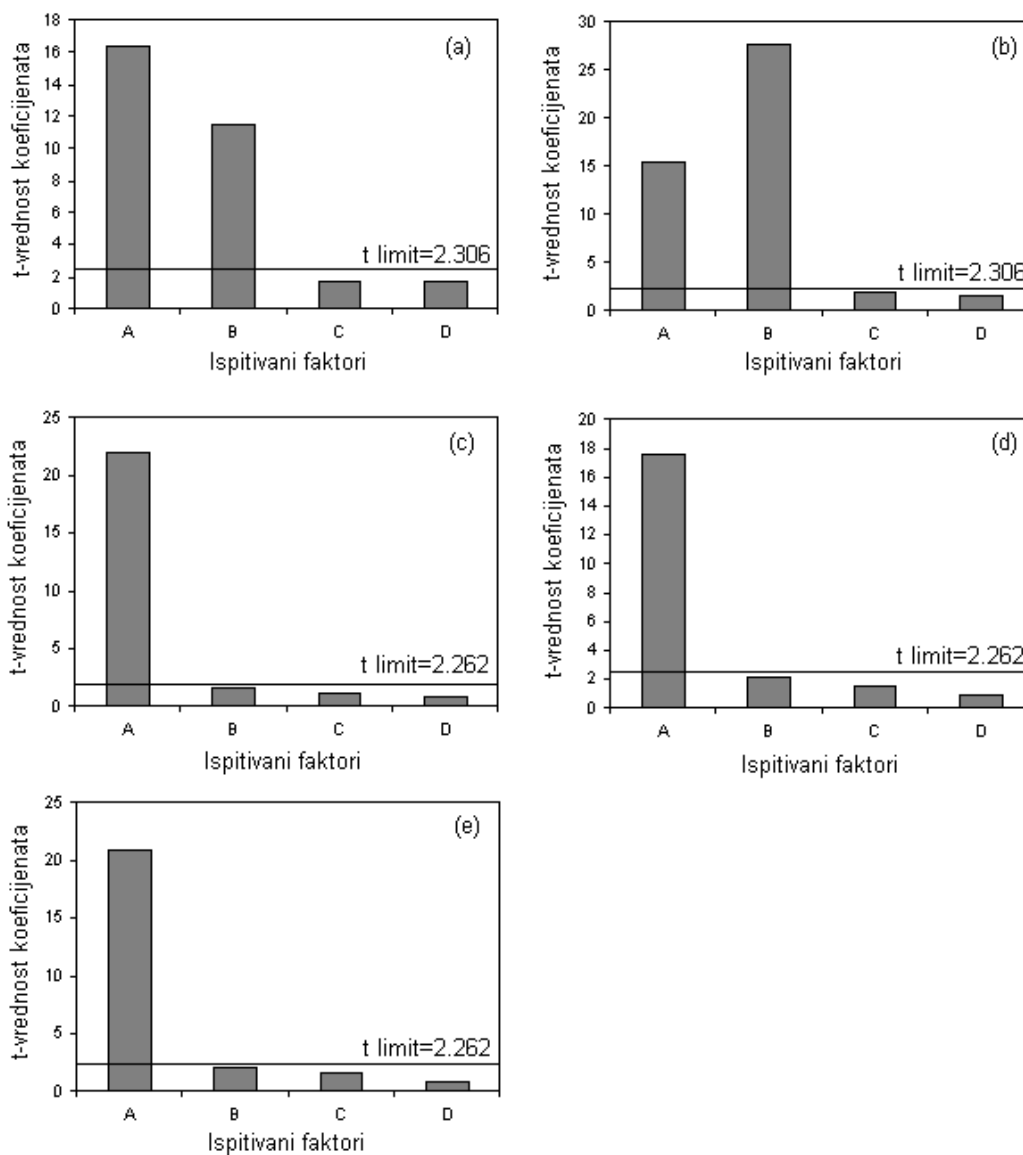
Eksperimenti su izvođeni nasumično, odnosno randomizirano i bez ponavljanja. Odgovor sistema koji se pratio u 2^{4-1} frakcionom faktorskom dizajnu je bio retencioni faktor ispitivanih komponenti. Dobijene vrednosti su prikazane u tabeli 23.

Tabela 23. Retencioni faktori dobijeni 2^{4-1} frakcionim faktorskim dizajnom

№	Retencioni faktori (<i>k</i>)				
	Zolpacid	Zolpidem tartarat	Oksozolpidem	Zolpiridin	Zolpaldehid
1	0.76	0.54	2.99	5.62	12.98
2	0.28	0.25	0.89	1.49	2.64
3	2.16	5.81	4.13	8.93	19.72
4	0.50	1.17	0.97	1.71	2.97
5	0.70	0.46	3.05	5.50	12.19
6	0.24	0.23	0.83	1.35	2.37
7	1.58	4.45	3.31	6.73	13.68
8	0.53	1.03	0.88	1.47	2.42
9	0.71	1.29	1.54	2.95	5.47
10	0.70	1.28	1.57	2.94	5.45
11	0.72	1.30	1.59	2.90	5.44
12	0.73	1.30	1.54	2.94	5.40

Svi podaci su analizirani upotrebom statističkog softvera Design-Expert 7.0.0. Tom prilikom su, uz pomoć višestruke linearne regresione analize, izračunati koeficijenti matematičkih modela za sve dobijene retencione faktore ispitivanih

supstanci. Značajnost dobijenih koeficijenata, a samim tim i odgovarajućih faktora procenjena je Studentovim t -testom. Za svaki od koeficijenata modela izračunata je t -vrednost i upoređena sa kritičnom tabelatnom t -vrednošću. Koeficijenti, odnosno faktori čija je izračunata t -vrednost veća od tabelarne t -vrednosti smatraju se statistički značajnim. Radi vizuelizacije i bolje prezentacije, izračunate t -vrednosti su prikazane grafički u vidu Pareto dijagrama (slika 38.).



Slika 38. Pareto dijagrami izračunatih t -vrednosti za koeficijente matematičkih modela retencionih faktora zolpacida (a), zolpidema (b), oksozolpidema (c), zolpiridina (d) i zolpaldehida (e), gde je A – metanol u mobilnoj fazi (%); B – pH vrednost mobilne faze; C – temperatura kolone ($^{\circ}\text{C}$); D – koncentracija amonijum-acetata u mobilnoj fazi (mM)

Faktori čije izračunate t -vrednosti prelaze odgovarajući limit, odnosno kritičnu tabelatnu t -vrednost, koja je na slici 38 predstavljena kao t_{limit} , smatraju se statistički značajnim, što znači da imaju značajan uticaj na hromatografsko ponašanje ispitivanih supstanci. Sa Pareto dijagrama se vidi da procenat metanola u mobilnoj fazi značajno utiče na retencije svih ispitivanih supstanci, dok pH mobilne faze utiče na zolpacid i zolpidem. Zbog toga su ova dva faktora dalje detaljno ispitivana i optimizovana u optimizacionom dizajnu.

Sa druge strane, temperatura kolone i koncentracija amonijum-acetata u mobilnoj fazi ne utiču značajno na retencije ispitivanih supstanci, pa je odlučeno da se u daljim eksperimentima ovi faktori održavaju na konstantnim vrednostima. Odlučeno je da se koristi koncentracija amonijum-acetata od 10 mM i temperatura kolone od 35 °C, zbog bolje simetrije pikova. Dalje povećavanje temperature skraćuje trajanje kolone. Tokom eksperimenata protok mobilne faze je održavan na konstantnom nivou od 1 mL min⁻¹.

4.5.2. Primena punog faktorskog dizajna u optimizacionoj fazi

Za optimizaciju faktora koji su pokazali statistički značajan uticaj na hromatografsko ponašanje ispitivanih supstanci, a to su procenat metanola u mobilnoj fazi i pH mobilne faze, primenjen je 3² pun faktorski dizajn i metodologija površine odgovora. Pun faktorski dizajn je izabran, jer se za dva ispitivana faktora na tri nivoa zahteva izvođenje manjeg broja eksperimenata u odnosu na centralni kompozicioni dizajn.

Svi eksperimenti su izvođeni nasumično, odnosno randomizirano i bez ponavljanja da bi se smanjio efekat nekontrolisanih promenljivih koji može da poveća eksperimentalnu grešku određivanja [37]. Ponavljanja su vršena isključivo u centralnoj tački i to 4 puta, tako da je ukupan broj izvedenih eksperimenata bio 13.

Nivoi ispitivanih faktora (procenat metanola i pH mobilne faze), odnosno opsezi u kojima su analizirani su identični onima korišćenim u *screening* dizajnu (tabela 21), a plan eksperimenata za 3² pun faktorski dizajn je prikazan u tabeli 24.

Tabela 24. Plan eksperimenata za 3^2 pun faktorski dizajn

№	Faktori	
	Metanol (%)	pH
1	60	4
2	70	4
3	80	4
4	60	6
5	70	6
6	80	6
7	60	8
8	70	8
9	80	8
10	70	6
11	70	6
12	70	6
13	70	6

U cilju prikupljanja što većeg broja informacija praćeno je nekoliko odgovora sistema: rezolucija između kritičnih pikova i retencioni faktori ispitivanih supstanci sa najkraćim i najdužim retencionim vremenom. Dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 25.

