

UDK 615 (497.11)

ISSN 0004-1963 (Štampano izd.)
ISSN 2217-8767 (Online)

ARHIV ZA FARMACIJU

Godina 64

Broj 3

Beograd, 2014.

ČASOPIS SAVEZA FARMACEUTSKIH UDRUŽENJA SRBIJE

TEMATSKI BROJ - 2

SEPARACIONE METODE U KONTROLI LEKOVA

– IZAZOVI I MOGUĆNOSTI PRIMENE –

3/2014

SADRŽAJ – CONTENTS

Reč gostujućeg urednika

Pregledni radovi – Review articles

- **Jelena Terzić, Igor Popović, Biljana Jančić-Stojanović** 205

**Aspekti primene DryLab® softvera u optimizaciji i proceni
robustnosti hromatografskih metoda**

**Aspects of DryLab® software application in chromatography
methods optimization and robustness testing**

Originalni naučni radovi – Original scientific papers

- **Vladimir Dobričić, Sote Vladimirov, Olivera Čudina** 220

**Primena hromatografskih tehnika u optimizaciji procesa prečišćavanja
amida kortienske kiseline iz hidrokortizona i etil estra L-glicina**

**The application of chromatography techniques for the purification process
optimization of amide of hydrocortisone-derived cortienic acid and
ethyl ester of L-glycine**

- **Irena Kasagić-Vujanović, Biljana Jančić-Stojanović, Darko Ivanović** 230

**Studije forsirane degradacije amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata
primenom tečne hromatografije hidrofilnih interakcija**

**Study of forced degradation of amlodipine besylate and bisoprolol fumarate
by application of hydrophilic interaction liquid chromatography**

- **Biljana Otašević, Ana Protić, Jelena Golubović, Mira Zečević,
Milica Cerović, Ljubica Bralović** 247

**Razvoj metode čvrsto-tečne ekstrakcije za prečišćavanje mikofenolne kiseline
iz uzoraka salive**

**Analysis of mycophenolic acid from saliva samples after its purification
with the method of solid-liquid extraction**

Kratka saopštenja – Short communications

- Žarko Gagić, Branka Ivković, Katarina Nikolić, Danica Agbaba

261

Primena metoda tankoslojne hromatografije i hromatografije
na koloni u praćenju sinteze α -tokoferil-lizin estra

Application of thin layer and column chromatography in monitoring
the synthesis of α -tocopheryl-lysine ester

Stručni radovi – Professional papers

- Branka Ivković, Bojan Marković, Sote Vladimirov

271

Development and validation of RP-HPLC method for analysis
of multicomponent cough-cold syrup formulation

Razvoj i validacija RP-HPLC metode za analizu višekomponentnog
sirupa za kašalj

- Gordana Pejović

285

Značaj međulaboratorijskih uporednih ispitivanja za unapređenje
performansi rada laboratorija za kontrolu kvaliteta lekova

The importance of proficiency testing schemes for the performance
improvement of medicines quality control laboratories

Reč gostujućeg urednika

Separacione metode danas nesumljivo imaju najznačajniju ulogu u kontroli kvaliteta lekova. Gotovo sve farmaceutske supstance i farmaceutski proizvodi u svojoj kontroli imaju neku od separacionih metoda. Ako se kreće od sinteze farmaceutske supstance separacione metode imaju nezamenljivu ulogu u prečišćavanju i dobijanju proizvoda odgovarajućeg stepena čistoće. Dalje, sama kontrola farmaceutske supstance uključuje separacione metode za ispitivanje srodnih supstanci i za određivanje sadržaja, kao i za druga ispitivanja. Konačno, separacione metode su od posebnog značaja u kontroli gotovog farmaceutskog proizvoda, kao i u praćenju njegove stabilnosti. Razlog tome svakako leži u činjenici da se mnogobrojni analitički problemi upravo rešavaju separacionim metodama pri čemu najveću primenu imaju hromatografske metode.

Cilj tematskog izdanja dva broja časopisa *Arhiv za farmaciju* pod nazivom *Separacione metode u kontroli lekova – izazovi i mogućnosti primene* bio je da se kroz revijalne rade, originalne naučne rade, kao i stručne rade prikažu mogućnosti primene separacionih metoda u kontroli lekova. Tako se u revijalnom radu Terzić i autori navodi pregled primena DryLab® softvera u razvoju i proceni robusnosti metoda tečne hromatografije (eng. *Liquid Chromatography* – LC). Može se reći da razvoj novih hromatografskih metoda zauzima posebno mesto u kontroli lekova jer se na taj način obezbeđuje dobijanje rezultata ispitivanja visoke tačnosti i pouzdanosti. U tematskom izdanju *Separacione metode u kontroli lekova – izazovi i mogućnosti primene* ima više rada koji se bave razvojem novih hromatografskih metoda a čija je odgovarajuća primena potvrđena kroz postupak validacije. Tako je u radu Žirojević i autori prikazan razvoj i validacija UHPLC (eng. *Ultra High Performance Liquid Chromatography* – UHPLC) metode za određivanje okskarbamazepina i srodnih supstanci. Zatim, u radu Perović i autori prikazan je razvoj i validacija HPLC (eng. *High Performance Liquid Chromatography* – HPLC) metoda za analizu sulfametoksazola, trimetoprima, njihovih nečistoća i konzervansa u sirupu. Analiza višekomponentnog sirupa koji sadrži doksilamin-sukcinat, efedrin-hidrohlorid, dekstrometorfanshidrobromid, paracetamol i konzervans natrijum-benzoat novorazvijenom i validiranom HPLC metodom opisana je u radu Ivković i autori. Kao sastavni deo validacije izvodi se i procena robusnosti metode i preporučuje se njeno izvođenje nakon definisanja optimalnih hromatografskih uslova a pre ispitivanja ostalih parametara validacije. U radu Kojić-Marinković i autori prikazana je procena robusnosti HPLC metode za određivanje natrijum-valproata primenom metodologije eksperimentalnog dizajna. Metodologija eksperimentalnog dizajna primenjena je i u proceni variranja položaja pikova na primeru bisoprolola i njegovih nečistoća analiziranih u sistemu tečne hromatografije hidrofilnih interakcija (eng. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* – HILIC) što je sistematično prikazano u radu Rakić i autori. Sasvim sigurno, metode tečne hromatografije omogućavaju da se dođe do veoma značajnih podataka u različitim aspektima procene stabilnosti. Samo rezultati dobijeni tačnim i proverenim metodama mogu biti pouzdani i

dovesti do odgovarajućih zaključaka. Jedan od takvih primera je dat u radu Ivković i autori u kome je opisano praćenje stabilnosti montelukasta u rastvoru primenom LC metode. Drugi primer primene LC metode u praćenju stabilnosti jeste rad u kome su proizvodi dobijeni nakon studija forsirane degradacije na amlodipin-besilatu i bisoprolol-fumaratu praćeni HILIC metodom (Kasagić-Vujanović i autori).

U radovima Dobričić i autori, kao i Gagić i autori prikazan je značaj hromatografskih metoda u fazama prečišćavanja leka, kao i procesu praćenja sinteze lekova. U radu Dobričić i autori prikazan je značaj i primena hromatografskih metoda za prečišćavanje amida kortijske kiseline iz hidrokortizona i etilestra L-glicina, dok je u radu Gagić i autori prikazana primena tankslojne hromatografije i hromatografije u koloni u praćenju sinteze α -tokoferil-lizin estra.

Očigledno je da su u ova dva tematska broja *Arhiva za farmaciju* prikazane brojne primene separacionih metoda u kontroli lekova. Međutim, značaj separacionih metoda ogleda se i u različitim fazama primene leka. Tako je u radu Bogdanovska i autori prikazana primena HPLC metode u određivanju hlorheksidina u gingivalnoj tečnosti nakon lokalne primene biodegradabilnog terapijskog sistema dok je u radu Otašević i autori opisana primena HPLC metode za praćenje ekstrakcije mikofenolne kiseline iz salive.

Na kraju, laboratorije za kontrolu kvaliteta lekova neprestano moraju unapređivati performanse svog rada što se radi kroz međulaboratorijska uporedna ispitivanja što je na jasan i detaljan način opisano u radu autora Pejović.

Konačno, može se reći da je nizom radova u ovom tematskom izdanju časopisa *Arhiv za farmaciju* pokazan značaj hromatografskih metoda u kontroli lekova, kao i u nekim aspektima primene leka. Kroz originalne naučne radove (Bogdanovska i autori, Žirojević i autori, Rakić i autori, Perović i autori, Kojić-Marinković i autori, Kasagić-Vujanović i autori, Dobričić i autori, Otašević i autori) ponuđena su nova naučna rešenja za određene definisane naučne ciljeve. Kratkim saopštenjima (Ivković i autori, Gagić i autori) prikazana su značajna naučna istraživanja, a koja predstavljaju neophodan deo daljih naučnih studija. Stručni radovi (Ivković i autori, Pejović) bave se određenim temama koje mogu biti od značaja za veliki deo čitalačke publike časopisa *Arhiv za farmaciju*.

Gostujući urednik

Doc. dr Biljana Jančić-Stojanović

Aspekti primene DryLab® softvera u optimizaciji i proceni robusnosti hromatografskih metoda

Jelena Terzić¹, Igor Popović^{1*}, Biljana Jančić-Stojanović²

¹ Agencija za lekove i medicinska sredstva Srbije, Vojvode Stepe 458,
11221 Beograd, Srbija

² Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za analitiku lekova,
Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija

*autor za prepisku: Igor Popović; Tel: +381 11 3951 146; e-mail: igor.popovic@alims.gov.rs

Kratak sadržaj

U preglednom radu prikazani su aspekti primene DryLab® softvera u tečnoj hromatografiji. Literurni pregled pokazuje široku primenu softvera u fazi postavljanja nove hromatografske metode, optimizaciji, kao i u proceni robusnosti metode. Ranije verzije DryLab® softvera omogućavale su istovremeno praćenje uticaja dva faktora na odabrani odgovor sistema, dok unapredene verzije softvera daju značajno veće mogućnosti. Novije verzije DryLab® softvera omogućavaju ispunjavanje zahteva određenih *Quality by Design* (QbD) konceptom kroz sistematičan prilaz razvoju hromatografske metode, kao i kroz konstruisanje 3D kocke kojom se omogućava vizuelni prikaz *Design space-a*. Pored toga, u rutinskoj primeni metoda tečne hromatografije softver može biti koristan „alat“ za optimizaciju u cilju skraćenja retencionih vremena i trajanja analize, kao i olakšavanja transfera metoda (podaci dobijeni uz pomoć DryLab®-a se mogu slati elektronskim putem). Na kraju, upotrebori DryLab® softvera dobijaju se korisne informacije o metodi, a uz to može služiti za obučavanje mladih analitičara bez izvođenja eksperimenata, uz istovremenu uštedu vremena, novca i laboratorijske opreme.

Ključne reči: DryLab®, tečna hromatografija, optimizacija, robusnost, QbD

Uvod

U toku razvoja leka javlja se potreba za hromatografskim metodama osetljivim na promenu profila nečistoća leka kandidata usled promena sintetskog puta aktivne supstance i (ili) formulacije leka. Iz tog razloga potrebno je postaviti takvu hromatografsku metodu koja će imati veliku osetljivost i selektivnost čime će se obezbediti odgovarajuće ispitivanje leka tokom svih faza razvoja, proizvodnje i praćenja stabilnosti. U literaturi je opisano više pristupa razvoju hromatografskih metoda. Kod tradicionalnog pristupa razvoju metode poznatog i kao „pokušaj i greška”, specifičnost i robusnost metode tečne hromatografije pod visokim pritiskom (eng. *High Performance Liquid Chromatography Method* – HPLC) zavisi od znanja i sposobnosti analitičara, a razvoj metode je dug i naporan proces čak i za najiskusnije analitičare. Naime, tokom postavljanja nove HPLC metode koriste se kolone različitih karakteristika, različite vrste i udeli organskog rastvarača, kao i različiti dodaci u vodenu fazu kao što su jon-par reagensi, puferi, različite kiseline za podešavanje pH vrednosti mobilne faze, itd. što je zahtevno sa aspekta utroška vremena i resursa. Da bi se poboljšala efikasnost razvoja metode i obezbedila veća količina podataka o njenoj specifičnosti, danas je razvijeno i komercijalno dostupno više softvera [1]. Jedan od tih softvera je DryLab® (Molnar Institute, Berlin, Nemačka) koji je u upotrebi od 1986. godine i u ovom radu će i biti opisana njegova primena u optimizaciji i proceni robusnosti hromatografskih metoda koje se koriste u kontroli lekova.

DryLab® softverski paket koristi se za eksperimentalno modelovanje i podrazumeva predviđanje, tj. simulaciju hromatografskog ponašanja sistema na jednoj stacionarnoj fazi na osnovu malog broja prethodno dobro definisanih eksperimentalnih parametara (način eluiranja – izokratsko ili gradijentno, sastav mobilne faze, protok mobilne faze, temperatura kolone, pH mobilne faze, zatim karakteristike punjenja kolone – dužina i dijametar kolone, kao i dimenzije čestica stacionarne faze). Na ovaj način postiže se ušteda vremena kako pri optimizaciji metoda, tako i u njihovoј rutinskoj primeni uz smanjenje utroška resursa (skupe laboratorijske opreme – instrumenata, kolona, rastvarača...). Pored toga, primena ovog softvera olakšava transfer analitičkih metoda, brzo pruža korisne informacije o efektima promena hromatografskih faktora, ukazuje na to na koje faktore su odgovori sistema osetljiviji od drugih, a koje promene se mogu učiniti bez uticaja na kvalitet metode. Transfer analitičkih metoda između dve laboratorije predstavlja dokumentovan proces koji ima za cilj da pokaže da je laboratorija „primalac” (*the receiving unit*) kvalifikovana za korišćenje analitičke procedure koja potiče iz druge laboratorije (*the transferring unit* ili *the sending unit*). Najnovija primena ovog softvera ogleda se u mogućnosti procene robusnosti metode uz definisanje i vizuelni prikaz *Design Space-a*, kombinaciju značajnih ulaznih i procesnih parametara koji obezbeđuju kvalitet u proceni i optimizaciji metoda, što se danas

smatra posebno značajnim i korisnim sa aspekta uvođenja *Quality by Design* (QbD) koncepta u metode koje se koriste za kontrolu lekova.

Cilj ovog rada je da se prikaže pregled publikovanih radova koji opisuju upotrebu DryLab® softverskog paketa u postavljanju hromatografskih metoda od 2000. godine do danas. Pored toga, prikazan je i pregled radova u kojima je opisana primena softvera u proceni robusnosti metoda i novom trendu dizajniranja *Design Space-a*. Do danas je objavljeno preko 180 radova u kojima je uspešno korišćen DryLab® softver u različitim naučnim disciplinama. Ovde će biti opisani radovi koji pokazuju uspešnu primenu DryLab® softvera za optimizaciju i procenu robusnosti hromatografskih metoda koje se koriste u kontroli lekova.

Teorijska osnova

Teorijsku osnovu DryLab® softvera čini proučavanje termodinamičke slobodne energije hromatografskog sistema i definisanje tzv. „solvolobnih retencionih snaga“ [2]. Prva teorija koja objašnjava mehanizme retencionog zadržavanja i kako različiti parametri mobilne faze i same supstance utiču na retencionalno ponašanje u hromatografiji reverznih faza je solvolobna teorija profesora Csaba Horvath, Yale University. Solvolobna teorija bila je prvi model koji opisuje hromatografsko ponašanje supstanci koristeći principe klasične termodinamike. Prema teoriji, hromatografski proces je predstavljen kao reverzibilno vezivanje molekula analita sa ugljovodničnim ligandima na površini stacionarne faze. Na vezivanje dominantan uticaj ima mobilna faza, pre nego same privlačne sile između analita i liganda, a sila koja je odgovorna za vezivanje je smanjivanje nepolarne površine izložene mobilnoj fazi [3].

Solvolobna teorija se zasniva na sledećem principu: najpre se ceo hromatografski proces podeli na dva procesa, a zatim izračuna retencionalna slobodna energija $\Delta F_{\text{assoc}}^{\circ}$ kao zbir promene standardne slobodne energije usled procesa solvatacije ΔF_j° , kao i promene standardne slobodne energije usled procesa adsorpcije analita na alkil grupe stacionarne faze $\Delta F_{\text{vdw,assoc}}^{\circ}$ [4].

Proces solvatacije sastoji se iz tri procesa i to:

1. formiranja „šupljina“ u mobilnoj fazi u cilju „prihvatanja“ molekula analita $\Delta F_{c,j}$;
2. smanjenja slobodne zapremine i
3. interakcija molekula analita u „šupljinama“ sa molekulima rastvarača iz njihove okoline $\Delta F_{i,j}$ [4].

Sve ove interakcije dovode do promene slobodne energije retencionog procesa opisane jednačinom (1.1.):

$$\Delta F_{\text{assoc}}^{\circ} = \Delta F_{\text{vdw, assoc}}^{\circ} + (\Delta F_{c,SL} + \Delta F_{i,SL}) - (\Delta F_{c,S} + \Delta F_{i,S}) - (\Delta F_{c,L} + \Delta F_{i,L}) - RT \ln(RT/P_0V) \quad (1.1.)$$

Iz jednačine (1.1.) izvedena je jednačina (1.2.) za retencioni faktor, merljivi hromatografski parametar:

$$\ln k = A + BD + C\Delta A + D(\kappa^e - 1)V^{2/3}\gamma + E + \ln(RT/P_0V) \quad (1.2.)$$

Značenje članova u jednačini:

S – analit,

L – ligand,

SL – analit ligand kompleks,

k – retencioni faktor ili faktor kapaciteta,

A i C – konstante koje se određuju eksperimentalno,

BD – elektrostatički izraz ($D \approx 1$),

ΔA – površina solvofobnog kontakta između analita (*solute* - S) i liganada sa površine stacionarne faze (L),

γ – površinski napon,

R – gasna konstanta,

T – temperatura,

P_0 – atmosferski pritisak,

V – molarna zapremina rastvarača,

κ^e – molekularni parametar analita [3].

Jednačina (1.2.) opisuje uticaj različitih faktora na retencioni faktor k i to: uticaj mobilne faze preko površinskog napona γ koji zavisi od sastava mobilne faze, zatim uticaj temperature, uticaj strukture analita i njegovog dipol momenta, vrsta stacionarne faze, uticaj elektrostatskih osobina i slobodnih energija [2].

Solvofobna teorija je kritikovana zbog fokusa na ulogu mobilne faze u retencionom ponašanju, ne uzimajući u obzir osobine stacionarne faze. Da bi se prevazišao pomenuti nedostatak ove teorije, osobine stacionarne faze pažljivo su proučavane i implementirane u DryLab® softver.

DryLab® softver zasniva se na solvofobnoj teoriji uz primenu egzo-termodinamičkih modela koji predstavljaju linearne funkcije zavisnosti $\ln k$ od parametara analita i eksperimentalnih promenljivih koje nisu termodinamičke. Egzo-termodinamička zavisnost, koja se odnosi na retenciono zadržavanje analita, predstavljena je tzv. *Linear Free Energy Relationship* – LFER, koju čine:

Ulazni hromatografski podaci za DryLab® softver

Da bi se dobili optimalni uslovi, DryLab® zahteva unos retencionih vremena i površine pikova komponenti uzorka iz inicijalnih hromatografskih analiza. Praćenje pikova (eng. *peak tracking*) je opcija softvera koja predstavlja automatsko prepoznavanje pikova komponenti u dve ili više hromatografskih analiza na osnovu njihove površine. Praćenje pikova se može izvesti jednostavno i tačno uz pomoć površine pikova ukoliko je injekcioni volumen uzorka konstantan pri izvođenju osnovnih eksperimenata (*basic runs*).



Slika 1. Praćenje pikova (Peak Tracking)

(http://molnarinstitute.com/fileadmin/user_upload/images/02_molnar_software_screen_preakmatch_BIG.png)

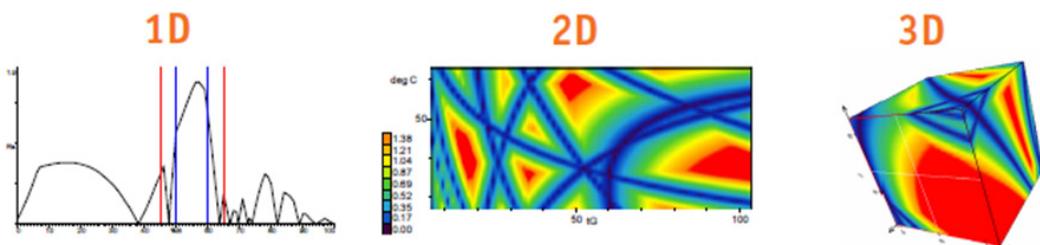
Figure 1. Peak Tracking

(http://molnarinstitute.com/fileadmin/user_upload/images/02_molnar_software_screen_preakmatch_BIG.png)

Na Slici 1. je ilustrovano pomeranje pikova u 4 „run”-a u zavisnosti od hromatografskih uslova, a identifikaciju pikova je moguće izvršiti na osnovu površine koja je označena iznad svakog od pikova. Promena površine ukazuje na moguće preklapanje pikova. Pogrešno prepoznavanje pikova između hromatografskih analiza može rezultirati pogrešnim razumevanjem hromatografskog razdvajanja i ovo

predstavlja najbitniji korak u dobijanju pouzdanih rezultata. Za proces praćenja pikova bitno je odabrati kolonu sa velikim brojem teorijskih platoa. Takođe, od presudne važnosti za praćenje pikova jeste odabir optimalnog detektora. Problemi koji se mogu javiti u procesu identifikacije pikova su: promene u retencionom vremenu, pikovi slične površine, veliki broj komponenti, nepoznati uzorak bez odgovarajućih standarda. Zbog svega navedenog poželjno je injektovati istu zapreminu uzorka u svakom inicijalnom hromatografskom eluiranju i čuvati uzorak u ledenoj vodi između dva injektovanja.

S druge strane, softverski paket DryLab® za potrebe generisanja modela, osim retencionih vremena i površine pikova komponenti smeše, zahteva i poznavanje karakteristika hromatografske kolone (dužina, dijametar, veličina čestica stacionarne faze); zatim protoka mobilne faze, temperature, sastava mobilne faze (sadržaj organskog rastvarača i sadržaj vodene faze sa koncentracijom modifikatora, npr. trietilamina ili koncentracija fosfatnog pufera), kao i pH vrednost mobilne faze. Generisani model hromatografskog ponašanja uzorka predstavlja se kritičnom rezolucionom mapom (*Critical Resolution Map – CRM*). Po definiciji kritična rezolucija je najmanja vrednost faktora rezolucije Rs između dva analita koji se najlošije razdvajaju (kritični par). Unosom rezultata inicijalne hromatografske analize softver izračunava kritičnu vrednost faktora rezolucije i predstavlja je grafički u funkciji jednog parametra (1D rezolucionu mapu) gde je vrednost kritične vrednosti faktora rezolucije predstavljena na y-osi, dva parametra (2D rezolucionu mapu) u kojoj je kritična vrednost faktora rezolucije predstavljena površinom odgovarajuće boje na dvodimenzionalnom grafiku zavisnosti dva ispitivana parametra i tri parametra (3D rezolucionu mapu – 3D kocka) gde je kritična vrednost faktora rezolucije predstavljena odgovarajućom bojom kako na površini, tako i u unutrašnjosti „kocke“ (Slika 2).