Tabela 25. Odgovori hromatografskog sistema dobijeni u 3^2 punom faktorskom dizajnu

№	Retencioni faktori (<i>k</i>)			Rezolucija	
	Zolpacid	Zolpidem tartarat	Zolpaldehid	$R_{1/2}$	$R_{2/3}$
1	0.45	0.23	11.71	3.96	26.61
2	0.14	0	3.63	2.72	15.60
3	0.03	0	1.87	1.86	10.61
4	0.84	2.53	12.17	17.12	0
5	0.43	1.05	4.39	9.24	0
6	0.25	0.45	1.71	3.71	0
7	1.71	4.63	14.37	19.91	9.16
8	0.51	1.42	4.61	12.22	3.47
9	0.30	0.59	2.10	7.80	2.64
10	0.64	1.32	4.95	9.01	0
11	0.44	1.15	4.68	9.15	0
12	0.43	1.05	4.39	9.26	0.2
13	0.40	1.21	4.54	9.54	0.1

$R_{1/2}$ – rezolucija između zolpacida i zolpidem-tartarata, $R_{2/3}$ – rezolucija između zolpidem-tartarata i oksozolpidema

Uz pomoć višestruke regresione analize definisana je veza između kodiranih faktora i ispitivanih odgovora sistema, koja se najbolje može opisati sledećim matematičkim modelima, odnosno polinomima:

$$\text{Sqrt}(k_{\text{zolphacid}}) = 0.650 - 0.310x_1 + 0.320x_2 - 0.022x_1x_2 + 0.150x_1^2 - 0.200x_2^2 \quad (18)$$

$$\text{Sqrt}(k_{\text{zolphidem}}) = 1.050 - 0.460x_1 + 0.610x_2 - 0.230x_1x_2 + 0.150x_1^2 - 0.380x_2^2 \quad (19)$$

$$k_{\text{zolphaldehyde}} = 4.450 - 5.430x_1 + 0.650x_2 - 0.610x_1x_2 + 2.850x_1^2 + 0.033x_2^2 \quad (20)$$

$$R_{1/2} = 8.600 - 3.980x_1 + 5.230x_2 - 2.500x_1x_2 \quad (21)$$

$$\ln(R_{2/3}) = -2.020 - 0.360x_1 - 0.650x_2 - 0.046x_1x_2 - 0.084x_1^2 + 4.230x_2^2 \quad (22)$$

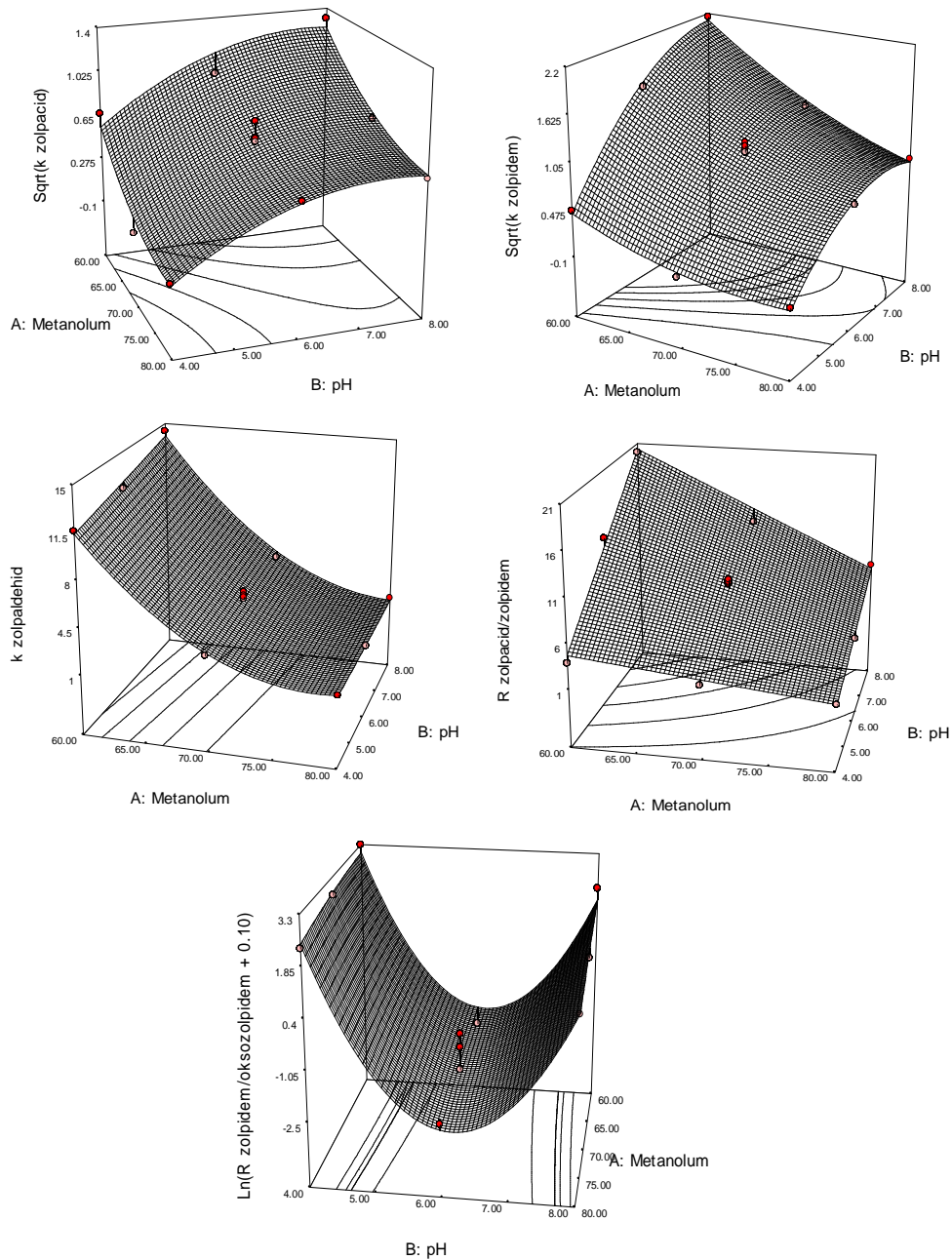
gde su $\text{Sqrt}(k_{\text{zolphacid}})$ i $\text{Sqrt}(k_{\text{zolphidem}})$ kvadratni koren retencionog faktora zolphacida i zolphidema, $k_{\text{zolphaldehyd}}$ retencioni faktor zolphaldehyda, $R_{1/2}$ je rezolucija između zolphacida i zolphidem-tartarata, $\ln(R_{2/3})$ je prirodni logaritam rezolucije između zolphidem-tartarata i oksozolphidema, x_1 i x_2 su vrednosti za procenat metanola u mobilnoj fazi i pH na kodiranim nivoima.

Iz navedenih polinoma se vidi da odgovore sistema najbolje opisuju kvadratni matematički modeli, odnosno polinomi drugog reda, osim rezoluciju između zolphacida i zolphidem-tartarata koju bolje opisuje interakcioni model. Takođe, radi boljeg uklapanja eksperimentalnih rezultata u matematičke modele bila je potrebna transformacija odgovora sistema. Korišćen je kvadratni koren za retencione faktore zolphacida i zolphidema, a prirodni logaritam za rezoluciju između zolphidem-tartarata i oksozolphidema.

Veći koeficijent u polinomu znači i veći uticaj faktora na odgovor sistema. Iz polinoma se vidi i da li faktor ima pozitivan ili negativan uticaj na odgovor sistema. Iz izračunatih polinoma se vidi da procenat metanola ima negativan uticaj na posmatrane retencione faktore i rezolucije. Sa druge strane, pH vrednost mobilne faze pokazuje

pozitivan efekat na ispitivane odgovore sistema, osim na rezoluciju između zolpidema i oksozolpidema, gde povećanje pH smanjuje rezoluciju između ove dve komponente.

Radi bolje vizuelizacije optimalnih vrednosti ispitivanih faktora za sve odgovore sistema su konstruisani 3-D grafikon, odnosno površine odgovora (slika 39).



Slika 39. 3-D grafici ispitivanih odgovora sistema u funkciji pH i procenta metanola u mobilnoj fazi

Iz dobijenih površina odgovora se vidi da i faktorske interakcije imaju uticaja na odgovore sistema. Na retencione faktore ispitivanih supstanci veoma utiče istovremena promena procenta metanola u mobilnoj fazi i pH vrednosti, odnosno što je veća pH vrednost mobilne faze veći je i uticaj promene procenta metanola na retencione faktore.

Za sve ispitivane odgovore sistema, proverena je adekvatnost izabranog modela, odnosno koliko dobro izabrani model opisuje ponašanje hromatografskog sistema, odnosno eksperimentalno dobijene rezultate. Softverski su izračunate vrednosti *R-squared* i *Adjusted R-squared* za sve odgovore sistema i vrednosti su prikazane u tabeli 26.

Tabela 26. Izračunate vrednosti *R-squared* i *Adjusted R-squared* za ispitivane odgovore sistema

Odgovor sistema	<i>R-squared</i>	<i>Adjusted R-squared</i>
$Sqrt(k_{zolphid})$	0.9319	0.8833
$Sqrt(k_{zolphidem})$	0.9907	0.9841
$k_{zolphid}$	0.9944	0.9905
$R_{1/2}$	0.9731	0.9641
$ln(R_{2/3})$	0.9730	0.9538

$k_{zolphid}$ retencioni faktor zolphida, $k_{zolphidem}$ retencioni faktor zolphidema, $k_{zolphid}$ retencioni faktor zolphidema, $k_{zolphid}$ retencioni faktor zolphidema, $R_{1/2}$ rezolucija između zolphida i zolphidem-tartarata, $R_{2/3}$ rezolucija između zolphidem-tartarata i oksozolphidema

S obzirom da su vrednosti *R-squared* i *Adjusted R-squared* za sve odgovore sistema bile vrlo bliske vrednosti od 1, zaključeno je da izabrani matematički modeli dobro opisuju ponašanje hromatografskog sistema, odnosno da eksperimentalno dobijene vrednosti ne odstupaju statistički značajno od vrednosti predviđenih modelom.

4.5.3. Primena multikriterijumskog odlučivanja u formi Deringerove funkcije

Metodologija površine odgovora je pokazala da svi ispitivani faktori, ali i njihove interakcije imaju statistički značajan uticaj na svih pet kritičnih odgovora sistema, pa bi pojedinačna optimizacija faktora prema svakom od posmatranih odgovora sistema bila veoma komplikovan zadatak. Zbog toga je odlučeno da se za dalju optimizaciju metode iskoristi metodologija multikriterijumskog odlučivanja, i to Deringerova funkcija poželjnih odgovora koja se najviše koristi u analitici lekova.

Tom prilikom je postavljeno pet ciljeva koje treba da zadovolji sistem i ciljevi su prikazani u tabeli 27.

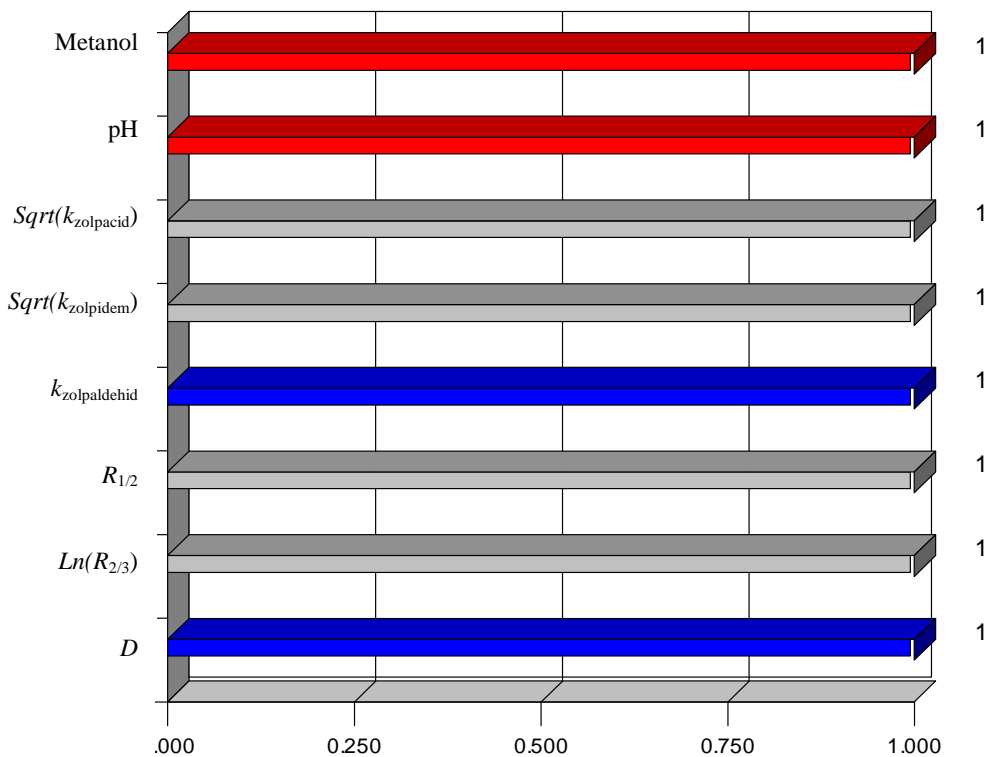
Tabela 27. Ciljevi postavljeni u svrhu multikriterijumskog pristupa optimizaciji metode

Posmatrani odgovor	Cilj	Donja granica	Gornja granica
$Sqrt(k_{zolphacid})$	U opsegu	0.55	1.22
$Sqrt(k_{zolphidem})$	U opsegu	0.55	1.41
$k_{zolphaldehyd}$	Minimalan odgovor	5	14.37
$R_{1/2}$	U opsegu	1.5	10
$\ln(R_{2/3})$	U opsegu	0.18	1

$k_{zolphacid}$ retencioni faktor zolphacida, $k_{zolphidem}$ retencioni faktor zolphidema, $k_{zolphaldehyd}$ retencioni faktor zolphaldehyda, $R_{1/2}$ rezolucija između zolphacida i zolphidem-tartarata, $R_{2/3}$ rezolucija između zolphidem-tartarata i oksozolphidema

Prvi cilj je bio da se dobije maksimalna vrednost za retencioni faktor pika koji se prvi eluira sa kolone, da bi se sprečilo njegovo preklapanje sa pikom mobilne faze. U baznim uslovima prvi se eluira pik zolphacida, ali smanjenjem pH vrednosti mobilne faze sekvenca pikova se menja, pa u kiseloj sredini prvi sa kolone eluira pik zolphidema. Posledično su postavljena dva cilja: da se retencioni faktori zolphacida i zolphidema održavaju u željenom opsegu kao što je prikazano u tabeli 27. Sledeći cilj je bio da se postigne najkraće moguće trajanje hromatografske analize dobijanjem minimalne vrednosti retencionog faktora poslednjeg pika (zolphaldehyda). Četvrti i peti cilj su bili da se postigne dobra separacija zolphacida, zolphidema i oksozolphidema održavanjem njihove rezolucije u željenom opsegu. Pošto nije bilo potrebe za favorizovanjem ni jednog od ciljeva, odnosno svi ciljevi su bili podjednako značajni, svim ciljevima je dodeljena relativna značajnost od 1.

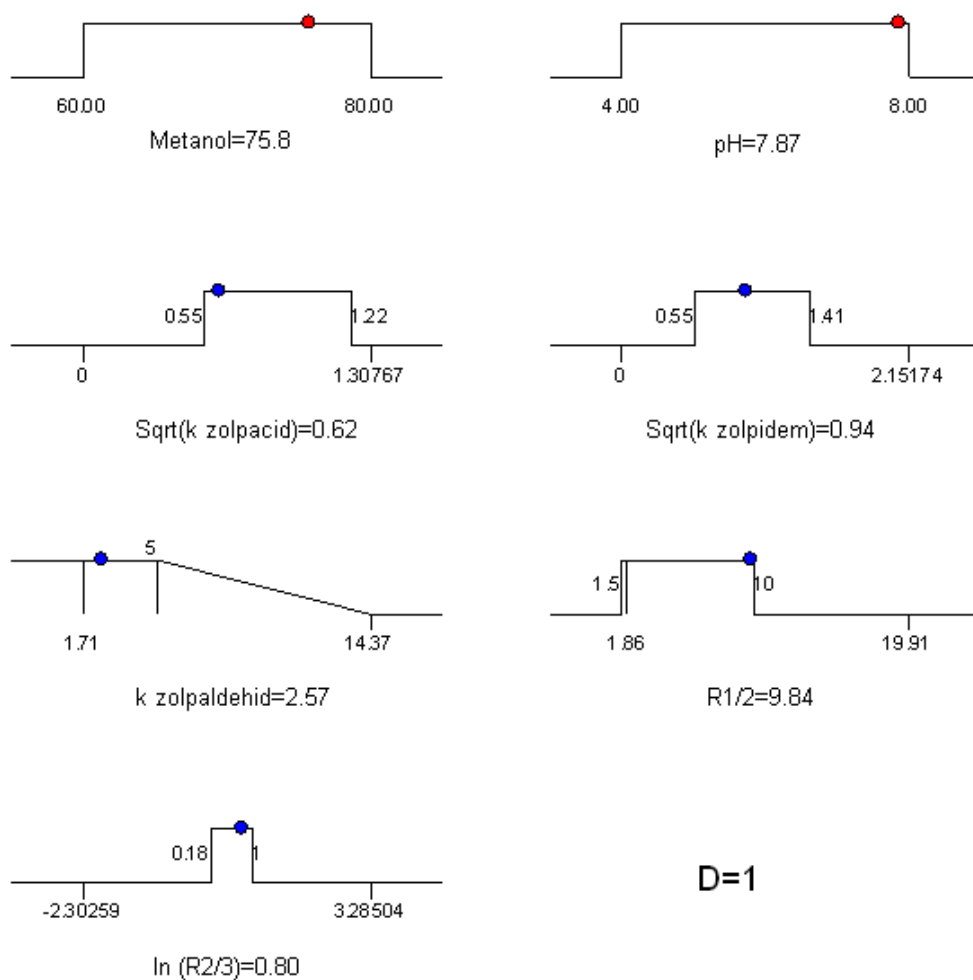
Ispunjenje zadatih ciljeva se ispitivalo u istim opsezima faktora koji su korišćeni u 3^2 punom faktorskom dizajnu (tabela 21). Za svaki od zadatih ciljeva izračunate su pojedinačne funkcije poželjnih odgovora (d_i) preko jednačina (5), (7) i (8), kao i ukupna funkcija poželjnih odgovora (D) preko jednačine (9) (v. poglavlje 1.2.3.). Vrednosti pojedinačnih i ukupne funkcije poželjnih odgovora su radi bolje vizuelizacije prikazane kao Pareto dijagram na slici 40.



Slika 40. Pareto dijagram vrednosti pojedinačnih (d_i) i ukupne funkcije poželjnih odgovora (D), gde su $k_{zolpacid}$ retencioni faktor zolpacida, $k_{zolpidem}$ retencioni faktor zolpidema, $k_{zolpaldehid}$ retencioni faktor zolpaldehida, $R_{1/2}$ je rezolucija između zolpacida i zolpidema, a $R_{2/3}$ rezolucija između zolpidema i oksozolpidema.