Slika 2. Primer 1D, 2D i 3D mapa kritičnih rezolucija (modela) (http://www.lab-comp.hu/moduledata/foldertree/treeroot/Image_gallery/Termeket/DryLAb_2010_kromatografias_szoftver/DryLab_2010.pdf)

Figure 2. Examples of 1D, 2D and 3D models (http://www.lab-comp.hu/moduledata/foldertree/treeroot/Image_gallery/Termeket/DryLAb_2010_kromatografias_szoftver/DryLab_2010.pdf)

Crvenom bojom označena su polja gde je postignuta odgovarajuća separacija, dok plava boja označava uslove u kojima dolazi do koeluiranja. Iz rezolucionih mapa mogu se sagledati uslovi za robusnost metode.

Nove mogućnosti softvera

Od 2009. godine sa verzijom DryLab® v. 3.9 uvodi se mogućnost istovremene optimizacije tri kritična parametra predstavljena trodimenzionalnim rezolucionim mapama – 3D kocka (*3D Cube*). Ova pogodnost pokazala se posebno primenjivom za skraćenje vremena izvođenja metoda opisanih u starijim izdanjima farmakopeja, kao što je to pokazao Schmidt skraćenjem vremena trajanja metode za ispitivanje stepena čistoće ebastina i njegovih farmaceutskih oblika sa 160 minuta na 3 minuta, korišćenjem DryLab® 4 softvera i UHPLC (eng. *Ultra High Performance Liquid Chromatography*) sistema [5].

DryLab® se pokazao poslednjih godina kao jako koristan „alat” za inkorporiranje QbD principa u razvoju analitičkih metoda, jer omogućava vizuelni prikaz *Design Space-a*, regiona u kome promene parametara metode neće uticati na njihove rezultate, kako je definisano ICH (eng. *International Conference on Harmonization*) smernicom za kvalitet Q8 (R2) [6].

Aspekti primene DryLab® softvera

Odabrani radovi od 2000. godine pa do danas, u kojima je DryLab® korišćen u fazi razvoja HPLC metoda za skrining, optimizaciju, procenu robusnosti i definisanje *Design Space-a* prikazani su u Tabeli I.

Tabela I Odabrani radovi sa primenom DryLab® softvera u tečnoj hromatografiji (HPLC i UHPLC)

Table I Selected papers with application of DryLab® software in liquid chromatography (HPLC and UHPLC)

ISPITIVANI FAKTORI	PRIMENA HPLC/UHPLC METODE	CILJ PRIMENE DRYLAB SOFTVERA	REF.
1. tG, T 2. T, %B 3. pH, tG 4. tG, T	1. UHPLC – ispitivanje stepena čistoće etinilestradiola u tabletama 2. UHPLC – kontrola procesa čišćenja u proizvodnji, uzorak od rezidua 7 steroidnih hormona – neutralne supstance 3. UHPLC – ispitivanje stepena čistoće duloksetina u kapsulama – bazne supstance 4. UHPLC – ispitivanje stepena čistoće tableta bikalutamida – polarne neutralne supstance	Optimizacija	[7]
tG, T, pH, %B	HPLC metoda za određivanje moksifloksacina i nečistoća u farmaceutskim oblicima (tableta i infuzija)	Optimizacija	[8]
pH	HPLC metoda za određivanje trimetazidin-dihidrohlorida i nečistoća u tabletama	Optimizacija	[9]
%B, pH	HPLC metoda za određivanje lerkanidipina i nečistoća u API i farmaceutskim oblicima	Optimizacija	[10]
tG, tC (B1/B2 – acetonitril/metanol)	HPLC metoda za razdvajanje smeše 8 komponenti (aktivna supstanca i 7 nečistoća)	Optimizacija	[11]
T, %B, tG	HPLC	Rešavanje problema neočekivanih hromatografskih rezultata (greske u programiranju gradijenta)	[12]
T, %B, pH i koncentracija pufera	HPLC metoda za razdvajanje smeše 9 organskih kiselina	Optimizacija	[13]
pH, %B	HPLC metoda za razdvajanje abakavira, lamivudina i zidovudina u Trizivir tabletama	Optimizacija	[14]
T, pH	HPLC metoda za razdvajanje roksitromicina od roksitromicina G i drugih srodnih supstanci	Optimizacija	[15]
T, %B	HPLC metoda za razdvajanje smeše supstanci steroidne strukture		[16]

ISPITIVANI FAKTORI	PRIMENA HPLC/UHPLC METODE	CILJ PRIMENE DRYLAB SOFTVERA	REF.
Optimizacija: tG, T, %B, pH Robusnost: tG, T, tC (% 2-propanola u acetonitrilu), protok mobilne faze, %B na početku i kraju gradijenta	UHPLC metoda za ispitivanje stepena čistoće ebastina i farmaceutskih oblika sa ovom aktivnom supstancom	Skrining, optimizacija, procena robusnosti, definisanje <i>Design Space-a</i>	[5]
Optimizacija: tG, T, pH (3D <i>Design Space</i>) koncentracija jon-par reagensa i jonska jačina rastvarača (2D <i>Eluent Design Space</i>) Robusnost: tG, T, pH, protok mobilne faze, %B na početku i kraju gradijenta	HPLC metoda za ispitivanje sadržaja i stepena čistoće pramipeksola	Procena robusnosti i definisanje <i>Design Space-a</i> u svrhu adaptacije farmakopejske metode	[17]
tG, T, pH	UHPLC metoda za ispitivanje stepena čistoće amlodipina	Optimizacija	[18]
tG, pH, T, tC (B1/B2 – acetonitril/metanol)	UHPLC metoda za ispitivanje stepena čistoće amlodipina	Optimizacija	[19]
tG, T, tC (B1/B2 – acetonitril/metanol)	HPLC metoda za razdvajanje smeše 7 hidrosolubilnih vitamina (B1, B2, B6, B12, C, PABA i PP)	Optimizacija, definisanje <i>Design Space-a</i>	[20]
Optimizacija: tG, T, pH Robusnost: tG, T, pH, protok mobilne faze, %B na početku i kraju gradijenta	UHPLC metoda za istovremeno određivanje sadržaja dve aktivne supstance i njihovih nečistoća u kapima za oči	Optimizacija, Definisanje <i>Design Space-a</i> i procena robusnosti	[21]
tG, T, pH	HPLC metoda za razdvajanje smeše ftalne kiseline, vanilinske kiseline, izovanilinske kiseline, aspirina, furosemida, doksepina, terbinafina, atorvastatina i klopidogrela	Optimizacija, definisanje <i>Design Space-a</i>	[22]
tG, T, pH, tC (B1/B2 – acetonitril/metanol)	HPLC metoda za razdvajanje smeše 11 supstanci i njihovih nečistoća	Optimizacija, definisanje <i>Design Space-a</i>	[23]

tG – trajanje gradijentnog eluiranja, T – temperatura, tC – sastav trokomponentne mobilne faze (*ternary composition*), %B – udeo organskog rastvarača u mobilnoj fazi, pH – pH vodene faze, API – aktivna supstanca (eng. *Active Pharmaceutical Ingredient*), HPLC (eng. *High Performance Liquid Chromatography Method*), UHPLC (eng. *Ultra High Performance Liquid Chromatography Method*)

Iz podataka prikazanih u Tabeli I može se zaključiti da su najčešće ispitivani parametri: temperatura kolone, pH vodene faze, vreme trajanja gradijentnog eluiranja, udeo organskog rastvarača u mobilnoj fazi, kao i sastav trokomponentne mobilne faze.

U radovima publikovanim pre pojave nove verzije softvera DryLab® v. 3.9 bilo je moguće istovremeno ispitivati najviše 2 faktora, što se i može videti analizom radova [7–16]. U navedenim radovima, softver je korišćen za optimizaciju UHPLC [7] i HPLC metoda [8–16]. U radu [7] prikazan je razvoj 4 UHPLC metode primenom DryLab® 2010 softvera, pri čemu su na efikasan način postignuti unapred zadati ciljevi za svaku od metoda. U zavisnosti od metode praćena su po dva različita faktora – za metodu za određivanje nečistoća u tabletama etinilestradiola i za metodu za određivanje bikalutamida praćeni su trajanje gradijenta i temperatura kolone, zatim za kontrolu procesa čišćenja u proizvodnji, gde su praćene rezidue 7 steroidnih hormona, kao faktori praćeni su temperatura kolone i udeo organskog rastvarača, dok je za razdvajanje duloksetina i njegove tri nečistoće praćena pH vrednost mobilne faze i program gradijenta [7]. Za određivanje moksifloksacina i nečistoća u farmaceutskim oblicima u cilju dobijanja 2D rezolucionih mapa razmatrane su sledeće kombinacije faktora: vreme gradijenta i sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, vreme gradijenta i temperatura, kao i sastav eluenta i pH [8]. Takođe, mogu se naći radovi gde je posmatran samo jedan faktor, kao što je to u radu [9], gde je pri optimizaciji LC metode za određivanje trimetazidina i njegovih nečistoća kao faktor praćena pH vrednost vodene faze, a na osnovu dobijene rezolucione mape određen je optimalan region, kao i region u kome je metoda robusna. Metoda tečne hromatografije za praćenje lerkanidipina i nečistoća uspešno je optimizirana primenom DryLab® 2000 softvera, a praćeni su udeo acetonitrila u mobilnoj fazi i pH mobilne faze [10]. Praćenje trajanja gradijentnog eluiranja i sastava trokomponentne mobilne faze pomoću DryLab® 2000 plus v. 3.5 softvera opisano je u referenci [11] koja prikazuje optimizaciju HPLC metode za ispitivanje aktivne supstance i njenih sedam nečistoća. Takođe, publikovan je i rad sa primenom softvera za rešavanje problema neočekivanih hromatografskih rezultata (greške u programiranju gradijenta) [12], kao i za rangiranje parametara prema uticaju na selektivnost metode [13] uz istovremeno praćenje po dva odabarana hromatografska faktora. U radovima [14–16] potvrđena je uspešna primena softvera za optimizaciju HPLC metoda za razdvajanje abakavira, lamivudina i zidovudina u tabletama [14],

zatim roksitromicina, njegovog homologa i srodnih supstanci [15], kao i za razdvajanje smeše steroidne strukture [16].

Navedeni radovi jasno govore u prilog uspešnoj primeni softvera tokom razvoja hromatografske metode, a potvrđuju i da se do optimalnih uslova može doći izvođenjem relativno malog broja eksperimenata. Osnovni nedostatak starijih verzija softvera ogledao se u činjenici da analitičar uvek mora da odabere dva faktora, a ostale da održava na konstantnom nivou, jer je mogućnost softvera bila samo u kreiranju 2D grafikona. Novi regulatorni zahtevi, koji se primarno ogledaju u ICH Q8 smernici koja nameće zahtev da se odgovarajućom strategijom kvalitet ugradi u sam proizvod, imali su uticaj i na pristup u razvoju metoda. Da bi metoda koja se koristi za praćenje proizvoda bila odgovarajućeg kvaliteta i davala reproduktivne i pouzdane rezultate potrebno je da i ona sama bude u skladu sa QbD konceptom. Upravo u tom pravcu je i išao dalji razvoj softvera čija je nova verzija potvrdila mogućnost razvoja metoda koje su u skladu sa QbD konceptom uz istovremenu mogućnost definisanja *Design Space* kao završni korak uspešnog razvoja metode. Nove mogućnosti softvera već su opisane u referenci [5], ali se potvrda uspešne primene nalazi i u referencama [17-23].

U radu [5] opisano je inkorporiranje *QbD* principa primenom DryLab® 4 softvera u razvoju UHPLC metode za ispitivanje stepena čistoće ebastina i njegovih farmaceutskih oblika. Primenom softvera omogućen je vizuelni prikaz *Design Space*-a, a studijom je potvrđeno da je postavljeni model za *Design Space* tačan sa relativnom greškom u predviđanju od svega 0,6 %. Pored značajnog smanjenja trajanja analize sa 160 minuta na 4 minuta pokazalo se da je postavljena metoda pogodna i za ispitivanje stabilnosti kako aktivne supstance, tako i odgovarajućih farmaceutskih oblika. U radu je softver korišćen za skrining i optimizaciju trajanja gradijenta, temperature, sastava mobilne faze i pH, kao i procenu robusnosti metode (ispitivano je 6 faktora na tri nivoa) [5]. Dalje, nova verzija DryLab® softvera (DryLab® 4) korišćena je između ostalog da bi se pokazale mogućnosti hromatografskog modelovanja u proceni robusnosti farmakopejske metode za ispitivanje stepena čistoće pramipeksola. U radu je iskorišćena nova opcija softvera *Robustness Module* za *in silico* procenu robusnosti metode [17].

U radovima [18, 19] opisana je uspešna primena nove verzije DryLab® softvera - DryLab® 2010 za razvoj hromatografske metode za određivanje amlodipina i nečistoća. Koristeći unapredenu verziju softvera praćena su tri faktora (trajanje gradijenta, temperatupe kolone i pH eluenta A) čime je omogućeno kreiranje 3D kocke i definsanje *Design Space*. U odnosu na farmakopejsku metodu postignuto je značajno skraćivanje vremena trajanja analize – razdvajanje je postignuto za 2 minuta, a potvrđena je i robusnost razvijene metode.

Uspešno kreiranje *Design Space* primenom softvera opisano je u referenci [20] koja navodi razvoj hromatografske metode za smešu sedam hidrosolubilnih vitamina pri

čemu su praćena tri faktora: vreme gradijenta, temperatura kolone i sastav mobilne faze. Primenom softvera uspešno su postignuti definisani ciljevi kao što su maksimalna separacija u najkraćem vremenu uz istovremenu mogućnost primene novorazvijene metode na komercijalno dostupnim preparatima.

DryLab® 2010 v.4.0 softver je korišćen za definisanje *Design Space-a*, optimizaciju i procenu robusnosti UHPLC metode za istovremeno određivanje sadržaja dve aktivne supstance i njihovih nečistoća u kapima za oči [21]. Radna tačka postavljena je na osnovu dva kriterijuma: da se nalazi u centru robusnog regiona koji se na grafičkom prikazu vidi kao region označen crvenom bojom i da mu je najkraće vreme izvođenja analize. Kao faktori praćeni su vreme gradijenta, temperatura kolone i pH vrednost mobilne faze.

Četiri kritična parametra – trajanje gradijentog eluiranja, temperatura, pH vrednost vodene faze (eluanta A) i stacionarna faza, procenjivana su u okviru implementacije *QbD* principa u razvoju HPLC metode za razdvajanje smeše 9 supstanci (ftalna kiselina, vanilinska kiselina, izovanilinska kiselina, aspirin, furosemid, doksepin, terbinafin, atorvastatin i klopidogrel) i definisanje *Design Space-a* uz pomoć softvera za modelovanje i baza podataka o stacionarnim fazama [22]. U ovom radu je *Design Space* podeljen na dva dela *Design Space* kolone i *Design Space* mobilne faze da bi se opisao uticaj stacionarne i mobilne faze na selektivnost. Najpre je odabrana odgovarajuća kolona uz pomoć ColumnMatch® softvera, a zatim je DryLab® korišćen za definisanje *Design Space-a* mobilne faze uz pomoć 3D rezolucione kocke. Došlo se do zaključka da kolone koje su se pokazale sličnim na osnovu pretraživanja baza, pokazuju i sličan *Eluent Design Space* [22].

Pregled radova u kojima su primenjene nove verzije DryLab® softvera pokazuje uspešnu primenu u dizajniranju *Design Space*. Kako novi trendovi u razvoju metoda nameću potrebu za tzv. naučno-zasnovanom pristupu može se zaključiti da je i u primeni samog softvera postignuto značajno unapređenje i omogućeno dobijanje velikog broja podataka koji su od značaja, a što je i potvrđeno nizom publikovanih radova. S obzirom da se uvođenje QbD koncepta sve više nameće kao sastavni deo razvoja, validacije i primene hromatografskih metoda očekivano je da će primenljivost DryLab® softvera vremenom biti u značajnom porastu.

Zaključak

U radu je prikazana primena DryLab® softvera u tečnoj hromatografiji. Literaturnim pregledom radova od 2000. godine uočena je sve veća primena softvera, zbog mogućnosti dobijanja značajne količine podataka (10^6 hromatograma iz svega 12 dobro isplaniranih eksperimenata) uz jako mali utrošak vremena i resursa. Vreme potrebno za razvoj metode korišćenjem DryLab®-a se može svesti na svega nekoliko dana, čak i sati, za šta su bili potrebni meseci tradicionalnim pristupom „pokušaja i

greške". Softver omogućava razvoj fleksibilnih metoda za rutinsku primenu u skladu sa kriterijumima QbD, olakšava transfer metoda i štedi vreme. Modelovanje je potpuno ekološki prihvatljivo, čak i poželjno, s obzirom da štedi energiju i smanjuje količinu otpada.

Literatura

1. Krisko RM, McLaughlin K, Koenigbauer MJ, Lunte CE. Application of a column selection system and DryLab software for high-performance liquid chromatography method development. *J Chromatogr A.* 2006;1122(1-2):186–93.
2. Molnár I. Computerized design of separation strategies by reversed-phase liquid chromatography: Development of DryLab software. *J Chromatogr A.* 2002;965(1-2):175–94.
3. Horváth C, Melander W, Molnár I. Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases. *J Chromatogr A.* 1976;125(1):129–56.
4. Nikitas P, Papa-Louisi A. Retention models for isocratic and gradient elution in reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2009;1216(10):1737–55.
5. Schmidt AH, Molnár I. Using an innovative Quality-by-Design approach for development of a stability indicating UPLC method for ebastine in the API and pharmaceutical formulations. *J Pharm Biomed Anal.* 2013;78–79:65–74.
6. ICHQ8 (R2) International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q8(R2): Pharmaceutical development (2009). http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q8_R1/Step4/Q8_R2Guideline.pdf.
7. Fekete S, Fekete J, Molnár I, Ganzler K. Rapid high performance liquid chromatography method development with high prediction accuracy, using 5 cm long narrow bore columns packed with sub-2 µm particles and design space computer modeling. *J Chromatogr A.* 2009;1216(45):7816–23.
8. Djurdjevic P, Cacic A, Djurdjevic A, Stankov MJ. Optimization of separation and determination of moxifloxacin and its related substances by RP-HPLC. *J Pharm Biomed Anal.* 2009;50:117–26.
9. Medenica MB, Ivanovic DP, Popovic IB, Malenovic AM, Jancic BS. Computer-assisted optimization and validation of LC analysis of trimetazidine dihydrochloride and its impurities. *J Chromatogr Sci.* 2008;46(5):430–35.
10. Popovic I, Ivanovic D, Medenica M, Malenovic A, Jancic B. LC Determination of lercanidipine and its impurities using DryLab software and experimental design procedures. *Chromatographia.* 2008;67:449–54.

11. Euerby MR, Scannapieco F, Rieger HJ, Molnár I. Retention modeling in ternary solvent gradient elution reversed phase chromatography using 30 mm columns. *J Chromatogr A*. 2006;1121(2):219–27.
12. Rieger HJ, Molnár I. Advanced high performance liquid chromatography method development: discovering unexpected choices in chromatography. *J Chromatogr A*. 2002; 948(1-2):43-9.
13. Jupille TH, Dolan JW, Snyder LR, Molnár I. Two-dimensional optimization using different pairs of variables for the reversed-phase high-performance liquid Chromatographic separation of a mixture of acidic compounds. *J Chromatogr A*. 2002;948(1-2):35-41.
14. Djurdjevic P, Laban A, Markovic S, Stankov MJ. Chemometric optimization of a RP-HPLC method for the simultaneous analysis of abacavir, lamivudine, and zidovudine in tablets. *Anal Lett*. 2004;37(13):2649–67.
15. Chepkwony HK, Kamau FN, Rodriguez E, Roets E, Hoogmartens J. Isocratic liquid chromatographic method for the nalysis of roxithromycin and structurally related substances in bulk samples. *Chromatographia*. 2001;54:725–9.
16. Pfeffer M, Windt H. Automatization for Development of HPLC methods. *Fresenius J Anal Chem*. 2001;369(1):36–41.
17. Schmidt AH, Stanic M, Molnár I. In silico robustness testing of a compendial HPLC purity method by using of a multidimensional design space build by chromatography modeling-Case study pramipexole. *J Pharm Biomed Anal*. 2014;91:97–107.
18. Kormány R, Molnár I, Rieger HJ. Exploring better column selectivity choices in ultra-high performance liquid chromatography using Quality by Design principles. *J Pharm Biomed Anal*. 2013;80:79-88.
19. Kormány R, Rieger HJ, Molnár I. Application of quality by design principles to a pharmaceutical sample using UHPLC method development with modeling technologies. *LCGC* 2013;31:20-27.
20. Wagdy HA, Hanafi RS, El-Nashar RM, Aboul-Enein HY. Determination of the design space of the HPLC analysis of water-soluble vitamins. *J Sep Sci*. 2013;36(11):1703-10.
21. Monks K, Molnár I, Rieger HJ, Bogáti B, Szabó E. Quality by Design: Multidimensional exploration of the design space in high performance liquid chromatography method development for better robustness before validation. *J Chrom A*. 2012;1232:218-30.
22. Monks KE, Rieger HJ, Molnár I. Expanding the term "Design Space" in high performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal*. 2011;56(5):874-9.
23. Molnár I, Rieger HJ, Monks KE. Aspects of the “Design Space” in high pressure liquid chromatography method development. *J Chromatogr A*. 2010;1217(19):3193–200.

Aspects of DryLab® software application in chromatography methods optimization and robustness testing

Jelena Terzić¹, Igor Popović^{1*}, Biljana Jančić-Stojanović²

¹Medicines and Medical Devices Agency of Serbia, Vojvode Stepe 458,
11221 Belgrade, Serbia

²University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Department of Drug Analysis,
Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

*corressponding author, Tel: +381 11 3951 146; e-mail: igor.popovic@alims.gov.rs

Summary

In this review article, aspects of DryLab® software application in liquid chromatography are given. Literature survey shows wide application of software for chromatography method development, optimization, as well as for robustness testing. Earlier versions of DryLab® software enabled the simultaneous monitoring of the impact of two parameters on the selected system response, as an upgraded version of the software provides significantly more opportunities. Namely, the new DryLab® software version enables fulfilling requirements given by Quality by Design (QbD) concept through a systematic approach to the development of chromatographic methods, and the construction of a 3D cube which provides the visualization of a Design Space. In addition, when running liquid chromatography methods on a routine basis software can be a useful tool for optimization process in order to minimize retention times and run time, as well as facilitating the transfer of a method (DryLab® data can be sent electronically). Finally, DryLab® software provides useful information about the method and can be applied to training of young analysts without performing experiments, while saving time, money, and laboratory instruments.