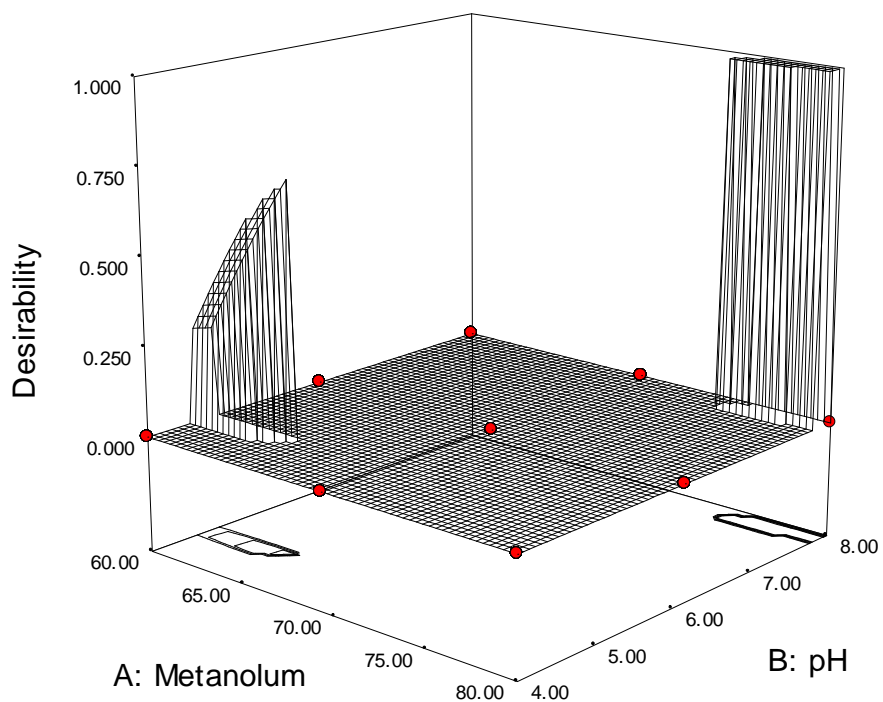
Vrednosti pojedinačnih funkcija poželjnih odgovora (d_i), kao i vrednost ukupne funkcije poželjnih odgovora (D) su jednake vrednosti 1 pri sledećim vrednostima ispitivanih faktora: 75.8% metanola u mobilnoj fazi i pH mobilne faze od 7.87. To znači da su pri ovim vrednostima ispitivanih faktora svi zadati ciljevi maksimalno ispunjeni, pa su ovi uslovi na dalje smatrani kao globalni optimum. Pri ovim uslovima dobijeno je najkraće moguće trajanje hromatografske analize (manje od 10 minuta) uz dobro razdvajanje svih ispitivanih supstanci.

Grafički prikaz zadovoljenja hromatografskih ciljeva na pronađenom globalnom optimumu je predstavljen na slici 41.



Slika 41. Grafički prikaz zadovoljenja hromatografskih ciljeva na pronađenom globalnom hromatografskom optimumu u *stability-indicating* metodi

Dijagram 3-D zavisnosti ukupne funkcije poželjnih odgovora (D) od procenta metanola u mobilnoj fazi i pH mobilne faze prikazan na slici 42. Sa dijagrama se može videti da pri malim promenama procenta metanola i pH vrednosti mobilne faze u odnosu na globalni optimum vrednost ukupne funkcije poželjnih odgovora se ne menja (plato na 3-D dijagramu), čime je potvrđena robusnost metode.



Slika 42. Dijagram 3-D zavisnosti ukupne funkcije poželjnih odgovora (D) od procenta metanola u mobilnoj fazi i pH mobilne faze

Razvojem *stability-indicating* metode uz pomoć eksperimentalnog dizajna i multikriterijumskog pristupa u odlučivanju identifikovani su optimalni uslovi za praćenje stabilnosti farmaceutski aktivne supstance zolpidem-tartarata i odgovarajućeg farmaceutskog doziranog oblika film-tableta i to:

<i>Kolona:</i>	Luna C18 (2) 100A, 250 x 4,6 mm, 5 μ m
<i>Mobilna faza:</i>	metanol—10 mM $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ (75,8 : 24,2; v/v) pH 7,87 podešen sa amonijum hidroksidom
<i>Temperatura</i>	35 $^\circ\text{C}$
<i>Protok:</i>	1 mL min^{-1}
<i>Talasna dužina:</i>	254 nm
<i>Volumen injiciranja:</i>	10 μL

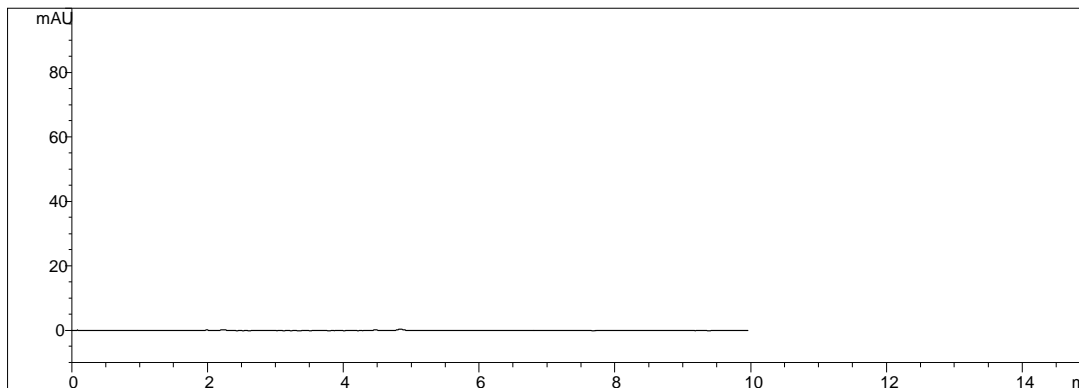
4.6. VALIDACIJA *STABILITY-INDICATING* METODE ZA ZOLPIDEM-TARTARAT

Nakon što su ustanovljeni optimalni hromatografski uslovi, *stability-indicating* metoda za zolpidem-tartarat je validirana u skladu sa zahtevima ICH regulative [4]. Tom prilikom su ispitivani sledeći parametri: selektivnost, linearnost i opseg, preciznost, tačnost, limit detekcije i limit kvantifikacije.

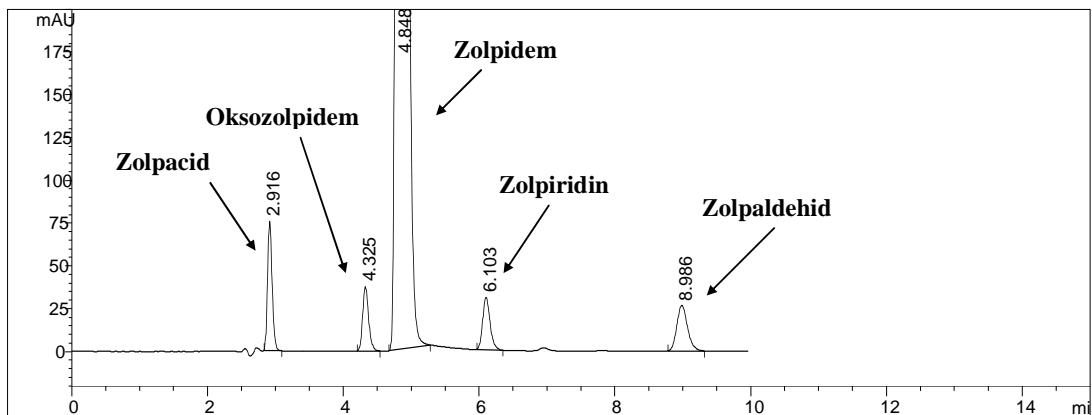
4.6.1. Ispitivanje selektivnosti

U RP-HPLC sistem koji je prethodno pripremljen i podešen, pri navedenim hromatografskim uslovima injiciran je rastvor placeba, rastvor uzorka i radni rastvor standarda za ispitivanje selektivnosti, koji sadrži zolpidem-tartarat u količini od 100% i njegove degradacione proizvode u količini od 1% u odnosu na radnu koncentraciju zolpidem-tartarata u rastvoru uzorka. Upoređivana su retencionna vremena hromatografskih pikova sa hromatograma rastvora placeba sa retencionim vremenima pikova sa hromatograma radnog rastvora standarda za ispitivanje selektivnosti i rastvora uzorka. Selektivnost se potvrđuje ukoliko nema interferencija od strane komponenata placeba pri ispitivanju, odnosno ukoliko na hromatogramu rastvora placeba nema pikova čija retencionna vremena odgovaraju retencionim vremenima za zolpidem-tartarat i njegove ključne degradacione proizvode: zolpacid, oksozolpidem, zolpiridin i zolpaldehid.

Hromatogrami rastvora placeba i radnog rastvora standarda za ispitivanje selektivnosti, prikazani su na slikama 43. i 44.



Slika 43. Hromatogram placebo rastvora



Slika 44. Hromatogram radnog rastvora standarda za ispitivanje selektivnosti

Čistoća svih eluiranih pikova je praćena upotrebom PDA detektora i dokazano je da je čistoća svih pikova bila veća od 99%. Pošto na hromatogramu rastvora placebo nema pikova čija retencionna vremena odgovaraju retencionim vremenima za zolpidem-tartarat i njegove degradacione proizvode: zolpacid, oksozolpidem, zolpiridin i zolpaldehid, čime se isključuje uticaj pomoćnih supstanci iz uzorka na razdvajanje i određivanje ispitivanih supstanci, selektivnost metode je potvrđena.

4.6.2. Ispitivanje linearnosti

Za ispitivanje linearnosti pripremljeno je sedam standardnih rastvora, različitih koncentracija za zolpidem-tartarat i njegove degradacione proizvode: zolpacid, oksozolpidem, zolpiridin i zolpaldehid i rastvori su injicirani u hromatografski sistem. Koncentracije rastvora su obuhvatale opseg od 70–130% za zolpidem-tartarat i 0,1–10% za njegove degradacione proizvode u odnosu na radnu koncentraciju zolpidem-tartarata u rastvoru uzorka.

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

Linearna zavisnost između površine pika i koncentracije je dokazana za sve ispitivane supstance u izabranom opsegu, jer je koeficijent linearnosti za sve ispitivane supstance bio veći od 0,998 (postavljeni zahtevi za linearnost su bili da koeficijent linearnosti bude veći od 0,995 za sve supstance). Odgovarajuće jednačine pravih i parametri regresione analize za ispitivane supstance prikazani su u tabeli 28.

Tabela 28. Rezultati ispitivanja linearnosti metode

Ispitivana supstanca	Opseg koncentracija ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Kalibraciona kriva $y = ax + b$	r^2	S_a	S_b
Zolpacid	0,4–40	$y = 62.322x - 3.5991$	0,9999	0.19	3.37
Oksozolpidem	0,4–40	$y = 40.829x - 3.2502$	0.9999	0.04	0.68
Zolpidem-tartarat	280–520	$y = 29.684x + 2533.4$	0,9964	0.80	326.04
Zolpiridin	0,4–40	$y = 41.167x - 3.3716$	0,9999	0.09	1.62
Zolpaldehid	0,4–40	$y = 51.964x - 4.7928$	0,9999	0.10	1.71

a nagib kalibracione krive, b odsečak, r^2 koeficijent linearnosti; S_a standardna devijacija nagiba, S_b standardna devijacija odsečka

4.6.3. Ispitivanje preciznosti

Preciznost predstavlja međusobno slaganje serije rezultata dobijenih određivanjem iz istog homogenog uzorka pod propisanim uslovima i najčešće se izražava relativnom standardnom devijacijom. Ponovljivost predstavlja preciznost procenjenju pod istim uslovima u kratkom vremenskom periodu [4]. Kao zahtev je postavljeno da RSD vrednost za ponovljenja određivanja zolpidem-tartarata bude manja od 2%, a za degradacione proizvode manja od 5%.

Preciznost odnosno ponovljivost metode je ispitivana analizom laboratorijske smeše standarda za ispitivanje preciznosti i tačnosti koji sadrže koncentracije 0,40; 4,0 i 40,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za degradacione proizvode i 280; 400 i 520 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za zolpidem-tartarat, kao i komponente placeba u odnosu koji odgovara sastavu pomoćnih komponenti u uzorku. Pravljeni su po tri rastvora svake koncentracije i svaki je rastvor injiciran po tri puta.

Statističkom obradom eksperimentalno dobijenih rezultata i izračunavanjem standardne devijacije (SD) i relativne standardne devijacije (RSD), koja se za sve ispitivane supstance i sve koncentracije kretala u unapred definisanim granicama, potvrđena je dobra preciznost metode u ispitivanom opsegu.

Dobijeni statistički parametri koji ukazuju na preciznost metode su prikazani u tabeli 29.

Tabela 29. Rezultati ispitivanja preciznosti metode

Ispitivana supstanca	Injektovano ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Nadeno \pm <i>SD</i> ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	<i>RSD</i> (%)
Zolpacid	0.4	0.41 \pm 0.01	1.48
	4	4.07 \pm 0.01	0.23
	40	40.47 \pm 0.02	0.05
Oksozolpidem	0.4	0.41 \pm 0.01	1.99
	4	4.03 \pm 0.03	0.73
	40	40.93 \pm 0.03	0.06
Zolpidem-tartarat	280	278.26 \pm 0.33	0.12
	400	407.27 \pm 2.35	0.58
	520	516.06 \pm 1.11	0.21
Zolpiridin	0.4	0.40 \pm 0.02	4.69
	4	3.84 \pm 0.02	0.43
	40	41.61 \pm 0.02	0.04
Zolpaldehid	0.4	0.40 \pm 0.01	2.44
	4	3.87 \pm 0.03	0.74
	40	41.23 \pm 0.02	0.04

SD standardna devijacija ($n=9$), *RSD* relativna standardna devijacija

4.6.4. Ispitivanje tačnosti

Tačnost predstavlja međusobno slaganje prave ili referentne vrednosti i rezultata dobijenog određivanjem pod propisanim uslovima, a izražava se kao procenat prinosa, odnosno *Recovery* vrednost od poznate, dodate količine analita u uzorak. Kao zahtev je postavljeno da *Recovery* vrednost za zolpidem-tartarat bude između 98–102%, a za degradacione proizvode između 95–105%.

Tačnost je ispitivana analizom istih laboratorijskih smeša standarda, koje su korišćene za ispitivanje preciznosti metode, a koje sadrže degradacione proizvode u koncentracijama 0,40; 4,0 i 40,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, zolpidem-tartarat u koncentracijama 280; 400 i 520 $\mu\text{g mL}^{-1}$, kao i komponente placebo u odnosu koji odgovara sastavu pomoćnih komponenti u uzorku. Pravljeni su po tri rastvora svake koncentracije i svaki je rastvor injiciran po tri puta.

Izračunavanjem procenta prinosa, odnosno *Recovery* vrednosti, koja se za sve ispitivane supstance i sve koncentracije kretala u unapred definisanim granicama, potvrđena je dobra tačnost metode u ispitivanom opsegu.

Statistički parametri koji ukazuju na tačnost metode su prikazani u tabeli 30.

Tabela 30. Rezultati ispitivanja tačnosti metode

Ispitivana supstanca	Injektovano ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Nađeno \pm <i>SD</i> ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	<i>Recovery</i> (%)
Zolpacid	0.4	0.41 ± 0.01	103.19
	4	4.07 ± 0.01	101.74
	40	40.47 ± 0.02	101.17
Oksozolpidem	0.4	0.41 ± 0.01	101.34
	4	4.03 ± 0.03	100.84
	40	40.93 ± 0.03	102.33
Zolpidem-tartarat	280	278.26 ± 0.33	99.38
	400	407.27 ± 2.35	101.82
	520	516.06 ± 1.11	99.24
Zolpiridin	0.4	0.40 ± 0.02	100.85
	4	3.84 ± 0.02	96.03
	40	41.61 ± 0.02	104.03
Zolpaldehid	0.4	0.40 ± 0.01	99.13
	4	3.87 ± 0.03	96.73
	40	41.23 ± 0.02	103.08

SD standardna devijacija ($n=9$)

4.6.5. Ispitivanje limita detekcije i kvantifikacije

Određivanje limita detekcije i kvantifikacije urađeno je kombinacijom eksperimentalnog rada i procene odnosa signal/šum. U hromatografski sistem su injicirani rastvori koji sadrže po 0,02; 0,04; 0,08; 0,16; 0,24 i 0,32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ zolpidem-tartarata i degradacionih proizvoda, a zatim je računat odnos signal/šum za svaku ispitivanu supstancu u svim koncentracijama. Limitom detekcije (LOD) je označena ona koncentracija koja ima odnos signal/šum najmanje 3:1, dok je limitom kvantifikacije označena ona koncentracija koja ima odnos signal/šum najmanje 10:1 (tabela 31).

Tabela 31. LOD i LOQ vrednosti za ispitivane supstance

Ispitivana supstanca	<i>LOD</i> ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	<i>LOQ</i> ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Zolpacid	0.03	0.08
Oksozolpidem	0.05	0.15
Zolpidem-tartarat	0.08	0.24
Zolpiridin	0.06	0.18
Zolpaldehid	0.07	0.21

LOD limit detekcije, *LOQ* limit kvantifikacije

Vrednosti validacionih parametara, koje su bile u skladu sa unapred definisanim kriterijumima za validaciju metode, ukazali su da validirana *stability-indicating* metoda odgovara njenoj planiranoj nameni za praćenje stabilnosti zolpidem-tartarata farmaceutski aktivne supstance i odgovarajućeg farmaceutskog doziranog oblika film-tableta, kao i da je nova metoda robusnija i znatno brža u odnosu na prethodno razvijenu metodu (v. poglavlje 4.2), pa samim tim i pogodnija za rutinsku analizu.

4.7. KVALITATIVNA I KVANTITATIVNA ANALIZA FILM-TABLETA *STABILITY-INDICATING* METODOM

Za potvrđivanje primenljivosti razvijene *stability-indicating* metode za praćenje stabilnosti film-tableta zolpidem tartarata, izvršena je kvalitativna i kvantitativna analiza navedenih film-tableta čiji je rok upotrebe istekao pre 6 meseci, u cilju da se potvrdi da razvijena metoda ima mogućnost razdvajanja i određivanja zolpidem-tartarata i njegovih degradacionih proizvoda, koji nastaju do kraja roka upotrebe navedenog proizvoda.

U hromatografski sistem su injektovani radni standardni rastvor koji sadrži zolpidem-tartarat u koncentraciji od $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ i degradacione proizvode u koncentraciji $4 \mu\text{g mL}^{-1}$, kao i rastvor uzorka. Napravljena su tri rastvora uzorka i svaki je injiciran tri puta. Pod navedenim uslovima dobijeni su dobro definisani i razdvojeni hromatografski pikovi zolpidem-tartarata i degradacionih proizvoda. Hromatografski parametri prikazani su u tabeli 32.

Tabela 32. Hromatografski parametri za RP-HPLC analizu zolpidem-tartarata i degradacionih proizvoda

Hromatografski parametri	Zolpacid	Oksozolpidem	Zolpidem-tartarat	Zolpiridin	Zolpaldehid
t_r	2.92	4.33	4.85	6.10	8.99
t_0	2.46				
V_r	2.92	4.33	4.85	6.10	8.99
W	0.07	0.09	0.12	0.11	0.16
As	0.86	0.85	0.83	0.87	0.91
k'	0.19	0.76	0.97	1.48	2.65
N	10506	12895	9136	17165	16906
R	/	9.32	2.97	6.56	12.59

t_r retenciono vreme, t_0 retenciono vreme mobilne faze, V_r retencionna zapremina, W širina pika na polovini njegove visine (min), As simetrija pika, N broj teoretskih platoa, k' retencioni faktor, R rezolucija

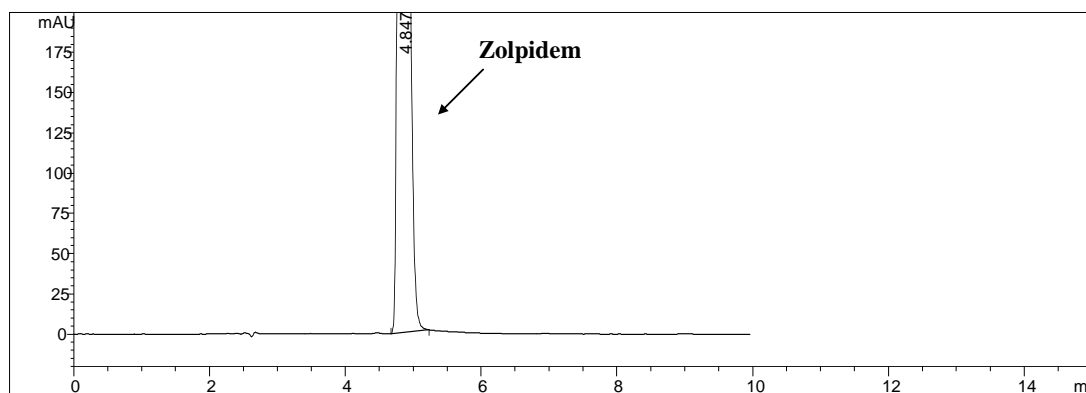
Iz tabele 32. se vidi da se svi hromatografski parametri nalaze u dozvoljenim granicama koji garantuju dobru separaciju i određivanje ispitivanih supstanci. Sve rezolucije su daleko veće od 1,5 što se smatra razdvajanjem na baznoj liniji. Simetrije svih pikova, koje se kreću u opsegu vrednosti od 0,83–0,91, omogućavaju dobru integraciju pikova i kvantifikaciju svih komponenti.