Keywords: DryLab®, liquid chromatography, optimization, robustness, QbD

Primena hromatografskih tehnika u optimizaciji procesa prečišćavanja amida kortienske kiseline iz hidrokortizona i etil estra L-glicina

Vladimir Dobričić*, Sote Vladimirov, Olivera Čudina

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za farmaceutsku hemiju,
Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija

*Autor za prepisku, e-mail: vladimir@pharmacy.bg.ac.rs

Kratak sadžaj

Soft („*antedrug*“) glukokortikoidi su farmakološki aktivna jedinjenja koja se biotransformišu na predvidiv i kontrolisan način do neaktivnih i netoksičnih metabolita. Amidi kortienskih kiselina (17β -karboksamidni derivati glukokortikoida) su potencijalni soft lekovi sa manje neželjenih efekata u odnosu na konvencionalne glukokortikoide. Prečišćavanje 17β -karboksamidnih derivata hidrokortizona je prikazano na primeru amida kortienske kiseline iz hidrokortizona i etil estra L-glicina i vrši se primenom hromatografije na koloni i preparativne tankoslojne hromatografije (TLC). Optimizacija procesa prečišćavanja je izvršena primenom analitičke TLC i reverzno-fazne tečne hromatografije pod visokim pritiskom (RP-HPLC). Mobilna faza koja omogućuje najbolje hromatografsko razdvajanje amida od nečistoća na TLC pločici (hloroform-metanol (95:5 V/V) je odabrana i izvršena je njen modifikacija (smanjenje polarnosti, odnosno dodatak glacijalne sirčetne kliseline) u cilju prečišćavanja hromatografijom na koloni, odnosno preparativnom TLC. Primenom RP-HPLC je potvrđeno da su navedeni postupci prečišćavanja omogućili dobijanje amida stepena čistoće 96,2 %.

Ključne reči: 17β -karboksamidni derivati hidrokortizona, analitička TLC, RP-HPLC, hromatografija na koloni, preparativna TLC.

Uvod

Koncept *soft* lek se prvi put pominje 1980. godine kao deo retrometaboličkog pristupa u dizajniranju farmakološki aktivnih jedinjenja sa manje neželjenih efekata [1-5]. *Soft* („*antedrug*“) glukokortikoidi su estri kortienske kiseline (loteprednol etabonat i etiprednol dikloacetat), kao i estri i amidi kiselina dobijenih oksidacijom glukokortikoida na položajima C6, C17 i C21. Ova jedinjenja se biotransformišu na predvidiv i kontrolisan način do neaktivnih i netoksičnih metabolita [6, 7].

Do sada je sintetisano nekoliko grupa amida kortienskih kiselina (17β -karboksamidnih derivata glukokotikoida) i alkil, cijanoalkil, oksialkil, aminoalkil i aromatičnih amina [8-10]. Ova jedinjenja mogu biti agonisti, parcijalni agonisti ili antagonisti glukokortikoidnih receptora, što zavisi od prirode njihovog bočnog niza. Prisustvo grupe u bočnom nizu koje mogu da ostvaruju vodonične veze sa glukokortikoidnim receptorom je neophodno da bi ova jedinjenja delovala kao agonisti. Formstecher i saradnici su ispitivali afinitet za glukokortikoidni receptor i antiglukokortikoidnu aktivnost serije 17β -karboksamidnih derivata deksametazona [10]. Najizraženiju antiglukokortikoidnu aktivnost poseduju derivati koji u bočnom nizu imaju alkil ili aril supstituente, bez prisustva grupe koja bi mogle da stvaraju vodonične veze sa receptorom. Zajedničko za deriveate koji ispoljavaju glukokortikoidnu aktivnost i deriveate koji ispoljavaju antiglukokortikoidnu aktivnost je da se povećanjem afiniteta za receptor povećava i biološka aktivnost jedinjenja. Toksičnost i metabolizam jedinjenja koja pokazuju glukokortikoidnu aktivnost nisu ispitani, tako da za sada nema potvrde da i ovi derivati glukokortikoida spadaju u *soft* lekove.

Sinteza 17β -karboksamidnih derivata hidrokortizona se vrši primenom 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimida (EDC), N-hidroksibenzotriazola (HOBr) i trietilamina (TEA) iz odgovarajuće kortienske kiseline i aminokiselina [11]. Čistoća reakcione smeše zavisi od više faktora: vremena trajanja reakcije, temperature, količine upotrebljenih reaktanata i katalizatora. Najveći problem prilikom prečišćavanja sintetisanih jedinjenja predstavljaju neizreagovali EDC, derivat uree koji nastaje iz EDC po završetku reakcije, kao i sporedni proizvodi slične strukture i fizičkohemijskih osobina kao 17β -karboksamidni derivati hidrokortizona. Stoga, neophodno je pronalaženje optimalnih hromatografskih uslova kako bi se izvršilo prečišćavanje reakcione smeše hromatografijom na koloni i preparativnom tankoslojnom hromatografijom (*Thin Layer Liquid Chromatography - TLC*).

Cilj ovog rada je da se prikaže primena hromatografskih tehnika u optimizaciji procesa prečišćavanja 17β -karboksamidnih derivata hidrokortizona na primeru amida kortienske kiseline iz hidrokortizona i etil estra L-glicina (HEG). Optimizacija uslova prečišćavanja hromatografijom na koloni i preparativnom TLC je izvršena primenom analitičke TLC i reverzno-fazne tečne hromatografije pod visokim pritiskom

(*Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography* - RP-HPLC). Ispitivanje stepena čistoće sintetisanog amida izvršeno je primenom RP-HPLC.

Eksperimentalni deo

Materijali

U cilju optimizacije uslova prečišćavanja amida primenom analitičke TLC korišćen je TLC silikagel 60 F254 na aluminijumskim pločama (Merck, Darmstadt, Nemačka). Za prečišćavanje sintetisanog amida korišćeni su silikagel za hromatografiju na koloni (veličina čestica: 0,063-0,200 mm; Merck, Darmstadt, Nemačka), silikagel F254 za preparativnu TLC (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka), hloroform (JT Baker, Loughborough, Velika Britanija), metanol (JT Baker, Loughborough, Velika Britanija) i glacijalna sirćetna kiselina (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka). Za ispitivanje stepena čistoće amida primenom RP-HPLC korišćeni su acetonitril HPLC čistoće (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka) i dejonizovana voda (TKA sistem za prečišćavanje vode, Niederelbert, Nemačka).

Prečišćavanje reakcione smeše primenom hromatografije na koloni

17β -karboksamidni derivati hidrokortizona su sintetisani primenom EDC, HOBT i TEA prema postupku opisanom u literaturi [11].

U prvoj fazi prečišćavanja primenjena je hromatografija na koloni. Odmereno je 7 g silikagela za hromatografiju na koloni i suspendovano u odgovarajućoj mobilnoj fazi. Ovako pripremljena suspenzija kvantitativno je preneta u vertikalno postavljenu staklenu kolonu dužine 54 cm. Uparena reakcionala smeša (oko 80 mg) se rastvori u mobilnoj fazi i kvantitativno prenese u kolonu na površinu suspenzije silikagela. Prečišćavanje se vrši kontinuiranim dodavanjem mobilne faze u kolonu i prikupljanjem eluata u obliku većeg broja frakcija male zapremine (2-4 mL). Frakcije koje sadrže amid se spajaju, uparavaju do suva, nakon čega se vrši prečišćavanje primenom preparativne TLC.

Prečišćavanje reakcione smeše primenom preparativne TLC

U drugoj fazi prečišćavanja korišćena je preparativna TLC. Odmereno je 20 g silikagela za preparativnu TLC (sa fluorescentnim indikatorom F254) i suspendovano u 55 mL destilovane vode. Dobijena suspenzija je razlivena na staklenu ploču dimenzije 20 X 20 cm i ostavljena jedan dan da se osuši na sobnoj temperaturi. Pre upotrebe, ovako pripremljena ploča se aktivira sušenjem na 105 °C u toku 2 h. Uzorak (oko 30 mg) se rastvori u metanolu i nanese u obliku tanke horizontalne linije na oko 2 cm od donje ivice staklene ploče. Razvijanje se vrši uzlaznom tehnikom primenom

odgovarajuće mobilne faze. Iz odgovarajuće zone na ploči ekstrahuje se amid smešom hloroform-metanol (70:30 V/V), nakon čega se dobijeni ekstrakt upari do suva.

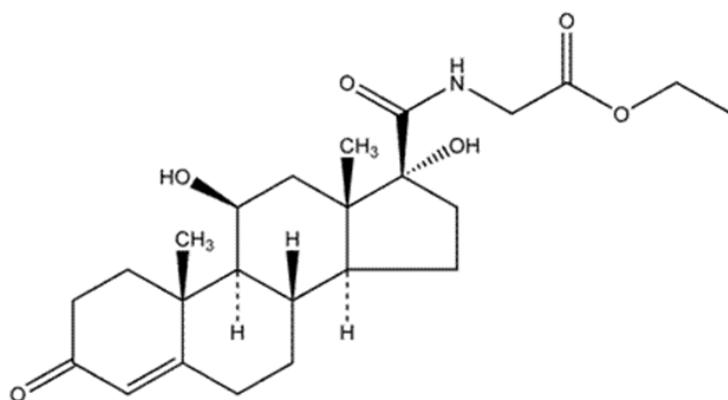
Ispitivanje stepena čistoće sintetisanog amida

Stepen čistoće sintetisanog amida je ispitana primenom RP-HPLC. Primenjena je modifikacija hromatografske metode iz Ph. Eur. 7. koja se koristi za ispitivanje stepena čistoće hidrokortizona [12]. RP-HPLC analiza je izvršena na Agilent 1200 tečnom hromatografu, opremljenom binarnom pumpom, Rheodyne injektorom (injekciona zapremina je $20\text{ }\mu\text{L}$) i DAD detektorom. Korišćena je kolona Zorbax Eclipse Plus C18 ($250 \times 4,6\text{ mm}; 5\text{ }\mu\text{m}$ veličina čestica), mobilna faza se sastoji od acetonitrila i vode (40:60 V/V) sa protokom 1 mL/min , a temperatura kolone je podešena na 30°C . Stepen čistoće amida određivan je na talasnoj dužini od 254 nm .

Rezultati i diskusija

Optimizacija hromatografskih uslova za prečišćavanje amida hromatografijom na koloni i preparativnom TLC

Upotreba hromatografskih tehnika u optimizaciji prečišćavanja, prečišćavanju i ispitivanju stepena čistoće 17β -karboksamidnih derivata hidrokortizona je prikazana na primeru amida kortienske kiseline iz hidrokortizona i etil estra L-glicina (HEG, Slika 1).



Slika 1. Struktura amida HEG

Figure 1. The structure of amide HEG

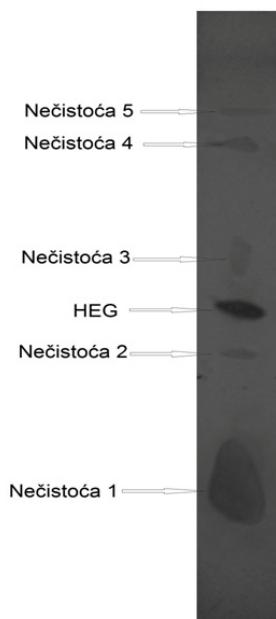
Prečišćavanje amida je izvršeno u dve faze. U prvoj fazi primenjena je hromatografija na koloni, a u drugoj preparativna TLC.

Kao polazna tačka u optimizaciji hromatografskih uslova prečišćavanja amida HEG hromatografijom na koloni i preparativnom TLC poslužila je mobilna faza upotrebljena za ispitivanje stepena čistoće serije 17 β -karboksamidnih derivata deksametazona sa različitim alkil i aminoalkil aminima primenom analitičke TLC: hloroform-metanol (90:10 V/V) [9].

Hromatografsko razdvajanje amida HEG od nečistoća iz reakcione smeše ispitano je primenom nekoliko mobilnih faza sa različitim zapreminskim odnosima hloroforma i metanola:

- hloroform-metanol (70:30 V/V) (A)
- hloroform-metanol (80:20 V/V) (B)
- hloroform-metanol (90:10 V/V) (C)
- hloroform-metanol (95:5 V/V) (D)

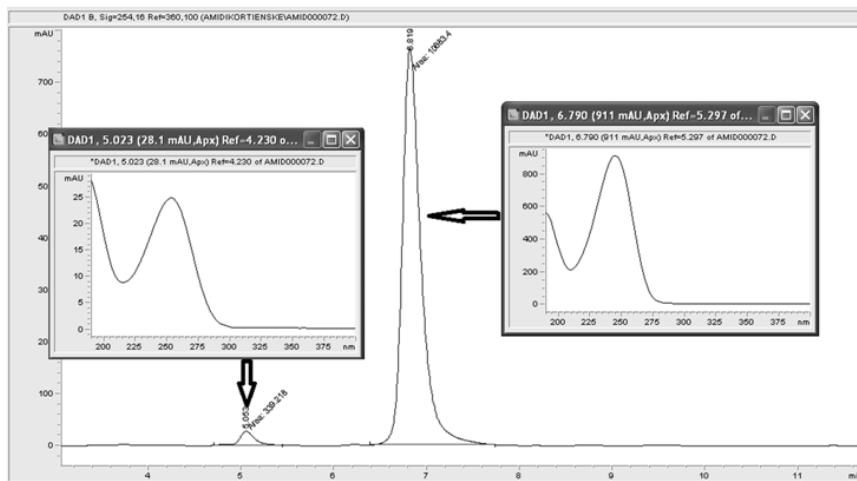
Najbolje razdvajanje amida od nečistoća iz reakcione smeše je postignuto primenom mobilne faze D (hloroform-metanol (95:5 V/V)). R_f vrednosti HEG i nečistoća koje su vidljive na 254 nm u ovom hromatografskom su: 0,10 (nečistoća 1); 0,36 (nečistoća 2); 0,44 (HEG); 0,56 (nečistoća 3); 0,80 (nečistoća 4); 0,89 (nečistoća 5). TLC hromatogram amida HEG i nečistoća 1-5 je prikazan na Slici 2.



Slika 2. TLC hromatogram amida HEG i nečistoća 1-5 (mobilna faza D)

Figure 2. TLC chromatogram of amide HEG and impurities 1-5 (mobile phase D)

Direktna primena mobilne faze optimizovane primenom analitičke TLC u prečišćavanju hromatografijom na koloni često nije moguća, tako da se obično vrši blago smanjenje njene polarnosti. Polarnost izabrane mobilne faze (mobilna faza D) je smanjena promenom odnosa hloroform-a i metanola, tako da je sastav mobilne faze upotrebljene za prečišćavanje HEG hromatografijom na koloni hloroform-metanol (98,5:1,5 V/V). Prikupljene frakcije koje sadrže HEG su spojene i uparene do suva. Stepen čistoće HEG prečišćenog hromatografijom na koloni je ispitana primenom RP-HPLC metode, a odgovarajući hromatogram je prikazan na Slici 3.



Slika 3. HPLC hromatogram amida HEG nakon prečišćavanja hromatografijom na koloni

Figure 3. The HPLC chromatogram of amide HEG after the purification by use of column chromatography

Na prikazanom hromatogramu se pored amida HEG ($R_t = 6,82$ min) uočava i nečistoća koju nije moguće uočiti u hromatografskom sistemu D (nečistoća 6, $R_t = 5,05$ min; $RR_t = 0,74$). Na slici su prikazani i UV spektri amida i nečistoće 6, pored odgovarajućih hromatografskih pikova. Na osnovu sličnih UV spektara i izgleda hromatografskih pikova može se zaključiti da nečistoća 6 ima sličnu hemijsku strukturu kao HEG. Sadržaj ove nečistoće je oko 3 % u odnosu na sadržaj HEG. Čistoća amida HEG iznosi 93,2 %.

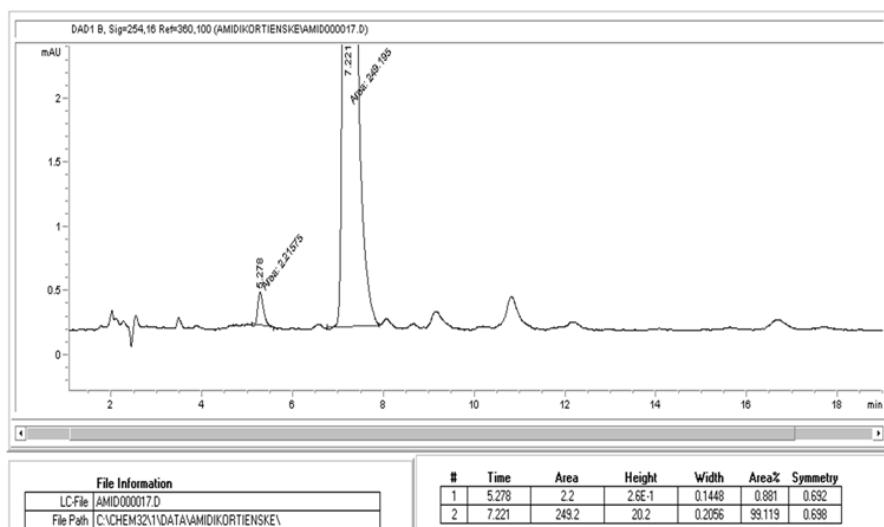
Kako bi se postiglo razdvajanje HEG od nečistoće 6, izvršena je modifikacija sastava mobilne faze D dodatkom glacijalne sirćetne kiseline. Modifikovana mobilna

faza je sledećeg sastava: hloroform-metanol-glacijalna sirćetna kiselina (95:5:1 V/V/V) (E).

Primena mobilne faze E (dodatak glacijalne sirćetne kiseline) omogućuje razdvajanje amida HEG ($R_f = 0,44$) od nečistoće 6 ($R_f = 0,42$). Na osnovu prepostavljene sličnosti hemijskih struktura HEG i ove nečistoće, može se očekivati da dodatak glacijalne sirćetne kiseline ne dovodi do jonizacije ova dva jedinjenja već do suzbijanja ionizacije silanolnih grupa, čime se povećava efikasnost silikagela i poboljšava razdvajanje supstanci koje se prečišćavaju ovom tehnikom. Na osnovu ovih rezultata, mobilna faza E je odabrana za finalno prečišćavanje amida HEG preparativnom TLC.

Prečišćavanje amida HEG preparativnom TLC

Prečišćavanje amida HEG (iz uzorka prečišćenog hromatografijom na koloni) je izvršeno primenom preparativne TLC i mobilne faze E. Iz odgovarajuće zone na TLC ploči ekstrahovan je amid smešom hloroform-metanol (70:30 V/V). Čistoća ovako izolovanog amida je ispitana RP-HPLC metodom. Dobijeni hromatogram je prikazan na Slici 4.



Slika 4. HPLC hromatogram amida HEG nakon prečišćavanja preparativnom TLC (mobilna faza E)

Figure 4. The HPLC chromatogram of amide HEG after the purification by use of preparative TLC (mobile phase E)

Sadržaj nečistoće 6 u uzorku je oko 0,9 % u odnosu na sadržaj amida, što je značajno manje u odnosu na uzorak koji je prečišćen samo hromatografijom na koloni. Hromatografijom na koloni i preparativnom TLC (uz primenu mobilne faze E) dobijen je amid HEG čistoće 96,2 %. Ovako prečišćen amid može biti upotrebljen za dalja *in vitro* (fizičkohemijska karakterizacija i određivanje osnovnih fizičkohemijskih i biofarmaceutskih parametara) i *in vivo* (procena biološke aktivnosti) ispitivanja.

Zaključak

U cilju prečišćavanja HEG (amid kortienske kiseline iz hidrokortizona i etil estra L-glicina) primenjene su dve hromatografske tehnike: hromatografija na koloni i preparativna TLC. Mobilnu fazu koja je korišćena za prečišćavanje hromatografijom na koloni čine hloroform i metanol (hloroform-metanol (98,5:1,5 V/V)), a mobilnu fazu korišćenu za prečišćavanje preparativnom TLC čine hloroform, metanol i glacijalna sirćetna kiselina (hloroform-metanol-glacijalna sirćetna kiselina (95:5:1 V/V/V)). Sastav mobilnih faza korišćenih za prečišćavanje HEG ovim hromatografskim tehnikama je prethodno optimizovan primenom analitičke TLC. Kombinacija hromatografije na koloni i preparativne TLC omogućuje dobijanje amida stepena čistoće 96,2 %, koji može biti upotrebljen za dalja *in vitro* i *in vivo* ispitivanja.

Zahvalnica

Ovaj rad je realizovan u okviru projekta OI172041, finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Literatura

1. Bodor N, Kaminski J, Selk S. Soft drugs. 1. Labile quaternary ammonium salts as soft antimicrobials. *J Med Chem.* 1980; 23(5):469-74.
2. Bodor N, Kaminski J. Soft drugs. 2. Soft alkylating compounds as potential antitumor agents. *J Med Chem.* 1980; 23(5):566-9.
3. Bodor N, Woods R, Raper C, Kearney P, Kaminski J. Soft drugs. 3. A new class of anticholinergic aents. *J Med Chem.* 1980; 23(5):474-80.

4. Bodor N, Buchwald P. Corticosteroid design for the treatment of asthma: structural insights and the therapeutic potential of soft corticosteroids. *Curr Pharm Design*. 2006; 12(25):3241-60.
5. Chandegara N, Chorawala M. Soft and dissociative steroids: a new approach for the treatment of inflammatory airway and eye diseases. *Int J Pharm Sci Res*. 2012; 3(2): 311-9.
6. Bodor N. Drug targeting and retrometabolic drug design approaches introduction. *Adv Drug Deliver Rev*. 1994; 14(2-3):157-66.
7. Omar M, Khan F, Lee HJ. Synthesis and pharmacology of anti-inflammatory steroid antedrugs. *Chem Rev*. 2008; 108(12):5131-45.
8. Manz B, Grill HJ, Kreienberg R, Rehder M, Pollow K. Methyl 17 β -carboxyester derivatives of natural and synthetic glucocorticoids: correlation between receptor binding and inhibition of in vitro phytohaemagglutinin-induced lymphocyte blastogenesis. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1983; 21(2):69-75.
9. Manz B, Rehder M, Heubner A, Kreienberg R, Grill HJ, Pollow K. 17 β -carboxamide steroids: highly effective inhibitors of the phytohaemagglutinin mediated blastogenesis of normal human peripheral lymphocytes. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1984; 22(3):209-14.
10. Formstecher PA, Lefebvre Ph, Burollaud T. Hormones and anti-hormones. The steroid model. *J Pharm Belg*. 1991; 46(1):37-48.
11. Dobričić V, Marković B, Nikolic K, Savić V, Vladimirov S, Čudina O. 17 β -carboxamide steroids - in vitro prediction of human skin permeability and retention using PAMPA technique. *Eur J Pharm Sci*. 2014; 52:95-108.
12. European Pharmacopoeia seventh Edition, Strasbourg: Council of Europe, 2010:2196-98.

The application of chromatography techniques for the purification process optimization of amide of hydrocortisone-derived cortienic acid and ethyl ester of L-glycine

Vladimir Dobričić*, Sote Vladimirov, Olivera Čudina

University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

*Corresponding author, e-mail: vladimir@pharmacy.bg.ac.rs

Summary

Soft (“antedrug”) glucocorticoids are pharmacologically active compounds which are biotransformed in a predictable and controllable way to inactive and non-toxic metabolites. Amides of cortienic acids (17β -carboxamide derivatives of glucocorticoids) are potential soft drugs with fewer side effects than traditional glucocorticoids. The purification of 17β -carboxamide derivatives of hydrocortisone was explained using the amide of hydrocortisone-derived cortienic acid and ethyl ester of L-glycine as an example and performed by use of column chromatography and preparative thin-layer chromatography (TLC). The optimization of purification process was performed employing analytical TLC and reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). The mobile phase that enables best chromatographic separation of the amide from impurities on TLC plate (chloroform-methanol (95:5 V/V)) was selected and modified (reduction of polarity and addition of glacial acetic acid) to be used for the column chromatography and preparative TLC purification. It was confirmed by use of RP-HPLC that purification procedures applied in this study resulted in pure (96.2 %) amide.

Keywords: 17β -carboxamide derivatives of hydrocortisone, analytical TLC, RP-HPLC, column chromatography, preparative TLC.

Studije forsirane degradacije amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata primjenom tečne hromatografije hidrofilnih interakcija

Irena Kasagić-Vujanović^{1*}, Biljana Jančić-Stojanović²,
Darko Ivanović²

¹ Univerzitet u Banjoj Luci – Medicinski fakultet, Odsjek farmacija, Katedra za analitiku lijekova, Save Mrkalja 14, Banja Luka, Republika Srpska, BiH

² Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za analitiku lekova, Vojvode Stepe 450, Beograd, Srbija

*autor za prepisku, Tel: +387 51 340 108; e-mail: kasagic.irena@gmail.com

Kratak sadržaj

U savremenim farmaceutskim analizama danas se veliki značaj pridaje *studijama forsirane degradacije*, koje mogu u velikoj mjeri pomoći u predviđanju roka upotrebe lijeka, ali i u identifikaciji mogućih proizvoda degradacije. Ove studije omogućavaju ispitivanje specifičnosti *stability indicating* metode, zatim koriste se za ispitivanje intrinzičke/unutrašnje stabilnosti molekule aktivnih supstanci, kao i za definisanje profila nečistoća aktivnih supstanci. U ovom radu vršena je *studija forsirane degradacije* amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata pojedinačno i u smješi, gdje se kao metoda koristila tečna hromatografija hidrofilnih interakcija, kojom su se pratile promjene koncentracije ispitivanih uzoraka. Rezultati ispitivanja pokazali su da su ispitivana jedinjenja osjetljiva na većinu ispitivanih *stres agenasa*, naročito amlodipin-besilat, kao i da su oba ova jedinjenja pokazala veću stabilnost u smješi, nego kad su pojedinačno analizirana.

Ključne riječi: amlodipin-besilat, bisoprolol-fumarat,
studije forsirane degradacije, hromatografija hidrofilnih interakcija

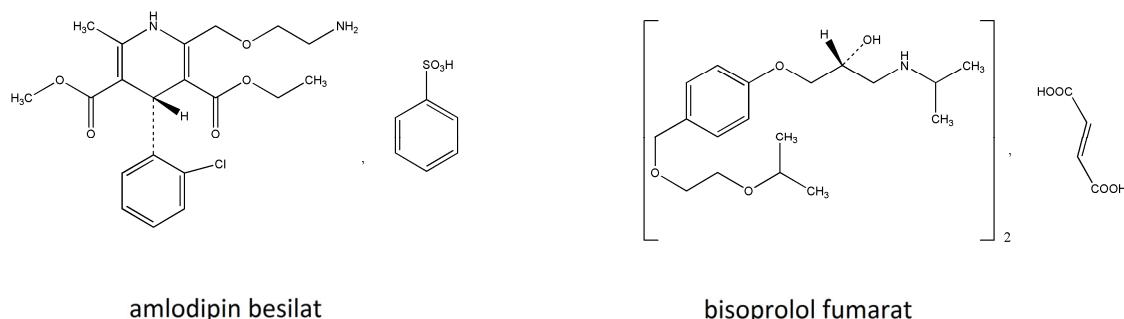
Uvod

Studije forsirane degradacije ili stres studije važan su dio procesa razvoja lijeka. Ove studije sprovode se u cilju razvoja i validacije metode za praćenje stabilnosti lijeka (eng. *Stability Indicating Method* – SIM), otkrivanje puteva degradacije lijeka i definisanje njihove stabilnosti u farmaceutskim oblicima, kao i identifikaciji potencijalnih degradacionih proizvoda. Na ovaj način dobijaju se korisne informacije za definisanje uslova čuvanja lijeka, ali i načina proizvodnje i kompatibilnosti sa određenim ekscipijensima [1, 2].

Studije forsirane degradacije sprovode se na čistim farmaceutski aktivnim supstancama (standardna supstanca) i farmaceutskim oblicima u čvrstom obliku, rastvorima ili suspenzijama (zbog moguće interakcije sa nekim od ekscipijensasa). Na taj način može se utvrditi porijeklo eventualnog degradacionog proizvoda, te da li je nastala nečistoća posljedica nestabilnosti farmaceutski aktivne supstance ili interakcije sa ekscipijensima. Ove studije sprovode se prema smjernicama Međunarodne konferencije o harmonizaciji (eng. *International Conference on Harmonisation* – ICH). ICH smjernica Q1A(R2) predlaže sljedeće uslove *stres testa*: povišena temperatura (za 10 °C viša od temperature kod *ubrzanih studija stabilnosti*, tj. 50 °C, odnosno 60 °C), relativna vlažnost 75 % ili više, hidroliza u širokom opsegu pH vrijednosti, oksidacija i fotoliza [3]. Pored toga, *studije fotostabilnosti* neophodno je izvoditi u skladu sa ICH Q1B smjernicom, prema kojoj svjetlosni izvor, koji se može koristiti za ispitivanje fotostabilnosti analiziranih uzoraka, može biti vještačko dnevno osvjetljenje koje odgovara D65/ID65 propisu za emisiju zračenja. To znači da se kao izvor svjetla može koristiti vještačka dnevna svjetlost fluroscentne lampe (od 320 nm sa filterom za eliminiranje nepoželjnog zračenja) kombinovana sa vidljivom i ultraljubičastom svjetlošću, ksenon ili metal-halogenom lampom. Propis D65 podrazumijeva međunarodno priznat standard za vanjsku dnevnu svjetlost definisanu sa ISO 10977 (1993), a ID65 je standard ekvivalencije za unutrašnju dnevnu svjetlost [4]. Pored ICH smjernica postoje i dodatne preporuke koje opisuju uslove izvođenja *stres studija* [2, 5, 6]. Eksperimentalni uslovi za izvođenje *studije forsirane degradacije* moraju obuhvatati ispitivanje osjetljivosti lijeka na hidrolizu, oksidaciju, termalnu degradaciju, vlagu i svjetlost. *Studije forsirane degradacije* izvode se na jednoj seriji proizvoda, a eksperimentalni uslovi treba da budu ekstremniji nego u *ubrzanim studijama stabilnosti*. Tačni uslovi izvođenja *studija forsirane degradacije* biraju se na osnovu fizičko-hemijskih karakteristika lijeka [1, 3, 5]. Ono što prethodi eksperimentu jeste analiza hemijske strukture ispitivane supstance, odnosno funkcionalnih grupa unutar nje. Tako se za estre, amide ili laktone može očekivati da lako podliježu hidrolizi. Funkcionalne grupe koje sadrže heteroatom (azot, sumpor), aldehidi i ketoni osetljivi su na oksidaciju. Alkeni, aromatični i heterociklični derivati su fotosenzitivni [1]. Postavljeni eksperimentalni uslovi moraju biti takvi da se ostvari degradacija farmaceutski aktivne

supstance od 5 % do 20 %, što se smatra značajnom i reprezentativnom degradacijom [1, 2]. Ukoliko se supstanca ne razgradi nakon predviđenog perioda za *stres studije*, smatra se da je stabilna prema ispitivanom *stres agensu*.

U ovom radu opisano je izvođenje *studije forsirane degradacije* na amlodipin-besilatu (AB) i bisporolol-fumaratu (BF), a kao metoda za praćenje degradacije korišćena je metoda hidrofilnih interakcija (eng. *Hidrophilic Interaction Liquid Chromatography* – HILIC). Ispitivani analiti (AB i BF) officinalni su po Ph. Eur. 7.0 koja za određivanje oba jedinjenja i njihovih srodnih supstanci propisuje metodu reversno-fazne tečne hromatografije (eng. *Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography* – RP-HPLC), na koloni C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm veličina čestica), sa izokratskim načinom eluiranja za amlodipin-besilat i gradijentnim načinom eluiranja za bisoprolol-fumarat [7]. Struktura analiziranih jedinjenja prikazana je na Slici 1.



amlodipin besilat

bisoprolol fumarat

Slika 1. Hemijska struktura amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata

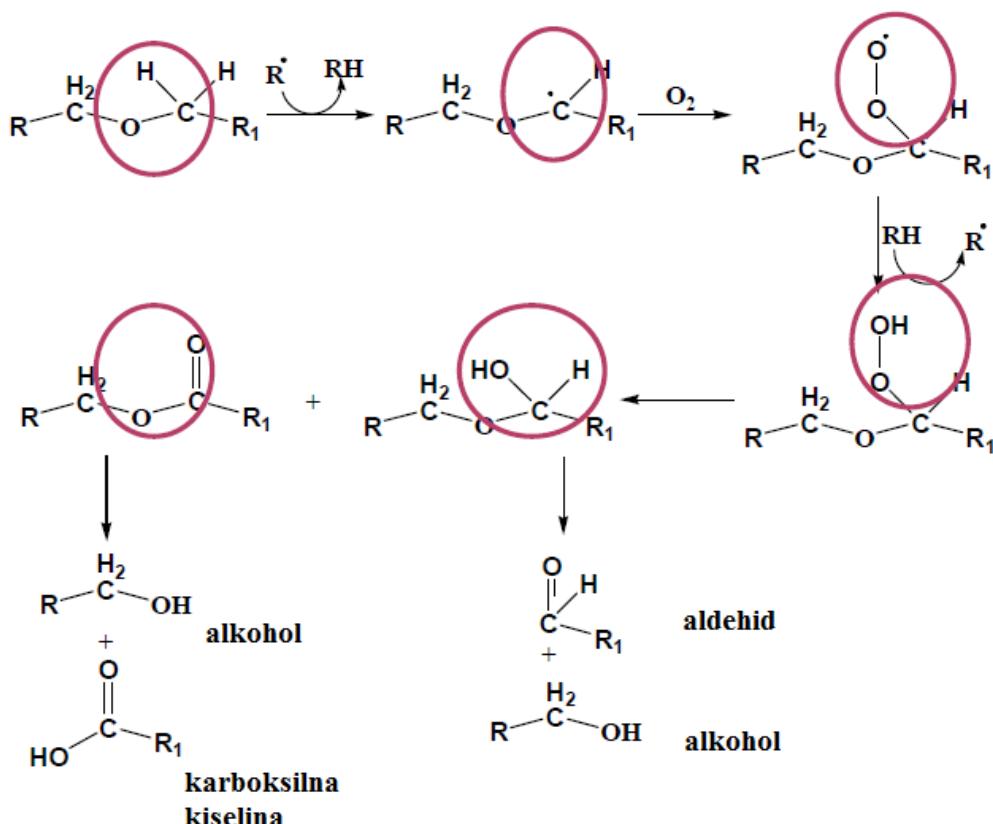
Figure 1. Chemical structures of amlodipine besylate and bisoprolol fumarate

Cilj ovog istraživanja bio je da se sproveđe istovremena *studija forsirane degradacije* na AB i BF, pojedinačno i u smješi, a upotrebom HILIC metode da se prati promjena koncentracije u definisanim vremenskim intervalima.

Pregledom literature može se vidjeti da do sada nisu objavljeni slični radovi. U radovima [8, 9] AB i BF određivani su primjenom RP-HPLC metode na C18 koloni u farmaceutskim oblicima. Dalje, opisane su metode određivanja BF u kombinaciji sa metoprololom i hidrohlortiazidom iz biološkog materijala upotrebom HPLC i spektrofotometrijske metode [10–12]. Za određivanje AB iz tableta i biološkog materijala u kombinaciji s lizinoprilom, losartanom, hidrohlortiazidom, metoprololom, olmesartanom ili drugim antihipertenzivnim lijekovima primjenjene su HPLC i spektrofotometrijske metode [13–18]. Od HILIC metoda u literaturi do sada je opisano određivanje sadržaja BF i drugih beta-blokatora, bilo pojedinačno ili u smješi, sa drugim lijekovima (ranitidin, omeprazol, citalopram i dr.) [19–22]. Za istovremeno

određivanje BF i drugih beta-blokatora iz biološkog materijala opisana je i HPLC metoda s masenom detekcijom [23].

Na osnovu pregleda literature zaključeno je da nema radova u kojima su produkti degradacije, nastali nakon *studije forsirane degradacije* AB i BF, analizirani primjenom HILIC sistema. Takođe, ovo je prvi rad u kome su opisane *studije forsirane degradacije* na ova dva analita pojedinačno i istovremeno što je pored definisanja njihovog degradacionog profila omogućilo i da se izvedu zaključci o međusobnom uticaju na stabilnost. BF u svojoj strukturi ima tri etarske funkcionalne grupe, spada u grupu etara i derivat je ariloksipropanolamina (para-monosupstituisani derivat). Etri su veoma osjetljivi na oksidaciju, tj. dolazi do uklanjanja vodonika iz C-H veze u α -položaju (u odnosu na etarsku grupu) i stvaranje radikala, koji se dalje razlaže do α -hidroperoksida, a zatim do aldehida, ketona, alkohola i karboksilnih kiselina. Šema oksidacije etara prikazana je na Slici 2 [1, 24].



Slika 2. Šema oksidacije etara

Figure 2. Etheroxidation scheme

Iz ovog se može predvidjeti da će BF biti osjetljiv na oksidativnu degradaciju, međutim etri su stabilni i u kiseloj i u baznoj sredini (neki i na povišenu temperaturu), te se može prepostaviti da će se BF u manjem stepenu degradirati kiselom i baznom hidrolizom. Pregledom literature nije pronađeno da je do sada izvršena identifikacija produkata degradacije BF nakon *stres studija*.

AB je derivat 1,4-dihidropiridina, u svojoj strukturi ima dvije estarske grupe koje ga čine nestabilnim i u kiseloj i u baznoj sredini (podlježe kiseloj i baznoj hidrolizi). Iz ovog se može zaključiti da će se AB degradirati pod dejstvom HCl i NaOH (*stres agensi*). AB podlježe i fotohemijskoj degradaciji zbog prisustva aromatične nitro grupe. Pored ove funkcionalne grupe i karbonilna, alkenska i aril-halogenidna grupa odgovorne su za fotoreaktivnost. BF u svojoj strukturi nema niti jednu od navedenih funkcionalnih grupa, pa se može prepostaviti da će biti fotostabilan. Sam mehanizam fotodegradacije je vrlo komplikovan i do sad je razjašnjeno samo nekoliko slučajeva. Za AB u literaturi prikazan je put degradacije, odnosno prikazana je kisela, bazna i oksidativna degradacija (Slika 3) [25], a produkti degradacije su identifikovani upotrebom metode tečne hromatografije sa tandem masenim spektrometrom (eng. *Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrometry – LC-MS/MS*).

Eksperimentalni dio

Hromatografski sistem. Analiza je vršena na hromatografskom sistemu *Agilent Technologies HP 1200*, koji se sastoji iz HP 1200 binarne pumpe, HP 1200 UV/VIS detektora i *ChemStation Software, Windows XP* za prikupljanje i obradu podataka.

Ostala oprema i pribor. pH metar Ciberscan pH 11 (Eutech, Malezija), magnetna mješalica (Falc, Italija), sistem za filtriranje vode (Whatman, Njemačka), ultrazvučno kupatilo (Bandelin, Sonorex digitec, Njemačka).

Reagensi. Za pripremu mobilne faze i rastvora upotrebljeni su reagensi HPLC čistoće: acetonitril (Fisher Scientific, Engleska), koncentrovana sirćetna kiselina (Lachner, Češka), voda HPLC kvaliteta dobijena sistemom Barnstead i amonijum-acetat (Lachner, Češka).

Standardi. Za analizu su korišćeni radni standardi: bisoprolol-fumarat (Sigma-Aldrich, Njemačka), amlodipin-besilat (Sigma-Aldrich, Njemačka) i nečistoća A od amlodipin-besilata (Sigma-Aldrich, Njemačka).

Rastvori. Osnovni rastvori AB i BF ($c = 1 \text{ mg mL}^{-1}$) pripremljeni su u acetonitrilu. Radni rastvori AB i BF koncentracije $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ pripremljeni su razblaživanjem s odgovarajućim *stres agensom*. Kao *stres agensi* korišćeni su: 0,1 M natrijum-hidroksid, 0,1 M i 0,01 M hlorovodonična kiselina, kao i rastvori vodonik-peroksida koncentracija 3 %, 15 % i 30 %. Vršeno je i ispitivanje u neutralnoj sredini, gdje se kao rastvarač koristila destilovana voda (dobijena sistemom Barnstead) i nije vršeno

naknadno podešavanja pH vrijednosti na 7,0. Za sprovođenje degradacije pod uticajem svjetla koristila se prirodna dnevna svjetlost u kombinaciji sa vještačkom bijelom svjetlošću, tokom dana ili samo vještačka bijela svjetlost, tokom noći, sa setom od 12 lampi. Jačina jedne lampe iznosila je 18 W (F74-765 *daylight* – 1200 lumena, Tungsram, Mađarska).

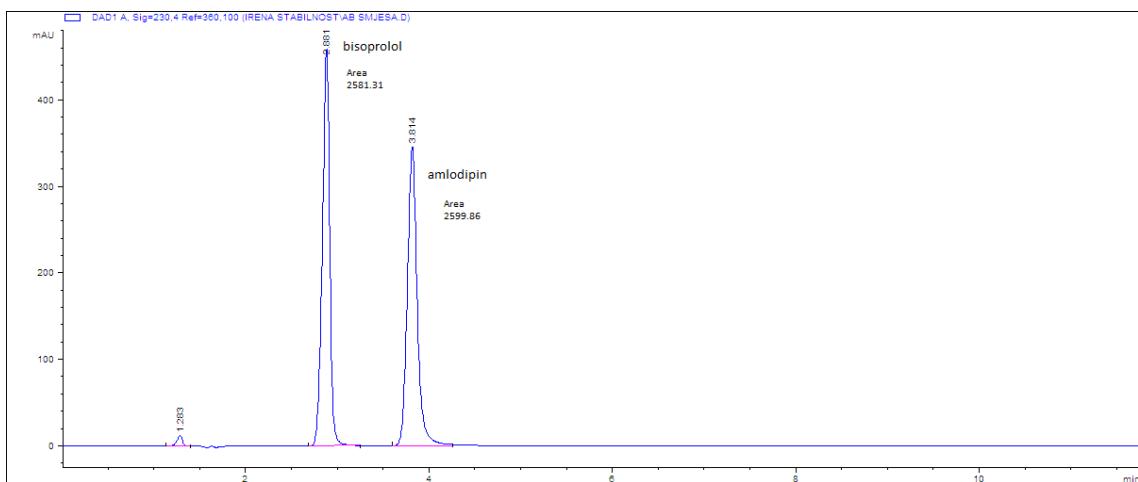
Neposredno nakon dodatka *stres agensa*, tj. u 0-tom minuti vršene su analize i razvijeni su hromatogrami ispitivanih uzoraka. Zatim, degradacija svih uzoraka AB i BF, pojedinačno i u smješi, pratila se nakon 1 h, 24 h, 48 h i 72 h, bez zaustavljanja reakcija degradacije. Sve analize su sprovedene na sobnoj temperaturi ($\sim 25^{\circ}\text{C}$).

Osnovni rastvor nečistoće A ($c = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$) pripremljen je u acetonitrilu. Radni rastvor nečistoće A koncentracije $10 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ pripremljen je razblaživanjem s mobilnom fazom.

Hromatografski uslovi. Kolona – Luna 5 μ HILIC 200A (100 mm x 4,6 mm, 5 μm veličina čestica), mobilna faza je smješa acetonitril–voden rastvor 10 mM amonijum-acetata (pH 4,0 podešen koncentrovanim sirčetnom kiselinom) u omjeru 92:8 V/V. Protok mobilne faze bio je 1 mL min^{-1} , temperatura kolone 30°C , talasna dužina detekcije 230 nm i injekciona zapremina $20 \mu\text{L}$ [26].

Rezultati i diskusija

U ovom radu opisano je ispitivanje stabilnosti AB i BF, pojedinačno i u smješi, a nakon izlaganja ispitivanih supstanci *stres uslovima*. Kao metoda koja se koristi za praćenje stepena degradacije korišćena je prethodno razvijena i validirana HILIC metoda [26]. Hromatografski uslovi prikazani su u Eksperimentalnom dijelu. Ova metoda se pokazala kao specifična, tačna i precizna za analizu navedenih analita, ali i veoma pogodna za sprovođenje njihove *studije forsirane degradacije*. Razvijena HILIC metoda omogućava zadovoljavajuće razdvajanje BF i AB, što se može vidjeti iz hromatograma dobijenog pod optimalnim hromatografskim uslovima (Slika 3).



Slika 3. Hromatogram pri optimalnim hromatografskim uslovima: kolona Luna HILIC 200A (100 mm x 4,6 mm, 5 µm veličina čestica), mobilna faza – smješa acetonitril : voden rastvor 10 mM amonijum-acetata (pH 4,0 podešen koncentrovanom sirćetnom kiselinom) u omjeru 92:8 V/V. Protok mobilne faze 1 mL min^{-1} , temperatura kolone 30°C , talasna dužina detekcije 230 nm i injekciona zapremina $20 \mu\text{L}$.

Figure 3. Chromatogram obtained under optimal chromatographic conditions: column Luna HILIC 200A (100 mm x 4,6 mm, 5 µm particle size), mobile phase: acetonitrile/aqueous solution of 10 mM ammonium acetate pH adjusted with concentrated acetic acid (92:8, V/V), flow rate 1 mL min^{-1} , the column temperature 30°C , UV detection at 230 nm and injection volume of $20 \mu\text{L}$.

Prema proceduri, opisanoj u eksperimentalnom dijelu, ispitivani analiti tretirani su s različitim *stres agensima*, dobijeni su rezultati *studije forsirane degradacije* i izvedeni su odgovarajući zaključci (Tabela I).