Kvantitativna analiza je rađena metodom eksternog standarda, preko površine pikova. Identifikacija ispitivanih supstanci je izvršena preko retencionih vremena i UV-spektra snimljenog na PDA detektoru. Rezultati kvantitativne analize film-tableta su predstavljeni u tabeli 33, a hromatogram rastvora uzorka na slici 45.

Tabela 33. Rezultati određivanja sadržaja zolpidem-tartarata i njegovih degradacionih proizvoda u film-tabletama

Ispitivana supstanca	Očekivano ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Nadeno ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Nadeno (mg/tbl.)	Recovery (%)	RSD (%)
Zolpacid	4	Ispod LOD	Ispod LOD	/	/
Zolpidem-tartarat	4	Ispod LOD	Ispod LOD	/	/
Oksozolpidem	400	$380,6 \pm 1,3^*$	$9,51 \pm 0,03^*$	95,1	0,34
Zolpiridin	4	Ispod LOD	Ispod LOD	/	/
Zolpaldehid	4	Ispod LOD	Ispod LOD	/	/

*SD standardna devijacija ($n=9$), RSD relativna standardna devijacija



Slika 45. Hromatogram rastvora uzorka

Čistoća svih eluiranih pikova je praćena upotrebom PDA detektora. Dokazano je da je čistoća svih pikova bila veća od 99%, čime je pokazano da navedena metoda omogućava razdvajanje i određivanje svih degradacionih proizvoda zolpidem-tartarata, koji nastaju u roku upotrebe ispitivanog proizvoda.

Upoređivanjem dobijenih vrednosti za sadržaj ispitivanih supstanci sa specifikacijskim zahtevima proizvođača, ustanovljeno je da proizvod zadovoljava definisane zahteve iz specifikacije u roku upotrebe proizvoda, iako je rok upotrebe leka istekao pre 6 meseci.

5. ZAKLJUČAK

1. Razvijena je i optimizovana RP-HPLC metoda sa UV i masenom detekcijom za određivanje zolpidem tartarata i njegovih degradacionih proizvoda: zolpacida, oksozolpidema, zolpiridina i zolpaldehida u film-tabletama. Metoda je razvijena uz upotrebu eksperimentalnog dizajna i metodologije multikriterijumskog odlučivanja. U *screening* fazi, za identifikaciju faktora koji imaju statistički značajan uticaj na hromatografsko ponašanje ispitivanih supstanci korišćen je 2^{5-2} frakcioni faktorski dizajn. Kao odgovori sistema praćeni su retencioni faktori svih ispitivanih supstanci. Na osnovu dobijenih rezultata konstruisani su Pareto dijagrami koji su pokazali da na hromatografski sistem značajno utiču procenat metanola u mobilnoj fazi, pH mobilne faze i koncentracija amonijum-acetata u mobilnoj fazi, pa su ova tri faktora dalje optimizovana. Kao optimizacioni dizajn se koristio centralni kompozicioni dizajn i metodologija površine odgovora. Praćeni odgovori sistema su bili retencioni faktori ispitivanih supstanci i rezolucije između kritičnih pikova. Pomoću višestruke regresione analize i analize 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. Finalni optimalni uslovi su definisani primenom multikriterijumskog pristupa u odlučivanju, u formi Deringerove funkcije poželjnih odgovora, koja je omogućila zadovoljavanje više hromatografski ciljeva u isto vreme, kao što su dobra rezolucija između kritičnih pikova uz što kraće moguće trajanje hromatografske analize. Optimalni uslovi su podrazumevali kolonu Luna C18 (2) 100A, 250 x 4,6 mm, 5 μ m, mobilnu fazu u sastavu metanol–10 mM $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ (68,4 : 31,6; v/v) čiji je pH podešen koncentrovanom sirćetnom kiselinom na 5,4, protok mobilne faze od 1 mL min^{-1} , temperaturu kolone od 35 °C, talasnu dužinu detekcije od 254 nm i volumen injiciranja od 10 μ L.
2. RP-HPLC metoda je zatim validirana u skladu sa ICH smernicama. Tom prilikom su ispitivani robusnost, selektivnost, linearnost i opseg metode, preciznost, tačnost, limit detekcije i limit kvantifikacije za sve ispitivane supstance. Linearnost metode je dokazana u opsegu koncentracija za zolpidem-tartarat (280–520 $\mu\text{g mL}^{-1}$) i degradacione proizvode (0,4–40 $\mu\text{g mL}^{-1}$), jer je koeficijent linearnosti za sve ispitivane supstance bio veći od 0,995. Razvijena

metoda je pokazala dobru preciznost u datom opsegu, jer se relativna standardna devijacija ponovljenih određivanja za sve ispitivane supstance kretala od 0,26–3,50%. Izračunavanjem procenta prinosa, odnosno *Recovery* vrednosti, koja se za sve ispitivane supstance i sve koncentracije kretala od 95,13–105,31%, potvrđena je dobra tačnost metode. Razvijena metoda je vrlo osetljiva. Limiti detekcije za ispitivane supstance iznose od 0,05–0,08 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a limiti kvantifikacije od 0,15–0,26 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Dobijeni rezultati validacije su pokazali da metoda u potpunosti odgovara planiranoj nameni za određivanje sadržaja zolpidem-tartarata i degradacionih proizvoda u film-tabletama.

3. Studije forsirane degradacije farmaceutski aktivne supstance zolpidem-tartarata i odgovarajućeg farmaceutskog doziranog oblika film-tableta sprovedene su u skladu sa ICH smernicama. Ispitivana je stabilnost supstance i farmaceutskog doziranog oblika u čvrstom stanju i u rastvoru u uslovima hidrolize u kiseloj, neutralnoj i baznoj sredini, termalne degradacije, oksidacije i fotolize. Farmaceutski dozirani oblik je pokazao apsolutnu stabilnost u svim ispitivanim uslovima. Farmaceutski aktivna supstanca je pokazala degradaciju u uslovima hidrolize u kiseloj i baznoj sredini, kao i pri izlaganju svetlosti u rastvoru. Povišena temperatura je ubrzavala proces hidrolitičke degradacije.
4. Identifikacija nastalih degradacionih proizvoda je izvršena tečnom hromatografijom sa PDA i masenim detektorom, na osnovu njihovih retencionih vremena i odgovarajućih spektara na oba detektora. Kao glavni proizvod hidrolitičke degradacije zolpidem-tartarata identifikovan je zolpacid sa protonovanim molekulskim jonom (MH^+) na m/z 281 i fragmentnim jonima m/z 236 i 222. Fotolitičkom degradacijom zolpidem-tartarata nastaju oksozolpidem (protonovani molekulski jon (MH^+) na m/z 322 i fragmentni joni m/z 249 i 222), zolpiridin (protonovani molekulski jon (MH^+) na m/z 227 i fragmentni joni m/z 209 i 222) i zolpaldehid (protonovani molekulski jon (MH^+) na m/z 251 i fragmentni joni m/z 223 i 208). Na osnovu dobijenih rezultata studije forsirane degradacije definisani su ključni degradacioni proizvodi zolpidem-tartarata, kao i putevi njegove degradacije. Ključni degradacioni proizvodi zolpidem-tartarata su zolpacid koji nastaje hidrolizom u kiselim i baznim uslovima, kao i oksozolpidem, zolpiridin i zolpaldehid, koji nastaju fotolitičkom degradacijom.

5. S obzirom da forsiranom degradacijom nisu pronađeni novi degradacioni proizvodi i da *stability-indicating* metoda nije morala da se prilagođava masenoj detekciji, razvijena je i optimizovana nova metoda za praćenje stabilnosti zolpidem-tartarata farmaceutski aktivne supstance i odgovarajućeg farmaceutskog doziranog oblika film-tableta, kojom je moguće razdvojiti i odrediti zolpidem-tartarat i njegove ključne degradacione proizvode: zolpacid, oksozolpidem, zolpiridin i zolpaldehid. Metoda je razvijena uz upotrebu eksperimentalnog dizajna i metodologije multikriterijumskog odlučivanja. U odnosu na prethodno razvijenu metodu ispitivan je širi opseg pH od 4–8, jer je masena detekcija u prethodnoj metodi isključivala opseg od 5,5–8 (u ovom opsegu pH ne dolazi do stvaranja jona analita u samoj mobilnoj fazi, što smanjuje osetljivost masenog detektora). U *screening* fazi, 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. Na osnovu dobijenih rezultata konstruisani su Pareto dijagrami koji su pokazali da na hromatografski sistem značajno utiču procenat metanola u mobilnoj fazi i pH mobilne faze, pa su ova dva faktora dalje optimizovana. Kao optimizacioni dizajn se koristio 3^2 pun faktorski dizajn i metodologija površine odgovora. Praćeni odgovori sistema su bili retencioni faktori ispitivanih supstanci i rezolucije između kritičnih pikova. Pomoću višestruke regresione analize i analize 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. Finalni optimalni uslovi su definisani primenom multikriterijumskog pristupa u odlučivanju, u formi Deringerove funkcije poželjnih odgovora, koja je omogućila zadovoljavanje više hromatografski ciljeva u isto vreme, kao što su dobra rezolucija između kritičnih pikova uz što kraće moguće trajanje hromatografske analize. Optimalni uslovi su podrazumevali kolonu Luna C18 (2) 100A, 250 x 4,6 mm, 5 μ m, mobilnu fazu u sastavu metanol–10 mM $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ (75,8 : 24,2; v/v) čiji je pH podešen amonijum hidroksidom na 7.87, protok

mobilne faze od 1 mL min^{-1} , temperaturu kolone od $35 \text{ }^\circ\text{C}$, talasnu dužinu detekcije od 254 nm i volumen injiciranja od $10 \text{ }\mu\text{L}$.