Tabela I Uporedni prikaz stepena degradacije AB i BF (pojedinačno i u smješti) nakon stres studije u definisanim vremenskim intervalima

Table I Adjacent overview AB and BF degree of degradation (individually and in mixture) after stress studies in defined period of time

vrijeme degradacije [h]	0	1	24	48	72
0,1M NaOH:					
AB	18,18	20,7	55,4	77,36	88,64
BF	7,10	8,19	10,34	15,07	23,62
smješta:					
AB	16,43	18,43	36,46	55,07	67,18
BF	6,65	9,17	18,30	22,74	33,78
0,01M HCl:					
AB	5,46	5,57	7,82	9,53	16,24
BF	4,57	5,50	6,05	6,44	16,79
smješta:					
AB	4,14	4,58	6,48	7,19	10,86
BF	4,14	4,44	6,15	6,68	13,99
3 % vodonik peroksid:					
AB	17,09	19,81	49,74	88,55	94,20
BF	10,08	26,06	32,43	49,60	50,06
smješta:					
AB	10,22	17,0	41,81	69,16	78,90
BF	16,70	18,83	27,38	30,11	43,27
15 % vodonik peroksid:					
AB	26,36	38,47	85,35	96,32	97,99
BF	44,13	48,57	69,14	74,86	84,93
smješta:					
AB	21,16	33,87	82,37	94,54	95,51
BF	41,33	44,48	60,14	70,61	83,86
30 % vodonik peroksid:					
AB	75,77	100,0	/	/	/
BF	73,12	100,0	/	/	/
smješta:					
AB	75,77	100,0	/	/	/
BF	65,34	92,47	100,0	/	/

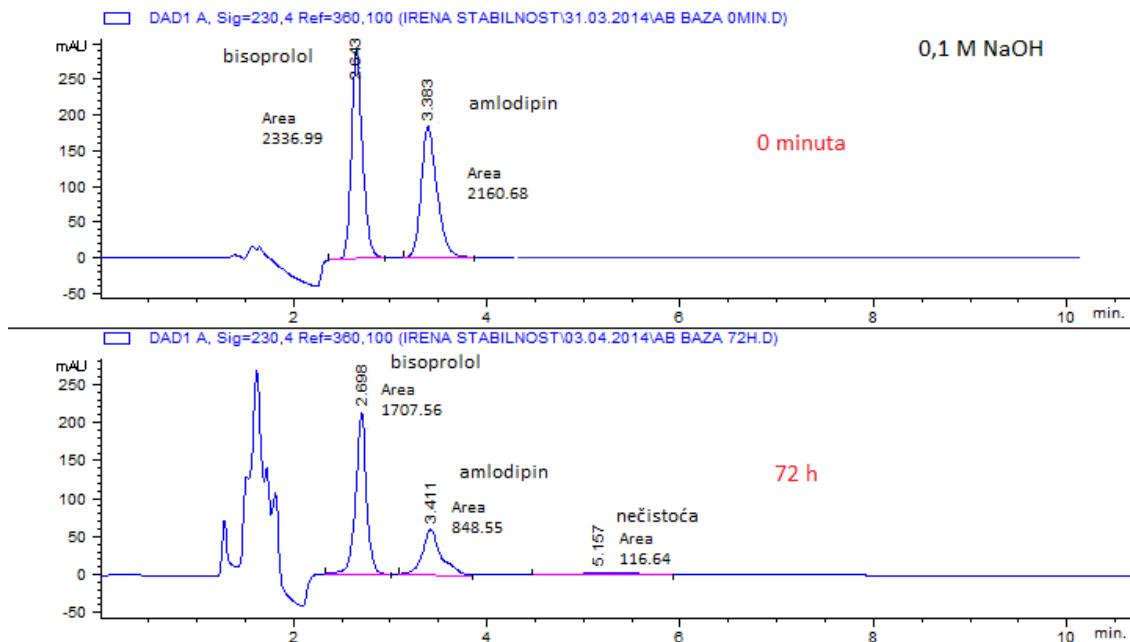
vrijeme degradacije [h]	0	1	24	48	72
stopen degradacije [%]	destilovana voda:				
	AB	2,52	3,42	4,69	6,65
	BF	0	0,19	0,19	0,20
	smješa:				
	AB	2,50	2,50	4,57	5,88
	BF	0	0	0	0,08
	svjetlost:				
	AB	0	1,83	2,74	7,10
	BF	0	0,17	0,17	0,17
	smješa:				
	AB	0	1,0	2,0	5,52
	BF	0	0	0	0

AB – amlodipin-besilat; BF – bisoprolol-fumarat

Degradacija u baznoj sredini

Tretiranje AB, BF i njihove smješe sa 0,1 M NaOH dovelo je do degradacije svih ispitivanih uzoraka. Najprije, AB se na samom početku (0-ti minut) degradirao 18,18 %, a u narednih 60 minuta 20,7 %. Za 24 h degradirao se 55,4 %, za 48 h 77,36 % i za 72 h 88,64 % u odnosu na početnu koncentraciju. AB se vidno degradirao u toku 72 h, a i uočena je pojava nečistoće na retencionom vremenu 5,292 minuta čija se površina tokom ove *stres studije* povećavala. Ovo ukazuje da AB podliježe hidrolizi pod dejstvom 0,1 M NaOH. Pod istim eksperimentalnim uslovima, koncentracija BF se takođe smanjivala, ali ne toliko vidno kao kod AB, tj. trenutno se degradiralo svega 7,1 %, dok u narednih 60 minuta pod uticajem 0,1M NaOH došlo je do degradacije od 8,19 %. Za 72 h ukupna degradacija BF iznosila je 23,62 %. Ovo pokazuje da je BF stabilniji na hidrolizu u baznoj sredini od AB. Ispitivanjem smješe AB i BF na dejstvo 0,1 M NaOH može se zaključiti da je AB stabilniji na hidrolizu u smješi, nego pojedinačno, dok se BF u ovim uslovima pokazao nestabilniji. Odnosno, u 0-tom minuti BF se degradirao 6,65 %, a AB 16,43 %, zatim u narednih 60 minuta BF se degradira za 9,17 %, a AB za 18,43 %. Za ukupno 24 h BF se degradirao za 18,30 %, a AB za 36,46 %, dok je ukupna degradacija nakon 72 h iznosila 33,78 % za BF i 67,18 % za AB. Ukupan stepen degradacije dosta je manji za AB u smješi nego pojedinačno (razlika za oko 20 %), dok je degradacija BF za oko 10 % veća u smješi nego pojedinačno. Tačan razlog ovakvog ponašanja BF nije poznat, ali se može

prepostaviti da tokom bazne hidrolize nastaju produkti degradacije koji dodatno pospješuju degradaciju BF. Primjer hromatograma, sa degradacionim produktima AB i BF koji nastaju nakon izlaganja ispitivanih uzoraka sa rastvorom 0,1 M NaOH, dat je na Slici 4.



Slika 4. Hromatogram uzorka smješte BF i AB nakon tretiranja sa 0,1 M NaOH

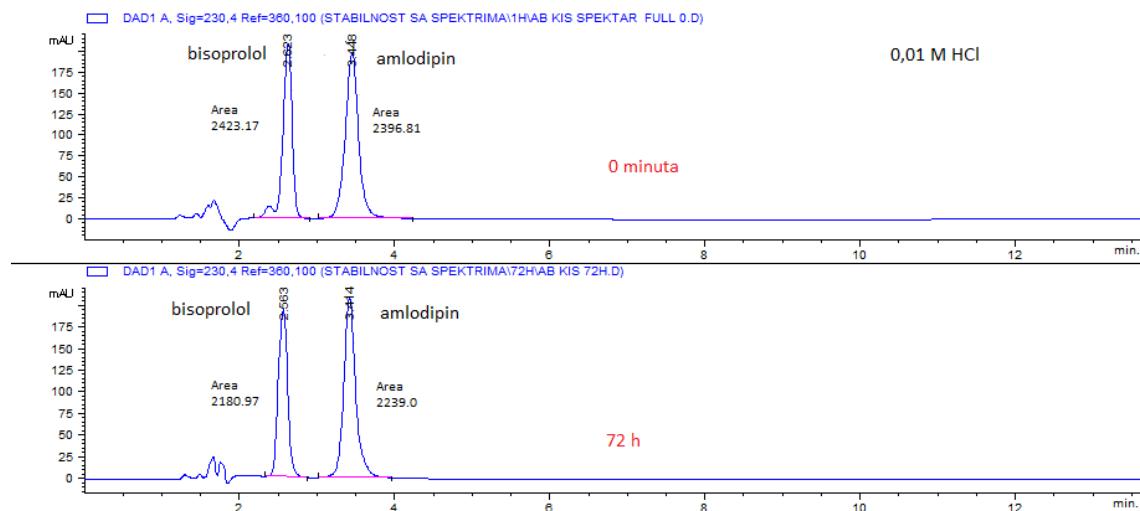
Figure 4. Chromatogram of the sample mixture BF and AB after treatment with 0,1 M NaOH

S obzirom na izraženu nestabilnost analita u baznoj sredini, posebno AB, ispitivanje nije nastavljeno u smislu analize uticaja slabije baze.

Degradacija u kiseloj sredini

Hidroliza AB i BF sa 0,1 M HCl pokazala je potpunu degradaciju u 0-tom minutu, pa se analiza ponovila sa manjom koncentracijom ove kiseline. Hromatografska analiza uzoraka pripremljenih u 0,01 M HCl pokazala je da su AB i BF nešto stabilniji nego u baznoj sredini. Degradacija AB u 0-tom minutu iznosila je 5,46 %, dok je u narednih 60 minuta iznosila 5,57 %. Za ukupno 72 h degradiralo se 16,24 % AB. BF se pokazao isto nestabilan na dejstvo 0,01 M HCl, tj. trenutno se degradira 4,57 % BF dok u prvih 60 minuta nije došlo do značajne degradacije i ukupna degradacija je iznosila 5,50 %. U toku 72 h tretiranja BF sa 0,01 M HCl degradiralo se 16,79 %. U smješti oba jedinjenja su se pokazala nešto stabilnija, odnosno BF se u prvih 60 minuta degradirao 4,44 %, a za ukupno 72 h 13,99 %, dok se AB u prvih 60 minuta degradirao za 4,58 %, a za 72 h 10,86 %. Hromatogram rastvora smješe AB i BF, koji su izlagani djelovanju 0,01M HCl

rastvora, prikazan je na Slici 5. Može se prepostaviti da ova dva jedinjenja u smješi povećavaju stabilnost jedan drugom na dejstvo ovog *stres agensa*.

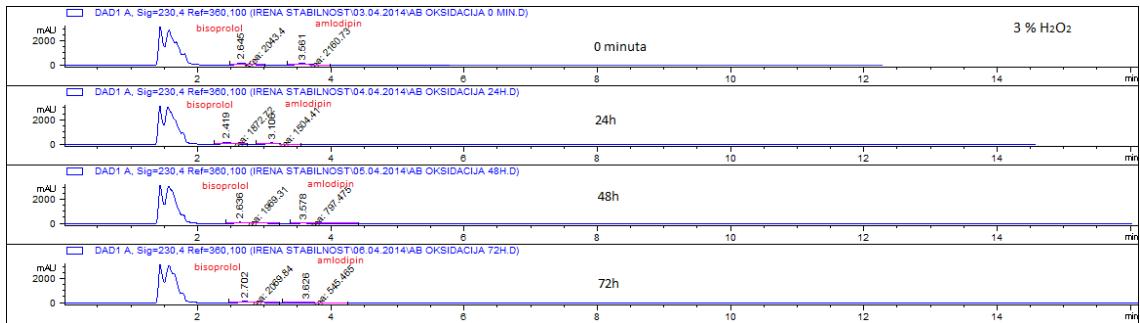


Slika 5. Hromatogram uzorka smješe BF i AB nakon tretiranja sa 0,01 M HCl

Figure 5. Chromatogram of the sample mixture BF and AB after treatment with 0,01 M HCl

Degradacija pod dejstvom oksidacionog sredstva

Degradacija AB i BF sa oksidacionim sredstvom (3 %, 15 % i 30 % H_2O_2) daleko je intenzivnija od njihove degradacije sa 0,1 M NaOH i 0,01 M HCl. Tretiranjem ispitivanih jedinjenja sa 3 % H_2O_2 došlo je do značajne degradacije. U 0-tom minuti AB se degradirao za 17,09 %, dok u narednih 60 minuta nije došlo do značajne degradacije. U toku 24 h, AB se degradirao za 49,74 %, za 48 h 88,55 %, da bi se za 72 h skoro potpuno degradirao, tj. za 94,2 %. BF se pokazao nešto stabilniji, tj. u 0-tom minetu se degradirao 10,08 %, ali u narednih 60 minuta 26,06 %. Za 24 h 32,43 %, za 48 h 49,6 % i za 72 h 50,06 %. Ispitivanjem smješe ova dva jedinjenja na dejstvo 3 % H_2O_2 pokazalo se da su oba jedinjenja stabilnija na oksidaciju, odnosno BF se u 0-tom vremenu degradira 16,7 % i u narednih 72 h degradira se 43,27 %. AB se u smješi trenutno degradira za 10,22 %, u toku 24 h do 41,81 %, a nakon 72 h 78,9 %. Hromatogram smeše pod ispitivanim uslovima prikazan je na Slici 6.



Slika 6. Hromatogram uzorka smješe BF i AB nakon tretiranja sa 3 % H_2O_2

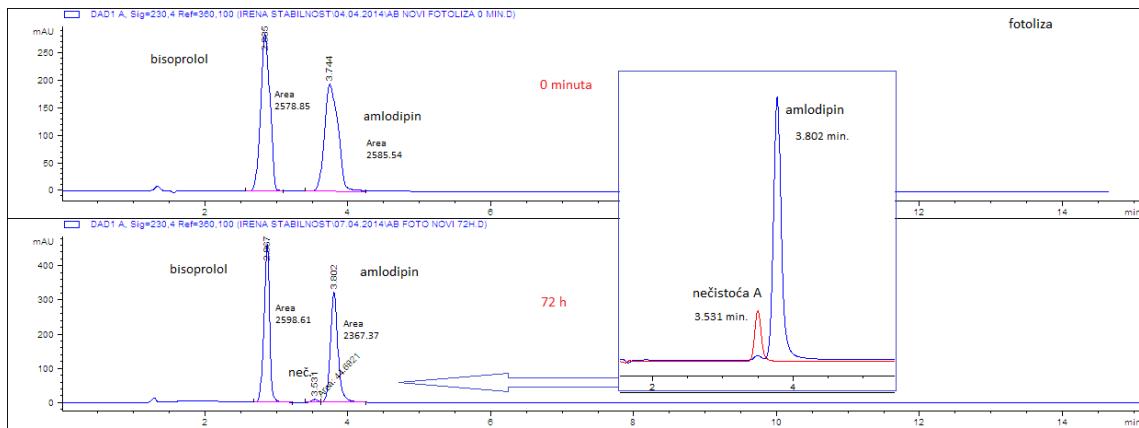
Figure 6. Chromatogram of the sample mixture BF and AB after treatment with 3 % H_2O_2

Tretiranjem ispitivanih jedinjenja sa 15 % H_2O_2 dovelo je do još intenzivnije degradacije. AB se trenutno degradira za 26,36 % i u prvih 60 minuta 38,47 %. U toku 24 h došlo je do značajne degradacije od 85,35 %, da bi se u toku 72 h skoro potpuno degradirao do 97,99 %. BF pod dejstvom 15 % H_2O_2 u 0-tom minutu degradira se za 44,13 % i u prvih 60 minuta nema značajnih promjena. U toku 24 h pokazala se značajna degradacija za 69,14 %, da bi se za 72 h degradirao za 84,93 %. U smješi oba jedinjenja su se ponašala slično. Iz ovog se može zaključiti da je BF stabilniji na oksidaciju od AB, što se može vidjeti i iz analiza u kojima su ispitivani analiti tretirani sa jačom koncentracijom H_2O_2 (30 %).

Tretiranjem svih uzoraka sa 30 % H_2O_2 dovelo je u 0-tom minutu do degradacije od 75,77 % AB i 73,12 % BF, da bi se u narednih 60 minuta potpuno degradirali. U smješi BF se pokazao nešto stabilniji na dejstvo ovog *stres agensa*, tj. u 0-tom minutu degradirao se za 65,34 %, nakon 60 minuta za 92,47 %, a za ukupno 24 h degradirao se 100 %. AB se u smješi, na dejstvo ovog *stres agensa*, ponašao identično kao i u pojedinačnoj analizi.

Degradacija pod uticajem svjetlosti

Izlaganjem ispitivanih jedinjenja elektromagnetskom zračenju talasnih dužina vidljivog dela spektra u cilju ispitivanja stabilnosti na fotolizu, pokazalo se da je BF stabilan, dok je AB i ovdje pokazao nestabilnost. U prva 24 h AB se degradirao za 1,83 %, a u toku 72 h za ukupno 8,44 %. U toku ove *stres studije*, pri degradaciji AB, uočava se nastanak nečistoće na retencionom vremenu 3,531 minuta, koja je naročito vidljiva nakon 72 h ove *stres studije*. Injektovanjem standarda nečistoća A amlodipina potvrđeno je da se nalazi na istom retencionom vremenu, kao što je nečistoća koja je nastala u toku ove analize. Odgovarajući hromatogram prikazan je na Slici 7. Ispitivanjem smješe ovih jedinjenja koncentracija BF se nije mijenjala tokom 72 h, a AB se pokazao stabilniji na dejstvo svjetla u smješi sa BF, tj. ukupna degradacija nakon 72 h za AB iznosila je 6,82 %.

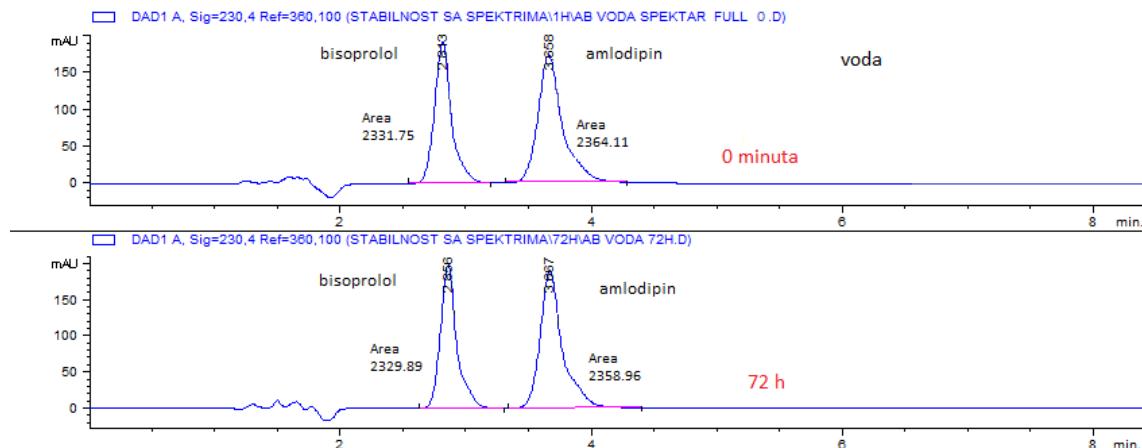


Slika 7. Hromatogram uzorka smješe BF i AB nakon fotolize

Figure 7. Chromatogram of the sample mixture BF and AB after hydrolysis

Degradacija u neutralnoj sredini

Ispitivanje stabilnosti u *studijama forsirane degradacije* vrši se i hidrolizom u neutralnoj sredini. AB se u prvih 60 minuta degradirao za 3,42 %, nakon 24 h degradirao se za 4,69 %, nakon 48 h degradirao se za 6,65 % i ukupno za 72 h degradirao se za 10,62 %. BF se pokazao dosta stabilniji, odnosno u prva 24 h se degradirao za svega 0,19 % i za ukupno 72 h 0,93 %. U smješti AB se u toku 60 minuta degradirao za 2,5 %, nakon 24 h za 4,57 %, a za ukupno 72 h degradirao se za 6,09 %. BF se u smješti pokazao stabilan tokom sva 72 h, tj. nije došlo do značajne degradacije (Slika 8). Relativno nizak procenat degradacije analita u neutralnoj sredini biće predmet daljih istraživanja.



Slika 8. Hromatogram uzorka smješe BF i AB u neutralnoj sredini

Figure 8. Chromatogram of the sample mixture BF and AB under neutral conditions

Na kraju ove studije može se zaključiti da je AB nestabilniji na sve ispitivane *stres agense* od BF, što se može objasniti njegovom strukturom (prisustvo 1,4-dihidropiridinskog jezgra, 2-aminoetoksi-metil radikala, kao i prisustvo estrskih funkcionalnih grupa).

Zaključak

Iz navedenih ispitivanja i dobijenih rezultata može se zaključiti da je smješa AB i BF, u većini slučajeva, stabilnija na tretiranje *stres agensima*, nego kad se ova jedinjenja pojedinačno ispituju sa odgovarajućim *stres agensima*. Može se prepostaviti da njihovim zajedničkim prisustvom u ispitivanim *stres agensima* dolazi do stabilizacije osjetljivih funkcionalnih grupa u njihovoj hemijskoj strukturi, te u manjem stepenu podliježu procesima hidrolize, oksidacije i fotolize, što je naročito izraženo za AB. Međutim, to nije uvijek slučaj, naime BF se pokazao nestabilniji u smješi (nego pojedinačno) tretiranjem sa 0,1 M NaOH nakon 1 h, 24 h, 48 h i 72 h, ali i tretiranjem sa 3 % H₂O₂ nakon 0-tog minuta. Pretpostavlja se da je razlog ove nestabilnosti nastanak nekih od produkata degradacije ispitivanih analita (npr. nastanak kiselina uslijed hidrolize estara) koji dodatno povećavaju nestabilnost i dodatno degradira molekulu BF. Ovakvo ponašanje BF, u pojedinačnim analizama i u smješi sa AB, otvara mogućnost za dodatna i detaljnija ispitivanja vezana za njihovu stabilnost, ali i identifikaciju puteva degradacije i samih degradacionih produkata.

Iz dobijenih rezultata vidi se da je degradacija AB i BF najjače izražena pod dejstvom vodonik-peroksida u koncentracijama od 3 % do 30 %, gdje se pod dejstvom 3 % H₂O₂ skoro u potpunosti degradiraju u toku 72 h, dok je u većim koncentracijama degradacija još intenzivnija. Degradacija ovih jedinjenja takođe je intenzivna pod dejstvom 0,1 M NaOH, ali u manjem stepenu od vodonik-peroksida, dok je degradacija AB i BF najslabije izražena u vodi.