6. *Stability-indicating* metoda je zatim validirana u skladu sa ICH smernicama. Tom prilikom su ispitivani selektivnost, linearnost i opseg metode, preciznost, tačnost, limit detekcije i limit kvantifikacije za sve ispitivane supstance. Linearnost metode je dokazana u širokom opsegu koncentracija za zolpidem-tartarat ($280\text{--}520 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) i degradacione proizvode ($0,4\text{--}40 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$), jer je koeficijent linearnosti za sve ispitivane supstance bio veći od 0,995. Razvijena metoda je pokazala dobru preciznost u datom opsegu, jer se relativna standardna devijacija ponovljenih određivanja za sve ispitivane supstance kretala od $0,04\text{--}4,69\%$. Izračunavanjem procenta prinosa, odnosno *Recovery* vrednosti, koja se za sve ispitivane supstance i sve koncentracije kretala od $96,03\text{--}104,03\%$, potvrđena je dobra tačnost metode. Razvijena metoda je vrlo osetljiva. Limiti detekcije za ispitivane supstance iznose od $0,03\text{--}0,08 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, a limiti kvantifikacije od $0,08\text{--}0,24 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. Dobijeni rezultati validacije su pokazali da metoda u potpunosti odgovara planiranoj nameni za praćenje stabilnosti zolpidem-tartarata farmaceutski aktivne supstance i odgovarajućeg farmaceutskog doziranog oblika film-tableta. Nova metoda je, u odnosu na prethodno razvijenu metodu, omogućila bolje razdvajanje ispitivanih supstanci, bolju robusnost, značajno skraćanje trajanja hromatografske analize i racionalizaciju celog postupka ispitivanja, što bi bila i prednost nove metode u rutinskoj analizi.

LITERATURA

- [1] Lee DC, Webb M, Pharmaceutical analysis, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, 2003.
- [2] Deyl Z, Quality control in pharmaceutical analysis, separation methods, Elsevier science BV, Amsterdam, 1997.
- [3] ICH Q3B(R2), Impurities In New Drug Products, International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, 2006
- [4] ICH Q2 (R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, 2005
- [5] Nikolin B, Šober M, Analitika lijekova, Sarajevo Publishing, Sarajevo, 2003.
- [6] Živanović Lj, Odabrane metode za farmaceutsku analizu, Nijansa, Zemun, 1995.
- [7] Meyer VR, Practical high-performance liquid chromatography, 4th Edition, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2004.
- [8] European Pharmacopoeia, 7th Ed., Council of Europe, Strasbourg Cedex, 2011.
- [9] Snyder LR, Kirkland JJ, Introduction to modern liquid chromatography, 2nd Edition, Wiley-Interscience, New York, 1979.
- [10] Moffat AC, Osselton M, Widdop B, Clarke's analysis of drugs and poisons, 3th Edition, Pharmaceutical Press, London 2004.
- [11] Sadek PC, The HPLC solvent guide, 2nd Edition, Wiley-Interscience, New York, USA, 2002.
- [12] The United States Pharmacopoeia 35, United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, 2011.
- [13] Ardrey B, Liquid chromatography-Mass spectrometry: an introduction, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2003.
- [14] Hoffmann E, Strooband V, Mass spectrometry, Principles and applications, 2nd Edition, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2002.
- [15] Gross JH, Mass spectrometry, A textbook, 2nd Edition, Springer Science, Heidelberg, 2004.
- [16] Downard K, Mass spectrometry, A foundation course, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2004.

- [17] Herbert CG, Johnstone RAW, Mass spectrometry, Basics, CRC Press LLC, Boca Raton, 2003.
- [18] Pramanik BN, Ganguly AK, Gross ML, Applied electrospray mass spectrometry, Marcel Dekker Inc, New York, 2002.
- [19] Otto M, Chemometrics: statistics and computer application in analytical chemistry, Wiley-VCH, Weinheim, 2007.
- [20] Massart DL, Vandeginste BGM, Deming SM, Michotte Y, Kaufman L, Chemometrics: a textbook, Elsevier science BV, Amsterdam, 2003.
- [21] 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
- [22] Mutihac L, Mutihac R, Mining in chemometrics, *Anal Chim Acta* 612 (2008) 1–18
- [23] Brereton RG. Chemometrics - data analysis for the laboratory and chemical plant, John Wiley & Sons Ltd. Chichester, 2003.
- [24] Deming SN, Morgan SL, Experimental design: a chemometric approach, 2nd Edition, Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, 1993
- [25] 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
- [26] 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
- [27] Ryan TP, Modern experimental design, John Wiley & Sons Inc, New Jersey, 2007.
- [28] Martendal E, Budziak D, Carasek E, Application of fractional factorial experimental and Box-Behnken design 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

- [29] Nowak M, Seubert A, Application of experimental design for the characterisation of a novel elution system for high-capacity anion chromatography with suppressed conductivity detection *J Chromatogr A* 855 (1999) 91–109
- [30] 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
- [31] Armstrong NA, *Pharmaceutical experimental design and interpretation*, 2nd Edition, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2006.
- [32] Zecevic M, Jovic B, Zivanovic Lj, Protic A, Application of Multicriteria Methodology in the Development of Improved RP-LC-DAD for Determination of Rizatriptan and Its Degradation Products, *Chromatographia* 68 (2008) 911–918
- [33] Candioti LV, Robles JC, Mantovani VE, Goicoechea HC, Multiple response optimization applied to the development of a capillary electrophoretic method for pharmaceutical analysis, *Talanta* 69 (2006) 140–147
- [34] Safa F, Hadjmohammadi MR, Simultaneous optimization of the resolution and analysis time in micellar liquid chromatography of phenyl thiohydantoin amino acids using Derringer's desirability function, *J Chromatogr A* 1078 (2005) 42–50
- [35] Ortiz MC, Herrero A, Sanllorente S, Reguera C, Methodology of multicriteria optimization in chemical analysis: some applications in stripping voltammetry, *Talanta* 65 (2005) 246–254
- [36] Zivanovic Lj, Protic A, Zecevic M, Jovic B, Kostic M, Multicriteria optimization methodology in development of HPLC separation of mycophenolic acid and mycophenolic acid glucuronide in human urine and plasma *J Pharm Biomed Anal* 50 (2009) 640–648
- [37] Candioti LV, Olivieri AC, Goicoechea HC, Simultaneous multiresponse optimization applied to epinastine determination in human serum by using capillary electrophoresis, *Anal Chim Acta* 595 (2007) 310–318
- [38] Jeong IJ, Kim KJ, An interactive desirability function method to multiresponse optimization, *Eur J Oper Res* 195 (2009) 412–426

- [39] Sivakumar T, Manavalan R, Muralidharan C, Valliappan K, Multi-criteria decision making approach and experimental design as chemometric tools to optimize HPLC separation of domperidone and pantoprazole, *J Pharm Biomed Anal* 43 (2007) 1842–1848
- [40] Baertschi SW (ed), *Pharmaceutical Stress Testing, Predicting Drug Degradation*, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2005.
- [41] Alsante KM, Ando A, Brown R, Ensing J, Hatajik TD, Kong W, Tsuda Y, The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products, *Adv Drug Deliv Rev* 59 (2007) 29–37
- [42] ICH Q1A (R2), *Stability testing of new drug substances and products*, International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, 2003.
- [43] ICH Q1B (1997), *Stability testing: Photostability testing of new drug substances and products*, International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, 1996.
- [44] Huynh-Ba K, *Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development*, Springer Science, New York, 2009.
- [45] Bakshi M, Singh S, Development of validated stability-indicating assay methods—critical review, *J Pharm Biomed Anal* 28 (2002) 1011–1040
- [46] FDA, *Guidance for Industry: Stability Testing of Drug Substances and Drug Products (Draft guidance)*, Food and Drug Administration, Rockville, MD, 1998.
- [47] Sweetman SC (ed), *Martindale: The Complete Drug Reference* 36, Pharmaceutical Press, London, 2009.
- [48] Dollery C (ed), *Therapeutic Drugs*, 2nd Edition, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1999.
- [49] *British Pharmacopoeia 2012*, The Stationery Office, London, 2011.
- [50] ICH Q3A(R2), *Impurities In New Drug Substances*, International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, 2006.