Zahvalnica

Ovaj rad realizovan je u okviru naučnog projekta 172052 koji finansira Ministarstvo za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

Literatura

1. Baertschi SW (ed), Pharmaceutical Stress Testing, Predicting Drug Degradation, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2005.
2. Alsante KM, Ando A, Brown R, Ensing J, Hatajik TD, Kong W, Tsuda Y. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products, *Adv Drug Deliv Rev.* 2007; 59:29–37.
3. ICH Steering Committee. Stability Testing of New Drug Substance and Products, ICH Q1A (R2). 2003.
4. ICH Steering Committee. Stability testing: photostability of new drug substances and products, ICH Q1B. 1996.
5. Huynh-Ba K. Handbook of stability testing in pharmaceutical development, Springer Science, New York, USA, 2009.
6. World Health Organization, Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products, Annex 2, WHO technical report series, No. 953, 2009.
7. European Pharmacopoeia 7th Edition, Council of Europe, Strasbourg 2011.
8. Vora DN, Kadav AA. Development and validation of a simultaneous HPLC method for estimation of bisoprolol fumarate and amlodipine besylate from tablets. *Indian J Pharm Sci.* 2008; 70(4): 542–46.
9. Shalini P, Krishan P. Development and validation of a simultaneous HPLC method for assay and dissolution of bisoprolol fumarate and amlodipine besylate in pharmaceutical dosage. *RJPDT* 2012; 4(1):62–6.
10. Braza AJ, Modamio P, Lastra CF, Mariño EL. Development, validation and analytical error function of two chromatographic methods with fluorimetric detection for the determination of bisoprolol and metoprolol in human plasma. *Biomed Chromatogr.* 2002; 16(8):517–22.
11. Ulu ST, Aydoğmuş Z. An HPLC method for the determination of bisoprolol in human plasma and its application to a pharmacokinetic study. *J Chromatogr Sci.* 2012; 50(7):615–19.
12. Bozal B, Gumustas M, Dogan-Topal B, Uslu B, Ozkan SA. Fully validated simultaneous determination of bisoprolol fumarate and hydrochlorothiazide in their dosage forms using different voltammetric, chromatographic, and spectrophotometric analytical methods. *J AOAC Int.* 2013; 96(1):42–51.
13. Gopani KH, Havele SS, Dhaneshwar SR. Application of high performance thin layer chromatography densitometry for the simultaneous determination of amlodipine besylate and lisinopril in bulk drug and tablet formulation. *IJPT* 2011; 3(2):2353–67.
14. Wankhede SB, Raka KC, Wadkar S, Chitlange SS. Spectrophotometric and HPLC methods for simultaneous estimation of amlodipine besilate, losartan potassium and hydrochlorothiazide in tablets. *Indian J Pharm Sci.* 2010; 72(1):136–40.
15. Vichare V, Tambe V, Kashikar V, Dhole SN. Spectrophotometric simultaneous determination of amlodipine and hydrochlorthiazide in combined tablet dosage form by simultaneous equation, absorption ratio and first order derivate spectroscopy methods. *Int J Chem Res* 2011; 2(1):7–10.

16. Pournima SP, Harinath NM, Pishwiker AP. RP–HPLC method for simultaneous estimation of amlodipine besylate and olmesartan medoxomil from tablet. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2011; 3(3):146–49.
17. Prasada Rao CHMM, Rahaman SA, Prasad YR, Reddy PG. RP–HPLC method of simultaneous estimation of amlodipine besylate and metoprolol in combined dosage form. *IJPRD* 2010; 9(2):69–76.
18. Zhao J, Wu HL, Niu JF, Yu YJ, Yu LL, Kang C, Li Q, Zhang XH, Yu RQ. Chemometric resolution of coeluting peaks of eleven antihypertensives from multiple classes in high performance liquid chromatography: A comprehensive research in human serum, health product and Chinese patent medicine samples. *J Chromatogr* 2012; 902:96–107.
19. Padivitage NL, Armstrong DW. Sulfonated cyclofructan 6 based stationary phase for hydrophilic interaction chromatography. *J Sep Sci.* 2011; 34(14):1636–47.
20. Van Nuijs AL, Tarcomnicu I, Simons W, Bervoets L, Blust R, Jorens PG, Neels H, Covaci A. Optimization and validation of a hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of 13 top-prescribed pharmaceuticals in influent wastewater. *Anal Bioanal Chem.* 2010; 398(5):2211–22.
21. Jeong DW, KimYH, Ji HY, Youn YS, Lee KC, Lee HS. Analysis of carvedilol in human plasma using hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2007; 44(2):547–52.
22. Quiming NS, Denola NL, Ueta I, Saito Y, Tatematsu S, Jinno K. Retention prediction of adrenoreceptor agonists and antagonists on a diol column in hydrophilic interaction chromatography. *Anal Chim Acta.* 2007; 598(1):41–50.
23. Kristoffersen L, Øiestad EL, Opdal MS, Krogh M, Lundanes E, Christophersen AS. Simultaneous determination of 6 beta-blockers, 3 calcium-channel antagonists, 4 angiotensin-II antagonists and 1 antiarrhythmic drug in post-mortem whole blood by automated solid phase extraction and liquid chromatography mass spectrometry. Method development and robustness testing by experimental design. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007; 850(1–2):147–60.
24. Thomas LL, David AW, Victoria FR, William SZ. Foye's principles of Medicinal Chemistry, 7th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 2013.
25. Divaya S, Damele S, Joshi A, Datar A. Forced degradation studies of amlodipine besylate and characterization of its major degradation products by LC–MS/MC. *Int. J. LifeSc. Bt. & Pharm. Res.* 2014; 3(3):196–207.
26. Kasagić-Vujanović I, Rakić T, Jančić-Stojanović B, Ivanović D. Design of experiments in optimization and validation of a hydrophilic interaction liquid chromatography method for determination of amlodipine besylate and bisoprolol fumarate. *J Liq Chromatogr Rel Technol.* prihvaćen rad.

Study of forced degradation of amlodipine besylate and bisoprolol fumarate by application of hydrophilic interaction liquid chromatography

**Irena Kasagić-Vujanović^{1*}, Biljana Jančić-Stojanović²,
Darko Ivanović²**

¹ University of Banja Luka – Faculty of Medicine, Pharmacy Department, Department of Drug Analysis, Banja Luka, Republic of Srpska

² University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Department of Drug Analysis,
Vojvode Stepe 450, Belgrade, Serbia

* Corresponding author, Tel: +387 51 340 108; e-mail: kasagic.irena@gmail.com

Summary

Currently, in pharmaceutical analysis, great importance is given to forced degradation studies, which can greatly help to predict the shelf life of the drug, but also for identification of possible degradation products. These studies enable investigation of stability indicating method, then it is used to test the active substances intrinsic/inner molecular stability, as well as defining active substances impurity profiles. In this work forced degradation studies of amlodipine besylate and bisoprolol fumarate either individually and in mixtures, was performed, where the method of hydrophilic interaction liquid chromatography was used, and any possible changes in the concentration of samples were followed. The results showed that the test compounds are sensitive to the tested stress agents, especially amlodipine besylate, and that both of these compounds showed increased stability in the mixture in comparison to individual analysis.

Keywords: amlodipine besylate, bisoprolol fumarate, forced degradation study, hydrophilic interaction liquid chromatography

Razvoj metode čvrsto-tečne ekstrakcije za prečišćavanje mikofenolne kiseline iz uzoraka salive

Biljana Otašević, Ana Protić*, Jelena Golubović, Mira Zečević,
Milica Cerović, Ljubica Bralović

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za analitiku lekova,
Vojvode Stepe 450, Beograd, Srbija

*Autor za prepisku, e-mail: anna@pharmacy.bg.ac.rs

Kratak sadržaj

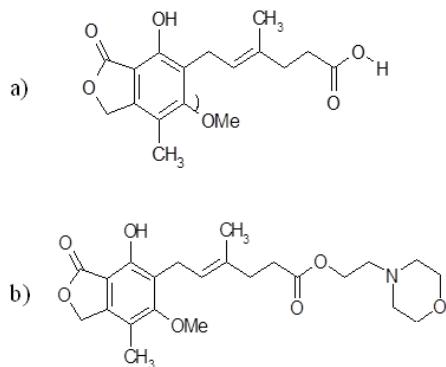
Farmakološki efekti leka direktno zavise od koncentracije leka u plazmi, odnosno njegove slobodne frakcije. Kod određenih lekova, kao što je imunosupresiv mikofenolna kiselina, smanjenje koncentracije dovodi do izostanka terapijskog efekta, dok povećanje koncentracije može dovesti do toksičnih efekata. Ozbiljni neželjeni efekti mogu dovesti do fatalnih ishoda, bilo da se radi o odbacivanju transplantiranog organa ili ozbiljnom oštećenju bubrega i jetre. Iz tog razloga potrebno je sprovoditi stalno praćenje nivoa mikofenolne kiseline u krvi. Imajući u vidu učestalost uzorkovanja, dostupnost i neinvazivan način sakupljanja, saliva ima prednost nad plazmom zbog čega se u skorije vreme sve više koristi kao uzorak. Međutim, zbog brojnih interferirajućih endogenih supstanci, nečistoća i viskoznosti, salivu je neophodno prethodno obraditi za kvalitativno i kvantitativno praćenje mikofenolne kiseline UPLC metodom. U ovom radu je opisana upotreba čvrsto-tečne ekstrakcije kao metode izbora za pripremu uzorka salive. Pošto na efikasnost ekstrakcije utiču različiti eksperimentalni uslovi koje je potrebno strogo kontrolisati, predložen je protokol koji podrazumeva: kondicioniranje polimernog kertridža za čvrsto-tečnu ekstrakciju metanolom i vodom, nanošenje uzorka zajedno sa 0,1 % mravljom kiselinom, ispiranje kertridža vodom i eluiranje mikofenolne kiseline smešom acetonitrila i 0,2 % mravlje kiseline.

Ključne reči: mikofenolna kiselina, saliva, uzorkovanje, priprema uzorka, čvrsto-tečna ekstrakcija.

1. Uvod

1.1 Značaj terapijskog praćenja mikofenolne kiseline

Mikofenolna kiselina je imunosupresiv koji se koristi nakon transplantacije organa, najčešće bubrega, srca i jetre, kao i u terapiji nekih autoimunih bolesti (reumatoidnog artritisa, lupusa nefritisa, nekih dermatoloških oboljenja, vaskulitisa). Iako je mikofenolna kiselina aktivni princip, u cilju poboljšanja resorpcije u terapiji se koristi u obliku estra, mikofenolat mofetila (Slika 1). Mikofenolat mofetil se kompletno resorbuje nakon *per os* primene i pod dejstvom esteraza hidrolizuje do aktivnog oblika. Oslobođena kiselina se dalje metaboliše do fenil- i acil-glukuronida mikofenolne kiseline koji se eliminisu iz organizma putem urina, a samo malim delom (6 %) se izlučuju putem stolice. Mikofenolna kiselina selektivno inhibira proliferaciju T- i B-limfocita tako što se vezuje za enzim inozin monofosfat dehidrogenazu (za mesto za koje se vezuje nikotinamid) i tako selektivno, reverzibilno i nekompetitivno inhibira ovaj enzim. Pošto je enzim inozin monofosfat dehidrogenaza uključen u *de novo* sintezu purina, ova inhibicija ima za posledicu izostanak proliferacije [1, 2].



Slika 1. Hemijska struktura mikofenolne kiseline (a) i mikofenolat mofetila (b)

Figure 1. Chemical structure of mycophenolic acid (a) and mycophenolate mofetil (b)

Mikofenolna kiselina se visokim procentom vezuje za proteine plazme, albumine (više od 95 %), a za efekte je odgovoran mali procenat slobodne frakcije leka. Predoziranje lekom dovodi do povećane nefrotoksičnosti, a subdoziranje do odbacivanja transplantata. Vezivanje za proteine podleže varijabilnostima u populaciji zbog genetike, zdravstvenog stanja pacijenta ili primene drugih lekova koji se kompetitivno vezuju za albumine. Metabolizam mikofenolne kiseline, takođe, podleže interindividualnim varijabilnostima zbog postojanja genetskog polimorfizma. Kod

pacijenata sa ozbiljnom bubrežnom disfunkcijom dolazi do smanjenja procenta vezane frakcije leka pa slobodna frakcija dramatično raste, kao i potencijal ispoljavanja neželjenih efekata [1–3]. Iz navedenog, jasna je značajnost terapijskog praćenja i određivanja koncentracije mikofenolne kiseline u plazmi.

Pregledom literature pronađene su metode koje koriste plazmu kao biološki materijal prilikom određivanja mikofenolne kiseline [2, 4]. Međutim, zbog učestalosti uzorkovanja krvi i invazivnosti postupka venopunkcije, plazma ne predstavlja najpogodniji biološki materijal za terapijsko praćenja leka, posebno kod dece, pacijenata sa nepristupačnim venama i malokrvnih pacijenata. Ni urin ne bi bio pogodan biološki materijal jer mikofenolnu kiselinu koristi populacija sa kompromitovanim funkcijom bubrega i, posledično, izlučivanje leka i metabolita je podložno varijacijama.

Prema najnovijim istraživanjima, saliva se može koristiti kao biološki materijal za terapijsko praćenje mikofenolone kiseline. Iako je u kliničkoj praksi materijal izbora i dalje plazma, mogućnost korišćenja salive je posebno značajna jer ona predstavlja prirodni ultrafiltrat plazme i praktično je deproteinizovana tečnost (procenat proteina manji od 1 %) u kojoj se nalazi samo nevezan lek. U isto vreme, koncentracija leka u salivu je u dobroj korelaciji sa koncentracijom slobodne frakcije leka u krvi [4, 5].

1.2. Upotreba salive kao biološkog materijala

Saliva predstavlja jedinstven prostor za distribuciju lekova i na njoj su primenljivi mnogi opšti principi koji regulišu kretanje lekova u organizmu. U idealnoj situaciji, postoji konstantan odnos nivoa leka u salivu i plazmi koji je nezavisan od koncentracije leka i koji ne pokazuje interindividualne razlike. Najvažnije osobine lekova koje regulišu penetraciju leka u salivu su molekulska veličina, lipofilnost, pKa i vezivanje za proteine plazme. Osnovni fiziološki faktori su pH vrednosti pljuvačke, njen protok i patofiziološko stanje usne duplje. Farmakokinetički modeli za distribuciju lekova u salivu, koji obuhvataju većinu ovih faktora, zasnovani su na osnovnim principima klirensa organa i protoka salive uzimajući u obzir stepen vezivanja za proteine plazme i *Henderson-Hasselbalch*-ovu jednačinu za pH/pKa efekte. Slabe baze su najmanje pouzdane za monitoring iz salive jer su osetljive na uticaj pH. Neutralne komponente su najpouzdanije i koncentracija ovih, kao i mnogih slabo kiselih lekova, odražavaće vrednost lekova u plazmi. Promene u protoku pljuvačke, vremenu uzorkovanja i neke patofiziološke promene ispitanika mogu zakomplikovati upotrebu salive u terapeutskom praćenju i upotrebu u farmakokinetičkim studijama [6–10].

Adekvatno merenje protoka i sastava salive ključno je za mnoge dijagnostičke, eksperimentalne i kliničke protokole. Saliva se može sakupljati pod stimulisanim ili nestimulisanim uslovima. Stimulacija protoka salive može se vršiti raznim agensima od kojih se gustatorni i mastikatori stimuli najčešće koriste za ubrzavanje protoka.

Najčešće korišćeni stimulusi su parafin, žvakaće gume i limunska kiselina dok se farmakološki i električni stimulansi koriste za tretman pacijenata kod kojih je protok salive usporen. Nestimulisana saliva je ona koja se sakuplja bez stimulacije.

Saliva može biti sakupljena kao ukupna ili se može sakupljati pojedinačno sa svake pljuvačne žlezde. Ukupna saliva je proizvod rada svih žlezda dok pojedinačna saliva može biti sakupljena direktno iz parotidne, submandibularne ili sublingvalne žlezde. Saliva sakupljena iz pojedinačnih žlezda je u prednosti u odnosu na ukupnu salivu jer ne sadrži elemente koji se obično nalaze u ukupnoj salivi kao što su ostaci epitelijalnih ćelija, hrane, bakterije, leukociti. Ali, ukoliko je potrebno utvrditi rad svih pljuvačnih žlezda, ukupna saliva je bolji izbor, klinički je relevantnija i znatno se češće sakuplja [6–10].

Protok salive pokazuje značajne inter-individualne kao i intra-individualne razlike u određenim situacijama, pa je stoga potrebno standardizovati metode za prikupljanje salive. Nestimulisani protok je pod uticajem mnogih faktora, od kojih je stepen hidratacije najznačajniji. Potvrđeno je da gubitak telesne tečnosti od 8 % dovodi do 100 % smanjenja protoka salive. Hiperhidratacija, izlaganje svetlosti, mirisni stimulansi i položaj tela, takođe, mogu uticati na protok. Uočeno je da, ukoliko se saliva uzorkuje od pacijenata koji stoje, protok će biti veći, dok je u ležećem položaju protok manji. Ispitanici bi trebalo da ne puše, i ne unose hranu i piće 1-2 časa pre uzorkovanja. Pre samog uzorkovanja, usnu duplju bi trebalo isprati dejonizovanom vodom. Salivu treba prikupljati u sedećem položaju, glavu nagnuti napred i otvoriti oči. Neophodan je period mirovanja od 5 minuta u takvom položaju sa minimalnim pokretima lica [6–10].

Treba naglasiti da protok i sastav salive takođe zavise i od dnevnih i sezonskih promena. Protok parotidne žlezde dostiže svoj maksimum u zimskom periodu, dok ukupni protok podleže cirkardijalnom ritmu i dostiže maksimum u popodnevним časovima. Stanje pacijenta i upotreba lekova može uticati na protok i sastav salive. Kada se vrši sakupljanje stimulisane salive, faktori kao što su vreme stimulacije, priroda stimulansa koji se koristi i veličina pljuvačnih žlezda utiču na sastav i brzinu protoka [6–10]. Zbog potencijalnih interferencija svih pomenutih faktora, trebalo bi standardizovati vreme i način sakupljanja salive kako bi se izbegli uticaji na rezultate studija.

1.3. Priprema uzoraka primenom čvrsto-tečne ekstrakcije

Analiza uzoraka je neophodna u terapijskom praćenju lekova, a obično sadrži pet faza: uzorkovanje, priprema uzorka, separacija (razdvajanje), određivanje (kvalitativna i kvantitativna analiza) i analiza podataka. Svaka faza je bitna za dobijanje pouzdanih rezultata, ali uzorkovanje i priprema uzoraka su ključne komponente analitičkog procesa. Na ove dve faze se potroši preko 80 % vremena u sprovođenju analize. Sve

faze su uzastopne i ako se jedna od ovih faza ne izvede na pravi način, učinak postupka će biti loš i doveće do nepouzdanih rezultata [11–14].

Čvrsto-tečna ekstrakcija (eng. *Solid Phase Extraction*, SPE) je separaciona metoda pogodna za izolovanje analita, njihovo koncentrisanje i prečišćavanje. To je tehnika zasnovana na selektivnoj raspodeli jedne ili više komponenti između dve faze, od kojih je jedna čvrsti sorbens, a druga faza je tečnost, mada može biti i emulzija, gas ili superkritični fluid. Pri procesu čvrsto-tečne ekstrakcije dolazi do retencije analita (postupak sa retencijom analita) ili interferencije (postupak bez retencije analita) na sorbenu. Mehanizmi su različiti i zavise od karakteristika sorbensa i analita. Da bi retencija analita bila kvantitativna i reproduktivna, potrebno je podesiti i kontrolisati eksperimentalne parametre koji utiču na efikasnost čvrsto-tečne ekstrakcije.

Izbor SPE sistema zavisi od osobina analita i sorbensa. U odnosu na polarnost analita i sorbensa, SPE metoda može biti:

1. Normalno fazna (eng. *Normal Phase*, NP) SPE: koristi se kada je analit polaran; bira se polaran sorbens, a interakcija koja se odvija između analita i sorbensa može biti vodonična veza, dipol-dipol interakcija ili $\pi-\pi$ interakcija.
2. Reverzno fazna (eng. *Reversed Phase*, RP) SPE: primenjuje se kada je analit nepolaran ili slabo polaran; bira se nepolarni sorbens, a interakcije koje se ostvaruju na međufazi su *Van der Waals*-ove (particione, hidrofobne).
3. Jonoizmenjivačka SPE: može biti anjonska i katjonska; mehanizam retencije zasniva se na elektrostatičkom privlačenju između funkcionalnih grupa analita i sorbensa; za interakciju je neophodno da funkcionalne grupe analita budu u jonizovanom obliku što se postiže podešavanjem pH vrednosti uzorka, a u zavisnosti od pKa analita i sorbensa.

Osim strukture i osobina ciljanog molekula, prilikom izbora sorbensa bitna je i priroda uzorka. Uzorak za SPE može da bude u obliku vodenog rastvora ili rastvora u organskom rastvaraču. Ukoliko je uzorak voden rastvor, ciljani analit u njemu može biti prisutan u jonizovanom ili nejonizovanom obliku. Kada je ciljani analit nejonizovan, adekvatan izbor je RP-SPE. Ukoliko je analit jonizovan, pogodna je jonoizmenjivačka SPE. Zavisno od toga kako ciljani analit jonizuje, biraju se jak katjonski ili anjonski izmenjivač za analit koji slabo jonizuje, odnosno slab katjonski ili anjonski izmenjivač za analit koji jako jonizuje. Ukoliko je uzorak u obliku rastvora u organskom rastvaraču, zavisno od polarnosti može se primeniti NP-SPE ili RP-SPE, a ukoliko je analit jonizovan, primenjuje se jonoizmenjivačka SPE [11–14].

Mehanizmi retencije zavise od karakteristika sorbensa i mogu biti zasnovani na principima jednostavne adsorpcije, građenja kompleksa, građenja jonskih parova ili jonske izmene. Da bi retencija ciljanog analita bila efikasna, interakcija sorbensa sa

analitom mora biti znatno jača od svih interakcija ciljanog analita sa komponentama matriksa. Na efikasnost SPE utiče i kapacitet sorbensa, jačina interakcije sa analitom, zatim, vrsta rastvarača, temperatura i način ekstrakcije. U zavisnosti od složenosti uzorka, postoji mogućnost upotrebe kombinovanih sorbensa različitih mehanizama retencije. U novije vreme u upotrebi su polimerni sorbensi većih kapaciteta i bolje selektivnosti.

Osnovni zahtev pri izboru sorbensa za SPE je da dobijena *Recovery* vrednost bude reproduktivna pri svakom analiziranju. Izvođenje SPE se definiše protokolima kako bi prinos ekstrakcije bio što veći. Postupak SPE sastoji se od sledeća četiri koraka:

1. Kondicioniranje: izvodi se propuštanjem rastvarača ili smeše rastvarača kroz kertridž, čime je omogućeno njegovo aktiviranje.
2. Nanošenje uzorka: propuštanjem uzorka u kome se nalazi analit dolazi do vezivanja komponenti iz matriksa za sorbens.
3. Ispiranje: cilj ove faze je da se odstrane komponente matriksa, a da analit ostane vezan za sorbens.
4. Eluiranje: koristi se rastvarač koji ima jaku eluacionu moć, odnosno sposobnost da raskine veze između analita i sorbensa. Zapremina rastvarača treba da bude takva da se uz minimalno razblaženje dobijaju reproduktivne *Recovery* vrednosti. Takođe, brzina protoka rastvarača može uticati na reproduktivnost eluiranja [11–14].

2. Eksperimentalni deo

2.1. Hemikalije i reagensi

Referentni standard mikofenolne kiseline i mikofenolat mofetila dobijeni su od Sigma Aldrich. Za hromatografsku analizu korišćen je acetonitril HPLC čistoće (Sigma Aldrich) i mravlja kiselina HPLC čistoće (Merck), a tokom ekstrakcije metanol i amonijum hidroksid *pro analysi* čistoće (Centrohem).

2.2. Uređaji i eksperimentalni uslovi

Za hromatografsku analizu korišćen je tečni hromatograf UPLC Accela, Thermo Scientific opremljen autosamplerom, UV/VIS *photo-diode array* detektorom i degazerom kao i hromatografska kolona Hypersil Gold (50 mm x 2,1 mm, 1,9 µm veličine čestica), Thermo Scientific. Za prečišćavanje vode korišćen je Simplicity 185 sistem (Millipore). Hromatografsku mobilnu fazu predstavljala je smeša acetonitril - mravlja kiselina (0,1 % vodenih rastvor) pripremljena u odnosu 30:70 (V/V) i propušтana pri protoku od $350 \mu\text{L min}^{-1}$. Mobilna faza je pre upotrebe filtrirana kroz najljonske

membranske filtere veličine pora $0,45 \mu\text{m}$ Agilent Technologies. Temperatura kolone je podešena na 25°C dok je detekcija vršena na talasnoj dužini od 254 nm . Injekciona zapremina je bila $5 \mu\text{L}$.

Postupak čvrsto-tečne ekstrakcije je izvođen pomoću Phenomenex komore za ekstrakciju i Phenomenex kertridža Strata X 33u Polymeric Reversed Phase $60 \text{ mg} / 3 \text{ mL}$.

2.3. Priprema rastvora

2.3.1. Priprema rastvora referentnih standarda

Osnovni rastvori referentnih standarda mikofenolne kiseline i mikofenolat mofetila pripremani su u koncentraciji 1 mg mL^{-1} pri čemu je kao rastvarač korišćena smeša acetonitril–voda (50:50, V/V). Radna smeša standarda je pripremljena razblaživanjem osnovnih rastvora standarda istom smešom rastvarača i sadržala je $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ mikofenolne kiseline i $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ mikofenolat mofetila kao internog standarda. Radna smeša standarda je korišćena za opterećivanje salive i za razvoj SPE metode. Pre nanošenja na kertridže, 1 mL radne smeše standarda je pomešan sa 1 mL salive, odnosno sa 1 mL mobilne faze kako bi se postigle iste koncentracije analita.

2.3.2. Prikupljanje i priprema uzorka salive

Pljuvačka je sakupljana od 6 zdravih dobrovoljaca (4 ženskog pola, 2 muškog). Sakupljana je pod nestimulisanim uslovima i to kao mešovita. Uzorci pljuvačke su pomešani i do analiziranja čuvani na temperaturi od -20°C . Pre nanošenja na kertridže, zbog viskoznosti, pljuvačka je razblaživana u odnosu 1:1 (V/V) i opterećivana radnom smešom standarda tako što je u 1 mL pljuvačke dodat 1 mL radne smeše standarda. Nakon mešanja na ultrazvučnom kupatilu, vršeno je izdvajanje proteina istaloženih u prisustvu organskog rastvarača, centrifugiranjem na 4000 obrtaja min^{-1} , u trajanju od 10 minuta. Dobijeni supernatant je zatim nanošen na kertridže.

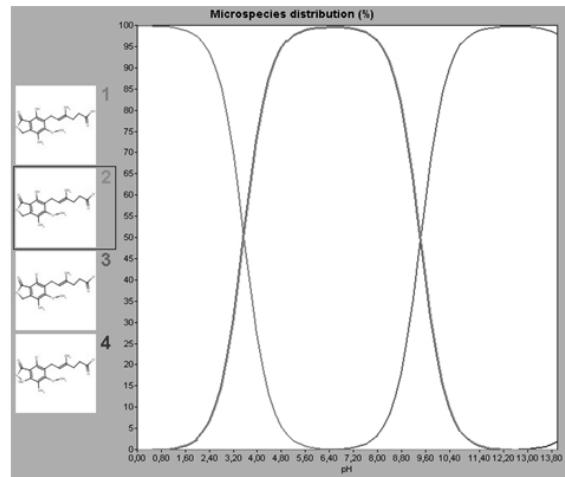
3. Rezultati i diskusija

Kompleksnost i varijabilnost biološkog materijala je glavni problem kod razvoja bioanalitičke metode. Osim toga, lekovi i metaboliti su u biološkom materijalu prisutni u veoma niskim koncentracijama, tako da su za određivanje potrebne veoma osetljive metode. Zato je prečišćavanje i koncentrisanje biološkog materijala glavni korak u razvoju bioanalitičkih metoda.

Salivu je neophodno prečistiti pre daljeg određivanja zbog viskoznosti i interferirajućih komponenti. Interferencije, prisutne u matriksu, podrazumevaju imunoglobuline, proteine, enzime, mucin, kao i ureu i amonijak. U literaturi je zabeleženo prečišćavanje uzorka uglavnom putem taloženja proteina i

centrifugiranjem, nakon čega se koristi bistri supernatant [2, 4, 15]. Imajući u vidu da su savremeni analitički sistemi jako osetljivi i da se neka od interferencija može ireverzibilno vezivati (npr. za hromatografsku kolonu), ovakav postupak obično rezultira visokim troškovima čišćenja ili zamenom delova uređaja. Uklanjanje interferencija iz matriksa je značajno i zbog mogućnosti pojave neželjenih pikova na hromatogramu i otežavanja tumačenja dobijenih rezultata. U literaturi je zabeleženo korišćenje pretkolona koje bi trebalo da preduprede kontaminaciju kolone [15]. U cilju povećanja selektivnosti metode, u ovom radu je ispitana mogućnost primene čvrsto-tečne ekstrakcije za prečišćavanje uzorka salive za dalju analizu mikofenolne kiseline primenom UPLC metode.

Mikofenolna kiselina je kiselo jedinjenje sa pK_a vrednostima 3,60 i 9,50. Prva pK_a vrednost potiče od kiselih osobina karboksilne grupe, a druga od slabo kiselih osobina fenolne grupe. Na Slici 2 je prikazana raspodela jonskih i molekulskih oblika leka u zavisnosti od pH vrednosti rastvora, dobijena pomoću softvera *Marvin Sketch 4.1.13, Chem Axon Ltd*. Može se uočiti da se do pH 3,60 ovaj lek dominantno nalazi u molekulskom obliku. Daljim porastom pH, raste udio karboksilatnog anjona koji je najzastupljeniji oblik do pH 9,50, kada se u rastvoru nalaze i karboksilatni i fenolatni anjon. Na osnovu uvida u raspodelu jonskog i molekulskog oblika vršeno je predviđanje stepena vezivanja za sorbens i vrsta interakcije leka sa sorbensom i rastvaračima korišćenim u različitim fazama SPE.



Slika 2. Raspodela jonskih i molekulskih formi mikofenolne kiseline u zavisnosti od pH vrednosti rastvora

Figure 2. Distribution of ionic and molecular forms of mycophenolic acid in dependence of solution pH value

Pregledom literature je uočeno da se StrataTM X, *Phenomenex* SPE kertridži sa polimernim sorbensom veoma uspešno koriste u reverzno faznoj ekstrakciji, omogućavajući intenzivnu retenciju neutralnih, baznih ili kiselih jedinjenja [16]. Ovi kertridži pokrivaju širok spektar analita i omogućavaju jednostavniji razvoj metode za brzu i efikasnu pripremu uzorka. U ovom radu ispitana je mogućnost njihove primene za prečišćavanje uzoraka salive koja sadrži mikofenolnu kiselinu.

U preliminarnim ispitivanjima, varirani su uslovi nanošenja uzorka, ispiranja i eluiranja (Tabele I, II i III). Kondicioniranje je bilo isto za sve varijacije i podrazumevalo je korišćenje metanola i vode. U cilju procene selektivnosti metode, u svim eksperimentima je paralelno, u odvojenom kertridžu, propušтана slepa proba koju čini matriks bez analita.

Tabela I Varijacije postupka nanošenja uzorka

Table I Variation of sample introduction procedure

Kondicioniranje	2 puta: 2 mL metanola, potom 2 mL vode		
Nanošenje uzorka	1 mL smeše acetonitril - voda 50:50 (V/V) + 1 mL smeše standarda	1 mL 0,1 % mravlje kiselina + 1 mL smeše standarda	2 mL 0,1 % mravlje kiselina + 1 mL smeše standarda
Ispiranje	1 mL vode		
Eluiranje	2 mL smeše acetonitril 0,2 % mravlja kiselina 50:50 (V/V)		

Tabela II Varijacije postupka ispiranja kertridža

Table II Variation of cartridge washing procedure

Kondicioniranje	2 puta: 2 mL metanola, potom 2 mL vode				
Nanošenje	1 mL 0,1 % mravlje kiselina + 1 mL smeše standarda				
Ispiranje	1 mL 0,1 % mravlje kiseline	2 mL 0,1 % mravlje kiseline	1 mL vode	1,5 mL vode	2 mL vode
Eluiranje	2 mL smeše acetonitril - 0,2 % mravlja kiselina 50:50 (V/V)				

Tabela III Varijacije postupka eluiranja**Table III** Variation of elution procedure

Kondicioniranje	2 puta: 2 mL metanola, potom 2 mL vode			
Nanošenje	1 mL 0,1 % mravlje kiseline + 1 mL smeše standarda			
Ispiranje	1 mL vode			
Eluiranje	1 mL AcN + 1 mL 0,1 % mravlje kis.	1 mL AcN + 2 mL 0,1 % mravlje kis.	1 mL AcN + 1 mL 0,2 % mravlje kis.	1 mL AcN + 1 mL amonijum hidroksida

Nakon nanošenja uzorka, sakupljane su zapremine koje su prošle kroz kertridž za svaku varijaciju. U ovoj fazi, analit treba da se što više veže za sorbens. Najbolji rezultati dobijeni su kada se nanošenje vrši sa 1 mL 0,1 % mravlje kiseline. Pošto je pH vrednost korišćene smeše rastvarača u fazi nanošenja bila 3,01 očekivano je da se analit nalazi uglavnom u molekulskom obliku. U interakciji analita sa sorbensom zastupljene su hidrofobne *Van der Waals*-ove veze (benzenov prsten i račvasti alkil niz sorbensa interaguju sa ugljovodoničnim nepolarnim delom strukture analita) i vodonične veze sa polarnim delovima sorbensa (laktamska grupa sorbensa i polarna fenolna i karboksilna grupa mikofenolne kiseline). Budući da je pri ovim uslovima uočeno najveće vezivanje analita za sorbens, u svim ostalim eksperimentima nastavljeno je nanošenje uzorka sa 1 mL 0,1 % mravlje kiseline. Dalje su vršene varijacije uslova za ispiranje i eluiranje uzorka.

U fazi ispiranja je potrebno da se što više nečistoća poreklom iz rastvora ili matriksa otkloni sa sorbensa, a da analit ostane vezan za sorbens. Propuštanjem kroz kertridž različitih rastvarača za ispiranje, sakupljani su uzorci koji su analizirani u UPLC sistemu. Dobijeni rastvori koji su sadržali najveće količine nečistoća, interferencija ili supstanci poreklom iz biološkog materijala, i u kojima nije uočeno prisustvo supstanci od interesa, odslikavaju najbolji izbor rastvarača za ispiranje. Ispitivan je uticaj rastvarača različite kiselosti, da bi se ustanovio stepen spiranja analita u neutralnoj i kiseloj sredini. Zaključeno je da je korišćenje vode pogodnije od vodenog rastvora mravlje kiseline budući da voda ne raskida veze analita i sorbensa. Nije dobijena značajna razlika nakon korišćenja različitih zapremina vode, pa je izabrana najmanja zapremina, od 1 mL, kako bi faza ispiranja bila što kraća i jednostavnija.

Eluiranjem treba da se raskine veza analita i sorbensa i da celokupna količina analita pređe u rastvor koji se sakuplja i dalje analizira. Isprobane su različite kombinacije udela acetonitrila (AcN) i mravlje kiseline, kao i acetonitril i amonijum hidroksid. Najefikasnije eluiranje je postignuto korišćenjem 1 mL AcN sa 1 mL 0,2 %

mrvlje kiseline. Pri pH vrednosti ovog eluenta (2,88), analit se u većem stepenu nalazi u molekulskom obliku i vrši se raskidanje polarnih veza sa sorbensom.

U cilju provere efikasnosti predloženog postupka ekstrakcije i preciznosti (reprodukтивности) dobijenih rezultata, pri izabranim uslovima propušтано je još devet novih kontrolnih uzoraka salive. Preciznost predstavlja stepen rasipanja pojedinačnih rezultata dobijenih iz više paralelnih određivanja iz uzorka pod istim uslovima. Statistički je procenjena izračunavanjem relativne standardne devijacije (RSD, %). Uzorci su pripremani u 3 QC (eng. *Quality Control*) koncentracije leka (niska, srednja i visoka) sa po 3 ponavljanja. Prema FDA smernicama (eng. *Food and Drug Administration*) dozvoljeno je da RSD vrednost za svaku QC koncentraciju bude manja od 15 % [17]. Efikasnost ekstrakcije je procenjivana na osnovu izračunavanja *Recovery* vrednosti, odnosno, na osnovu rezultata koji su dobijeni analiziranjem standardnih rastvora koji nisu propuštani kroz kertridže i standardnih rastvora kojima je saliva opterećena a zatim prečišćena predloženom SPE metodom (Tabela IV).

Tabela IV Rezultati ispitivanja efikasnosti i preciznosti metode

Table IV Results of method efficacy and precision testing

Koncentracija analita	10 µg mL ⁻¹			40 µg mL ⁻¹			100 µg mL ⁻¹		
Recovery, %	104,10	102,05	102,05	96,76	102,95	81,22	75,99	96,52	97,22
Srednje Recovery, %	102,73			93,64			89,91		
RSD, %	1,15			11,95			13,41		

RSD Relativna standardna devijacija

Na osnovu prikazanih *Recovery* vrednosti, dokazana je zadovoljavajuća efikasnost postupka ekstrakcije, a RSD vrednosti su ukazale na dobru preciznost određivanja mikofenolne kiseline. Iako je predložena SPE metoda brza i jednostavna za izvođenje, zbog složenosti korišćenog biološkog materijala, u postupku ekstrakcije potrebno je voditi računa o stabilnosti uzorka, imajući u vidu niske koncentracije leka koje se očekuju kod pacijenata.

4. Zaključak

Saliva predstavlja kompleksan uzorak endogenih supstanci, velike viskoznosti koju dodatno komplikuje i prisustvo epitelnih ćelija. Iz tog razloga veoma je važna

metoda pripreme i prečišćavanja uzorka salive za kvalitativno-kvantitativnu analizu raspoložive koncentracije lekova ili njihovih metabolita. U ovom radu optimizovani su uslovi čvrsto-tečne ekstrakcije kao metode izbora za pripremu uzorka salive za određivanje imunosupresiva mikofenolne kiseline. Svaka od četiri faze metode čvrsto-tečne ekstrakcije je optimizovana i predloženi su optimalni uslovi koji podrazumevaju: kondicioniranje polimernog kertridža za čvrsto-tečnu ekstrakciju metanolom i vodom, nanošenje uzorka zajedno sa 0,1% mravljom kiselinom u odnosu 1 :1 (V:V), ispiranje kertridža vodom i eluiranje mikofenolne kiseline smešom acetonitrila i 0,2 % mravlje kiseline, takođe, u odnosu 1 : 1 (V:V).

Zahvalnica

Ovaj rad predstavlja deo rezultata naučno-istraživačkog projekta broj 172033 koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

5. Literatura

1. Protić A. Razvoj metoda za ispitivanje stabilnosti mikofenolat mofetila i praćenje mikofenolne kiseline i glukuronida mikofenolne kiseline u plazmi i urinu. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet; 2011.
2. Bing S, Shuijun L, Yuan Z, Xuelu Y, Yu F, Zhihong L, Qiang H, Chen Y. Determination of total, free and saliva mycophenolic acid with a LC-MS/MS method: Application to pharmacokinetic study in healthy volunteers and renal transplant patients. J Pharm Biomed Anal. 2009; 50:515-21.
3. Staatz C, Tett S. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolate in solid organ transplant recipients. Clin Pharmacokinet. 2007; 46 (1):13-58.
4. Wiesen M, Farowski F, Feldkötter M, Hoppe B, Müller C. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantification of mycophenolic acid and its phenolic glucuronide in saliva and plasma using a standardized saliva device. J Chromatogr A. 2012; 1241:52-9.
5. Kuypers D, Le Meur Y, Cantarovich M, Tredger M, Tett S, Cattaneo D, Tönshoff B, Holt D, Chapman J, Van Gelder T. Consensus report on therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid in solid organ transplantation. Clin J Am Soc Nephrol. 2010; 5:341-58

6. Navezesh C, Christensen J, Brightman N. Clinical criteria for the diagnosis of salivary gland hypofunction. *J Dent Res.* 1999; 71(7):1363-69.
7. Dawesc H. Physiological factors affecting salivary flow rate, oral sugar clearance and the sensation of dry mouth in man. *J Dent Res.* 1987; 66:648-53.
8. Shannoi NL. Climatological effects on human parotid gland function. *Arch Oral Biol.* 1996; 11:451-53.
9. Dawesc H. Rhythms in salivary flow rate and composition. *Int J Chronobiol.* 1974; 2:253-79.
10. Dawesc H. The effects of flow rate and duration of stimulation on the concentrations of protein and the main electrolytes in human parotid saliva. *Arch Oral Biol.* 1969; 14:277-94.
11. Introduction to Solid Phase Extraction, Charlton scientific Laboratory Suppliers; [preuzeto 2012-11-02] Dostupno na http://www.charltonsci.co.uk/spe_introduction.pdf.
12. Shulamit L. Introduction to Solid Phase Extraction. Medtechnica. 2006; [preuzeto 2012-11-02] Dostupno na http://www.forumsci.co.il/HPLC/SPE-09_pharmacy.pdf.
13. Zwir-Ferenc A, Biziuk M. Solid phase extraction technique – trends, opportunities and applications. *Pol J Environ. Stud.* 2006; 15:677-90.
14. Guide to Solid Phase Extraction, Sigma Aldrich Co. 1998; [preuzeto 2012-11-02] Dostupno na <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>.
15. Mendoza A, Gohh R, Akhlaghi F. Analysis of mycophenolic acid in saliva using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Ther Drug Monit.* 2006; 28:402-06.
16. Phenomenex. [preuzeto 2012-11-02] Dostupno na www.phenomenex.com.
17. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. [preuzeto 2012-11-02] Dostupno na www.fda.gov.

Analysis of mycophenolic acid from saliva samples after its purification with the method of solid-liquid extraction

**Biljana Otašević, Ana Protić*, Jelena Golubović, Mira Zečević,
Milica Cerović, Ljubica Bralović**

University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Department of Drug Analysis,
Vojvode Stepe 450, Belgrade, Serbia

*corresponding author, e-mail: anna@pharmacy.bg.ac.rs

Summary

Pharmacological effect of a drug depends on its free fraction in plasma. By certain drugs, like immunosupresive mycophenolic acid, concentrations below therapeutic lead to rejection of the transplanted organ while concentrations above therapeutic lead to toxic effects, primarily on kidney and liver. For this reason constant monitoring of mycophenolic acid in plasma is necessary. Concerning frequency of sampling, availability and non-invasive way of sampling, saliva presents one of the best biological materials for analysis. On the other hand, numerous interfering endogen substances, impurities and high viscosity of saliva make this biological material difficult for purification. Mycophenolic acid has to be purified and concentrated from saliva to be consequently determined applying appropriate analytical method. In this paper solid phase extraction method for purification of saliva has been presented. The efficacy of solid phase extraction has been influenced by many different experimental parameters, so these parameters has to be strongly controlled, and protocol of extraction procedure has been proposed. In this way conditioning of polymeric sorbent has been done with methanol and purified water, samples have been applied together with 0.1 % formic acid, washing has been done with purified water and elution of mycophenolic acid has been performed with acetonitrile and 0.2 % formic acid.

Keywords: Mycophenolic acid, saliva, sampling, sample preparation protocol, solid-phase extraction.

Primena metoda tankoslojne hromatografije i hromatografije na koloni u praćenju sinteze α -tokoferil-lizin estra

Žarko Gagić^{1*}, Branka Ivković², Katarina Nikolić², Danica Agbaba²

¹ Univerzitet u Banjoj Luci – Medicinski fakultet, Odsek farmacijia, Save Mrkalja 14,
Banja Luka, Republika Srpska

² Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za farmaceutsku hemiju,
Vojvode Stepe 450, Beograd, Srbija

*autor za prepisku, Tel: +387 51 340 106; e-mail: zarko.gagic@unibl.rs

Kratak sadržaj

Vitamin E sačinjavaju dve klase jedinjenja, tokoferoli i tokotrienoli. Dobro je poznata njegova antioksidativna aktivnost, a danas se posebna pažnja obraća na upotrebu vitamina E i njegovih derivata u prevenciji i terapiji kancera. Sintetisani su brojni derivati vitamina E koji ispoljavaju antiproliferativnu aktivnost. Pokazano je da estar α -tokoferola sa aminokiselom lizinom ispoljava bolju antiproliferativnu aktivnost na MCF-7 ćelijskoj liniji karcinoma dojke u odnosu na komercijalno dostupne preparate. U prvoj fazi sintetisan je estar α -tokoferola sa di-Cbz-lizinom. Tok sinteze estra praćen je metodom tankoslojne hromatografije (mobilna faza: *n*-heksan/etilacetat 3: 1,2 v/v), dok je prečišćavanje proizvoda izvršeno *dry flash* hromatografijom i preparativnom hromatografijom na ploči (mobilna faza: *n*-heksan -etil acetat 3: 1,2 v/v). U drugoj fazi katalitičkom hidrogenacijom uklonjene su zaštitne Cbz-grupe sa amino grupa lizina. Finalni proizvod α -tokoferil lizin estar detektovan je primenom TLC metode (mobilna faza: dihlormetan–metanol–amonijak 9 : 0,9 : 0,1 v/v/v).