- [51] ICH Q3C(R5), Impurities: Guideline for Residual Solvents, International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, 2011.
- [52] The Japanese Pharmacopoeia, Sixteenth Edition, Yakuji Nippo Limited, Tokyo, 2011.
- [53] Ring PR, Bostick JM, Validation of a method for the determination of zolpidem in human plasma using LC with fluorescence detection, *J Pharm Biomed Anal*, 22 (2000) 495–504
- [54] Nirogi RVS., Kandikere VN., Shrivasthava W, Mudigonda K, Quantification of zolpidem in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Biomed Chromatogr* 20 (2006) 1103–1108
- [55] Ptacek P, Macek J, Klima J, Rapid and simple method for determination of zolpidem in human plasma by high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr B* 694 (1997): 409-413
- [56] Kintz P, Villain M, Ludes B, Testing for zolpidem in oral fluid by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J Chromatogr B* 811 (2004) 59–63
- [57] Bhatt J, Jangid A, Shetty R, Shah B, Kambli S, Subbaiah G, Singh S, Quantification of zolpidem in human plasma by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Biomed Chromatogr* 20 (2006) 736–742
- [58] Giroud C, Augsburger M, Menetrey A, Mangin P, Determination of zaleplon and zolpidem by liquid chromatography–turbo-ion-spray mass spectrometry: application to forensic cases, *J Chromatogr B* 789 (2003) 131–138
- [59] Villain M, Cheze M, Tracqui A, Ludes B, Kintz P, Windows of detection of zolpidem in urine and hair: application to two drug facilitated sexual assaults, *Forensic Sci Int* 143 (2004) 157–161
- [60] Smyth WF, Joyce C, Ramachandran VN, O’Kane E, Coulter D, Characterisation of selected hypnotic drugs and their metabolites using electrospray ionisation with ion trap mass spectrometry and with quadrupole time-of-flight mass spectrometry and their determination by liquid chromatography-electrospray ionisation–ion trap mass spectrometry, *Anal Chim Acta* 506 (2004) 203–214

- [61] Smink BE, Brandsma JE, Dijkhuizen A, Lusthof KJ, de Gier JJ, Egberts ACG, Uges DRA, Quantitative analysis of 33 benzodiazepines, metabolites and benzodiazepine-like substances in whole blood by liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry, *J Chromatogr B* 811 (2004) 13–20
- [62] Reubsaet JLE, Pedersen-Bjergaard S, Screening for central nervous system-stimulating drugs in human plasma by liquid chromatography with mass spectrometric detection, *J Chromatogr A* 1031 (2004) 203–211
- [63] Gergov M, Ojanpera I, Vuori E, Simultaneous screening for 238 drugs in blood by liquid chromatography–ionspray tandem mass spectrometry with multiple-reaction monitoring, *J Chromatogr B* 795 (2003) 41–53
- [64] Villain M, Concheiro M, Cirimele V, Kintz P, Screening method for benzodiazepines and hypnotics in hair at pg/mg level by liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry, *J Chromatogr B* 825 (2005) 72–78
- [65] Kim J, Lee S, In S, Choi H, Chung H, Validation of a simultaneous analytical method for the detection of 27 benzodiazepines and metabolites and zolpidem in hair using LC–MS/MS and its application to human and rat hair, *J Chromatogr B* 879 (2011) 878–886
- [66] Ishida T, Kudo K, Hayashida M, Ikeda N, Rapid and quantitative screening method for 43 benzodiazepines and their metabolites, zolpidem and zopiclone in human plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with a small particle column, *J Chromatogr B* 877 (2009) 2652–2657
- [67] Wang Q, Sun L, Lau CE, Determination of zolpidem in serum microsamples by high-performance liquid chromatography and its application to pharmacokinetics in rats, *J Chromatogr B* 734 (1999) 299–305
- [68] Gaillard Y, Pepin G, Screening and identification of drugs in human hair by high-performance liquid chromatography-photo-diode-array UV detection and gas chromatography-mass spectrometry after solid-phase extraction, A powerful tool in forensic medicine, *J Chromatogr A* 762 (1997) 251-267.
- [69] Gunnar T, Ariniemi K, Lillsunde P, Determination of 14 benzodiazepines and hydroxy metabolites, zaleplon and zolpidem as tert-butyldimethylsilyl derivatives compared with other common silylating reagents in whole blood by gas chromatography–mass spectrometry, *J Chromatogr B* 818 (2005) 175–189

- [70] Keller T, Schneider A, Tutsch-Bauer E, GC/MS determination of zolpidem in postmortem specimens in a voluntary intoxication, *Forensic Sci Int* 106 (2) (1999) 103–108
- [71] Gunnar T, Mykkanen S, Ariniemi K, Lillsunde P, Validated semiquantitative/quantitative screening of 51 drugs in whole blood as silylated derivatives by gas chromatography-selected ion monitoring mass spectrometry and gas chromatography electron capture detection, *J Chromatogr B* 806 (2004) 205–219
- [72] Stanke F, Jourdil N, Bessard J, Bessard G, Simultaneous determination of zolpidem and zopiclone in human plasma by gas chromatography-nitrogen-phosphorus detection, *J Chromatogr B* 675 (1996) 43-51
- [73] Winek CL, Wahba WW, Janssen JK, Rozin L, Rafizadeh V, Acute overdose of zolpidem, *Forensic Sci Int* 78 (1996) 165-168
- [74] Hempel G, Blaschke G, Direct determination of zolpidem and its main metabolites in urine using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection, *J Chromatogr B* 675 (1996) 131-137
- [75] Huerta-Fontela M, Galceran MT, Ventura F, Fast liquid chromatography–quadrupole-linear ion trap mass spectrometry for the analysis of pharmaceuticals and hormones in water resources, *J Chromatogr A* 1217 (2010) 4212–4222
- [76] El Zeany BA, Moustafa AA, Farid NF, Determination of zolpidem hemitartrate by quantitative HPTLC and LC, *J Pharm Biomed Anal* 33 (2003) 393-401
- [77] Laviana L, Mangas C, Fernandez-Mari F, Bayod M, Blanco D, Determination and in-process control of zolpidem synthesis by high-performance liquid chromatography, *J Pharm Biomed Anal* 36 (2004) 925–928
- [78] Radi AE, Bekhiet G, Wahdan T, Electrochemical Study of Zolpidem at Glassy Carbon Electrode and Its Determination in a Tablet Dosage Form by Differential Pulse Voltammetry, *Chem Pharm Bull* 52(9) (2004) 1063—1065
- [79] Kelani KM. Selective potentiometric determination of zolpidem hemitartrate in tablets and biological fluids by using polymeric membrane electrode. *J AOAC Int* 87 (2004) 1309–1318
- [80] Chomwal R, Kumar A, Goyal A, Spectrophotometric methods for determination of zolpidem tartrate in tablet formulation. *J Pharm Bioall Sci* 2 (2010) 365-368

PRILOZI

SPISAK OBJAVLJENIH RADOVA IZ DOKTORSKE DISERTACIJE

Radovi iz doktorske disertacije štampani u međunarodnim časopisima:

1. Malešević M., Zivanovic Lj., Protic A., Jovic Z. "Multiobjective Optimisation Approach in Evaluation of Chromatographic Behaviour of Zolpidem Tartrate and Its Degradation Products", *Chromatographia* (2011) 74:197-208
2. Malešević M., Zivanovic Lj., Protic A., Radisic M., Lausevic M., Jovic Z., Zecevic M. "Stress Degradation Studies on Zolpidem Tartrate Using LC–DAD and LC–MS Methods", *Acta Chromatographica*, Accepted manuscript

Radovi saopšteni na međunarodnim i nacionalnim naučnim skupovima:

1. Malešević M., Živanović Lj., Jović Z., "Razvoj i optimizacija RP-HPLC metode za određivanje zolpidem-tartarata i njegovih degradacionih proizvoda u tabletama", Peti kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd, Srbija, Decembar 2010, (*Arh. farm.* 2010;60:922-923)
2. Malešević M., Zivanovic Lj., Jovic Z., "Validation of RP-HPLC method for simultaneous determination of zolpidem tartrate and its degradation products in tablets", 28th International symposium on chromatography, Valencija, Španija, Septembar 2010

BIOGRAFIJA AUTORA

Marija Malešević je rođena 1975. godine u Novom Sadu. Osnovnu školu je završila u Čelarevu, a gimnaziju u Bačkoj Palanci. Na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu diplomirala je 2000. godine sa prosečnom ocenom 9,23.

Na istom fakultetu je 2004. godine upisala Specijalizaciju iz ispitivanja i kontrole lekova, a 2006. godine doktorske studije iz farmaceutske hemije. Specijalistički rad odbranila je 2010. godine, čime sam stekla zvanje Specijaliste iz ispitivanja i kontrole lekova.

Od 2000. godine do 2002. godine je radila kao stručni saradnik na Institutu za analitičku hemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, a od 2002. godine je stalno zaposlena u Zavodu za farmaciju Srbije, koji je 2004. godine prerastao u Agenciju za lekove i medicinska sredstva Srbije.

U okviru Agencije je obavljala poslove vezane za ispitivanje i kontrolu lekova, procenu farmaceutske dokumentacije i uvođenje sistema kvaliteta. Kao načelnik Hemijske laboratorije obavljala je poslove organizacije i nadzora nad svim aktivnostima sprovedenim u laboratoriji. Trenutno je angažovana na poslovima planiranja i sprovođenja sistematske kontrole, koordinacije poslova na izradi Nacionalne farmakopeje i Magistrálnih formula i koordinacije laboratorijskim aktivnostima vezanim za članstvo u OMCL mreži, kao što su međulaboratorijska poređenja i kolaborativne studije za utvrđivanje kvaliteta referentnih standardnih supstanci.

Od 2011. godine je član srpske delegacije pri Komisiji Evropske farmakopeje i član P4-ekspertske grupe pri Evropskoj farmakopeji, zbog čega je angažovana na poslovima razvoja monografija Evropske farmakopeje.

Kao poslediplomac bavi se naučno-istraživačkim radom u sferi ispitivanja kvaliteta lekova, ispitivanja nečistoća i degradacionih proizvoda, kao i studijama forsirane degradacije primenom tačne hromatografije sa UV i masenom detekcijom. Za optimizaciju analitičkih metoda koristi savremene statističke metode koje obuhvataju primenu hemometrije i multikriterijumskog optimizacionog pristupa.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Марија П. Малешевић

број индекса 90/06

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Мултикритеријумски приступ моделовања HPLC методе за одређивање
золпидем-тартарата и деградационих производа

- 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.

Маријешевитић М.

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Марија П. Малешевић

Број индекса 90/06

Студијски програм Фармацеутска хемија

Наслов рада Мултикритеријумски приступ моделовања HPLC методе за
одређивање золпидем-тартарата и деградационих производа

Ментор Проф. др Љиљана Живановић

Потписани/а Марија П. Малешевић

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.

Малешевић Ј.

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Мултикритеријумски приступ моделовања HPLC методе за одређивање золпидем-тартарата и деградационих производа

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.

Јанковић Ј.

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.