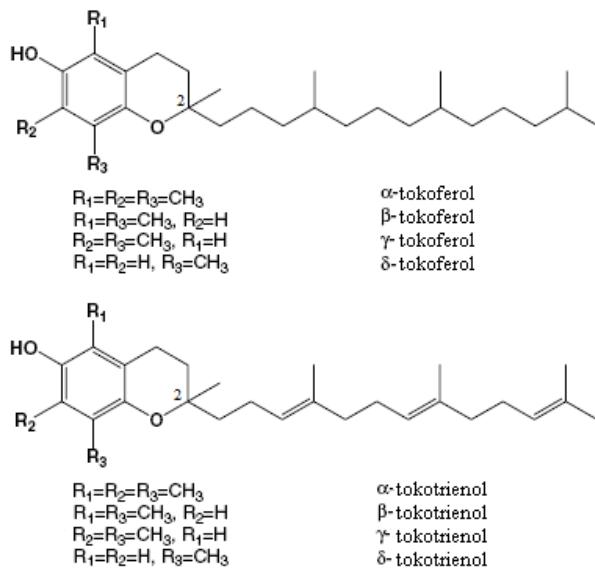
Ključne reči: α -tokoferol; antiproliferativna aktivnost; MCF-7;
tankoslojna hromatografija; *dry flash* hromatografija

Uvod

Vitamin E predstavlja snažan prirodni antioksidans koji u organizmu kontroliše reakcije peroksidacije i stvaranje slobodnih radikala. Ustanovljeno je da mnoga biološka dejstva individualnih izoformi vitamina E ne zavise od njihove antioksidativne aktivnosti. Danas se posebna pažnja obraća na upotrebu vitamina E i njegovih derivata u prevenciji i terapiji kancera. Specifične forme vitamina E ispoljavaju snažnu apoptotsku aktivnost protiv različitih tipova tumorskih ćelija, dok ne deluju, ili u maloj meri deluju, na aktivnost zdravih ćelija.

Eksperimentalni podaci su pokazali da unutarćeljski mehanizmi nastajanja apoptotskih efekata specifičnih formi vitamina E pokazuju veliki diverzitet kod različitih tipova ćelija kancera. Takođe je dokazano, da derivati vitamina E mogu da uspostave ponovnu osetljivost multirezistentnih tumorskih ćelija na hemoterapijske agense. Ovi podaci jasno ukazuju da se sintetski i neki prirodni analozi vitamina E mogu efikasno koristiti u terapiji kancera, bilo sami ili u kombinaciji sa drugim antitumorskim lekovima, kako bi se poboljšalo njihovo dejstvo i smanjila toksičnost [1, 2].

Vitamin E sačinjavaju dve klase jedinjenja, tokoferoli i tokotrienoli, koje karakteriše hromanski prsten i izoprenski bočni lanac. Članovi svake familije su označeni kao alfa (α)-, beta (β)-, gama(γ)- ili delta (δ)-, u zavisnosti od rasporeda metil grupa vezanih za hromanski deo molekula (Slika 1a). Postoji 8 mogućih stereoizomera, pri čemu se samo RRR-forma javlja u prirodi. Tokoferoli i tokotrienoli se razlikuju po bočnom lancu u položaju 2 hromanskog prstena, koji je kod tokoferola zasićen a kod tokotrienola nezasićen (Slika 1a) [3].



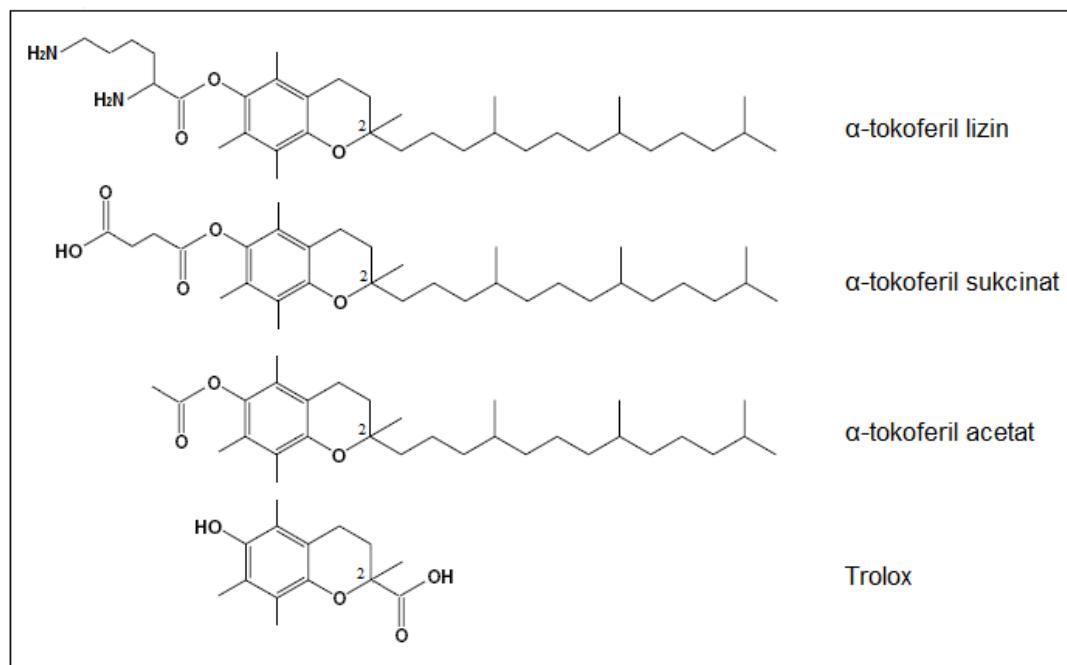
Slika 1a. Jedinjenja iz grupe vitamina E

Figure 1a. The compounds of the vitamin E family

Derivati vitamina E, kao što je α -tokoferil sukcinat, koji su esterifikacijom sa dikarboksilnim kiselinama izgubili aktivnost protiv slobodnih radikala, deluju na rast mnogih malignih ćelija i indukuju apoptozu efektivnije od samog α -tokoferola. Studije veze između strukture i dejstva ukazuju na ključnu ulogu sukcinil komponente u započinjanju *pro*-apoptotske kaskade događaja kroz synergističke puteve. α -Tokoferil komponenta je uključena u aktivaciju protein fosfataze 2A (PP2A), što vodi ka inaktivaciji protein kinaze C (PKC) i defosforilaciji *anti*-apoptotičkog mitohondrijalnog proteina *bcl-2*. Naelektrisana sukcinil grupa uzrokuje destabilizaciju mitohondrijalnih i lizozomalnih membrana, što dalje vodi ka α -tokoferil-indukovanom oslobođanju citohroma C, i prema tome pojačanju apoptotičkog signala [4 - 6].

Građenjem aminokiselinskih estara u molekul se uvodi pozitivno nanelektrisana grupa koja se u *in vivo* uslovima hidrolizuje pod dejstvom esteraza. Modifikacijom dužine bočnog aminokiselinskog lanca smanjuje se lipofilnost i povećava rastvorljivost u vodenom medijumu. Hromanski prsten kao farmakoforni deo molekula ostaje nedirnut, jer *nor* i *homo* analozi pokazuju neznatno bolju antioksidativnu aktivnost.

Antiproliferativna aktivnost estra α -tokoferola sa lizinom (Slika 1b) na humanoj ćelijskoj liniji kancera dojke (MCF-7) upoređena je sa komercijalno dostupnim derivatima vitamina E (α -tokoferol, α -tokoferil acetat, α -tokoferil sukcinat i *rac-Trolox*). Zamena acetatne grupe α -tokoferil acetata sa lizinom je imala za rezultat značajan porast antiproliferativne aktivnosti [7].



Slika 1b. Derivati vitamina E

Figure 1b. Derivatives of vitamin E

Cilj ovog rada bio je definisanje optimalnih hromatografskih uslova za praćenje toka sinteze α -tokoferil-lizin estra, kao i hromatografskih uslova za prečišćavanje finalnog proizvoda. Tok sinteze estra praćen je metodom tankoslojne hromatografije (eng. *Thin Layer Chromatography – TLC*), dok je za prečišćavanje proizvoda upotrebljena *dry flash* hromatografija i preparativna hromatografija na ploči.

Eksperimentalni deo

Rastvarači i hemikalije. Svi rastvarači i hemikalije koji su korišćeni u radu su p. a. čistoće: hloroform, metanol, etil acetat, *n*-heksan i amonijak proizvođača Merck, Nemačka, a *p*-dimetilamino benzaldehid, koncentrovana sumporna kiselina i etanol proizvođača Sigma Aldrich, USA.

Hromatografski sistem. Kao stacionarna faza korišćene su komercijalne, aluminijumske ploče silikagela GF 254 (Merck, Nemačka). Za pripremu preparativnih ploča korišćen je silikagel GF 254 (Merck, Nemačka). Hromatografija u koloni izvedena je na silikagel 60 za *dry flash* hromatografiju (veličina čestica 0,035 mm 0,075 mm (220 – 440 mesch), veličina pore 60 Å) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH).

Priprema ploče za preparativnu hromatografiju: Odmereno je 22 g silikagela, suspendovano u 55 mL vode i mešano kružnim pokretima ruke oko 5 min. kako bi se istisnuto inkorporirani vazduh. Masa je nanesena na staklenu ploču 20 cm x 20 cm koja je prethodno prebrisana acetonom i ostavljena da se osuši na sobnoj temperaturi. Aktivacija silikagela izvršena je grejanjem u sušnici na 105 °C tokom jednog sata.

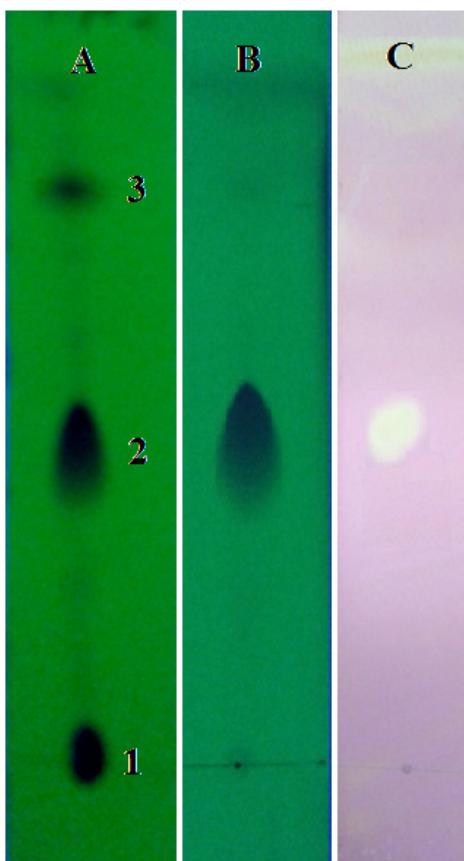
Priprema kolone za dry flash hromatografiju: Odmerena je količina silikagela koja je 25 do 50 puta veća u odnosu na količinu sirovog uzorka za razdvajanje i aktivirana u sušnici na 105 °C tokom jednog sata. Aktiviranim silikagelom je napunjen stakleni levak sa dnom od sinterovanog stakla, a zatim pipetom dodavan *n*-heptan kao rastvarač manje polarnosti i njime natapan adsorbens. Rastvarač je kroz silikagel istisnut pomoću vakuma, a zatim pipetom ravnomerno nanesen na vrh stuba adsorbensa uzorak rastvoren u eluentu.

Rezultati i diskusija

U prvoj fazi sintetisan je estar α -tokoferola sa di-Cbz-lizinom [8]. Za praćenje toka reakcije primenjena je TLC metoda. Za razdvajanje proizvoda sinteze od polaznih supstanci bilo je neophodno pronaći mobilnu fazu optimalnog sastava. Pripremljeno je više mobilnih faza sledećeg sastava:

- hloroform
- hloroform – metanol, 10 : 0,5; 10 : 1; 10 : 1,5 v/v
- *n*-heksan
- *n*-heksan – etil acetat, 3 : 0,5; 3 : 0,8; 3 : 1; 3 : 1,2; 3 : 1,5 v/v

Najbolje razdvajanje polaznih komponenata od finalnog proizvoda (estra) postignuto je upotrebom mobilne faze *n*-heksan – etil acetat, 3 : 1,2 v/v. Budući da su za TLC korištene ploče sa fluorescentnim indikatorom mrlje su detektovane pod UV-lampom. Dodatno, detekcija mrlja je izvršena uranjanjem pločice u rastvor kalijum permanganata, a potom izlaganjem pločice povišenoj temperaturi. Na Slici 2 predstavljeno je razdvajanje komponenata iz reakcione smeše (A), prečišćeni estar (B) i detekcija prečišćenog estra pomoću rastvora kalijum permanganata (C), mobilna faza *n*-heksan – etil acetat, 3 : 1,2 v/v.

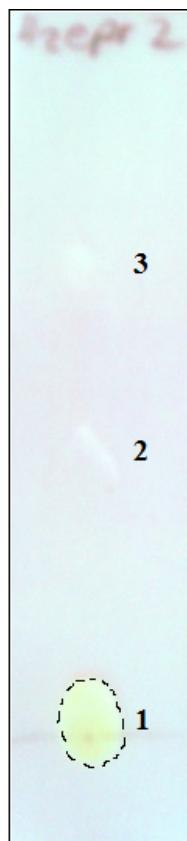


Slika 2. TLC hromatogrami: A – reakciona smeša, 1-di-Cbz-lizin; 2- α -tokoferol-di-Cbz-lizin estar; 3- α -tokoferol (detekcija: UV); B – prečišćeni estar (detekcija: UV); C – prečišćeni estar (detekcija: KMnO₄). Mobilna faza: *n*-heksan–etyl acetat, 3 : 1,2 V/V.

Figure 2. TLC chromatograms: A - the reaction mixture, 1-di-Cbz-lysine; 2- α -tocopherol-di-Cbz-lysine ester; 3- α -tocopherol (detection: UV); B - purified ester (detection: UV); C - purified ester (detection: KMnO₄). Mobile phase: *n*-hexane-ethyl acetate, 3: 1,2 V / V.

Nakon završetka reakcije prečišćavanje estra je izvršeno *dry flash* hromatografijom na silikagelu uz mobilnu fazu *n*-heksan – etil acetat, 3 : 1,2 v/v. Sakupljene su frakcije koje su sadržale estar, nakon čega je uklonjen rastvarač uparavanjem na rotacionom vakuum uparivaču. Frakcije koje su pored estra sadržavale i polazni tokoferol takođe su sakupljene i izvršeno je dodatno prečišćavanje preparativnom TLC. Sa ploče je izolovana zona koja odgovara α -tokoferil-di-Cbz-lizin estru i izvršena je ekstrakcija acetonom.

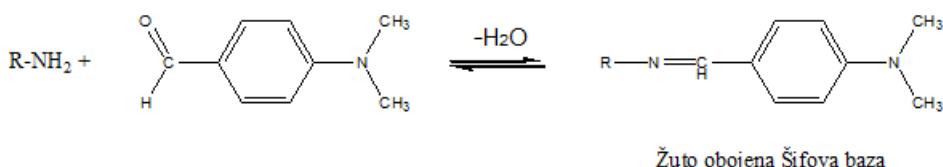
U drugoj fazi katalitičkom hidrogenacijom uklonjene su zaštitne Cbz-grupe sa amino grupa lizina [8]. Tok reakcije praćen je TLC metodom. Pri hromatografskim uslovima navedenim u tekstu (mobilna faza *n*-heksan – etil acetat, 3 : 1,2 v/v) proizvod reakcije zadržavao se na startu (Slika 3).



Slika 3. TLC hromatogram: 1- α -tokoferil-lizin estar; 2- α -tokoferol- di-Cbz-lizin estar; 3- α -tokoferol (detekcija: Ehrlich-ov reagens). Mobilna faza: *n*-heksan – etil acetat, 3 : 1,2 V/V.

Figure 3. TLC chromatogram: 1- α -tocopheryl-lysine ester; 2- α -tocopheryl- di-Cbz-lysine ester; 3- α -tocopherol (detection: Ehrlich's reagent). Mobile phase: *n*-hexane – ethyl acetate, 3 : 1,2 V / V.

Proizvod je detektovan prskanjem hromatografske pločice Ehrlich-ovim reagensom. Ehrlich-ov reagens u svom sastavu sadrži p-dimetilaminobenzaldehid koji sa amino grupom gradi žuto obojenu Šifovu bazu (Šema 1).



Šema 1. Mehanizam nastanka Šifove baze

Scheme 1. The mechanism of Schiff base formation

Budući da reakcijom nastaje proizvod sa polarnim amino grupama bilo je potrebno definisati novi sistem rastvarača čija bi polarnost u poređenju sa prethodnim bila veća i time uticala na pokretljivost baznog estra. Pripremljeno je više mobilnih faza:

- hloroform – metanol – amonijak, 10 : 1 : 0,1; 8 : 1 : 0,1, 8 : 1,5 : 0,1 v/v/v
- hloroform – aceton, 4 : 1 v/v
- dihlormetan – metanol, 9,5 : 0,5; 9 : 1 v/v
- dihlormetan – methanol – amonijak, 9,5 : 0,4 : 0,1; 9 : 0,9 : 0,1 v/v/v

Najbolju pokretljivost ($R_f = 0,2$) sintetisani estar pokazao je sa sistemom rastvarača dihlormetan – metanol – amonijak, 9 : 0,9 : 0,1 v/v/v kao mobilnom fazom. Mrlje su detektovane pod UV-lampom (Slika 4) i prskanjem Ehrlich-ovim reagensom. Prisustvo amonijaka kao baznog modifikatora utiče na pokretljivost baznog estra kao i polarniji dihlormetan.



Slika 4. TLC hromatogram: α -tokoferol-lizin estar (detekcija: UV). Mobilna faza: dihlormetan – metanol – amonijak, 9 : 0,9 : 0,1 V/V/V.

Figure 4. TLC chromatogram: α -tocopheryl-lysine ester (detection: UV). Mobile phase: dichloromethane - methanol - ammonia, 9: 0,9: 0,1 V / V / V.

Zaključak

Za praćenje sinteze estra tokoferola sa aminokiselinom lizinom uspešno je primenjena TLC metoda. Pronađeni su optimalni uslovi za razdvajanje polaznih komponenata od proizvoda reakcije a detekcija proizvoda izvršena je posmatranjem pločice pod UV-lampom, uranjanjem u rastvor kalijum permanganata i prskanjem Ehrlich-ovim reagensom. Za prečišćavanje proizvoda primenjena je metoda *dry flash* hromatografije na silikagelu. Uz pronalaženje optimalnog sastava mobilne faze TLC i hromatografija na koloni predstavljaju brz i jednostavan način za praćenje toka reakcije i prečišćavanje proizvoda.

Literatura

1. Guthrie N, Gapor A, Chambers AF, Carroll KK. Inhibition of proliferation of estrogen receptor-negative MDA-MB-435 and -positive MCF-7 human breast cancer cells by palm oil tocotrienols and tamoxifen, alone and in combination. *J Nutr* 1997;127(3):544-48.
2. McIntyre BS, Briski KP, Tirmenstein MA, Fariss MW, Gapor A, Sylvester PW. Antiproliferative and apoptotic effects of tocopherols and tocotrienols on normal mouse mammary epithelial cells. *Lipids* 2000;35(2):171-80.
3. Combs GF, Jr (ed.). *The Vitamins. Fundamental aspects in nutrition and health*. Academic Press, Inc. USA; 1992, 63 p.
4. Yu W, Simmons-Menchaca M, Gapor A, Sanders BG, Kline K. Induction of apoptosis in human breast cancer cells by tocopherols and tocotrienols. *Nutr Cancer* 1999;33(1):26-32.
5. Shah S, Gapor A, Sylvester PW. Role of caspase-8 activation in mediating vitamin E-induced apoptosis in murine mammary cancer cells. *Nutr Cancer* 2003;45(2):236-46.
6. Nikolic KM, Design and QSAR study of analogs of α -tocopherol with enhanced antiproliferative activity against human breast cancer cells. *J Mol Graph Model* 2007; 26:868-73.
7. Arya P, Alibhai N, Qin H, Burton BW. Design and synthesis of analogs of vitamin E: Antiproliferative activity against human breast adenocarcinoma cells. *Bioorg Med Chem Lett* 1998;8: 2433-38.
8. Gagic Ž, Ivkovic B, Vucicevic J, Agbaba D, Nikolic K. The synthesis of amino acid analog of vitamin E. Proceedings of the 12th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry; 2014 Sep 22-26; Society of Physical Chemists of Serbia, Belgrade, Serbia. 2014;1:1149-52.

Application of thin layer and column chromatography in monitoring the synthesis of α -tocopheryl-lysine ester

Žarko Gagić^{1*}, Branka Ivković², Katarina Nikolić², Danica Agbaba²

¹ University of Banja Luka - Faculty of Medicine, Pharmacy Department,
Save Mrkalja 14, Banja Luka, Republika Srpska

² University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical
Chemistry, Vojvode Stepe 450, Belgrade, Serbia

* Corresponding author, Tel: +387 51 340 106; e-mail: zarko.gagic@unibl.rs

Summary

Vitamin E comprises of two families of compounds, tocopherols and tocotrienols. It is well known for its antioxidant activity, but recently special attention is paid to the use of vitamin E and its derivatives in the prevention and the treatment of cancer. Various derivatives of vitamin E are synthesized, which exhibit antiproliferative activity. It has been shown that the α -tocopherol ester with the amino acid lysine exhibits improved antiproliferative activity on MCF-7 breast cancer cell line as compared to commercially available preparations. The first stage was the synthesis of α -tocopherol ester with di-Cbz-lysine. Synthesis of ester was monitored by thin layer chromatography (mobile phase: *n*-hexane-ethyl acetate 3: 1,2 v/v) and the purification of product was done by *dry flash* column chromatography and by preparative plate chromatography (mobile phase: *n*-hexane-ethyl acetate 3: 1,2 v/v). In the second stage, Cbz protecting groups were removed by catalytic hydrogenation. The final product α -tocopheryl-lysine ester was detected by TLC (mobile phase: dichloromethane-methanol-ammonia 9 : 0,9 : 0,1 v/v).

Key words: α -tocopherol; antiproliferative activity; MCF-7;
thin layer chromatography; *dry flash* chromatography

Development and validation of RP-HPLC method for analysis of multicomponent cough-cold syrup formulation

Branka Ivković*, Bojan Marković, Sote Vladimirov

University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, Vojvode Stepe 450, Belgrade, Serbia

*Corresponding author, e-mail: blucic@pharmacy.bg.ac.rs; phone + 381 11 39 51 335

Summary

In this study a reversed phase HPLC method for rapid and simultaneous identification and quantification of doxylamine succinate, ephedrine sulfate, dextromethorphan hydrobromide, paracetamole and sodium benzoate in cough-cold syrup formulation was described. Separation was carried out on XTerraTM RP 18, Waters (150 mm x 4.6 mm column, 5 µm particle size). For the analysis of investigated substances gradient elution was used employing water, pH adjusted at 2.5 with 85 % orthophosphoric acid as the mobile phase A and acetonitrile as the mobile phase B. Detection was carried out by UV absorbance at 210 nm for doxylamine succinate, ephedrine sulfate, dextromethorphan hydrobromide and sodium benzoate and at 270 nm for paracetamole. The method was validated statistically for selectivity, linearity, precision, accuracy.

Keyword: RP-HPLC, validation of the method, cough–cold syrup formulation

1. Introduction

A cold is usually a mild, self-limiting respiratory infection with a range of viruses, the rhinoviruses and coronaviruses being most frequently involved. Cough is an important physiological protective mechanism, but may also occur as a symptom of an underlying disorder.

Cough and cold preparations, containing various combinations of cough suppressants (e.g. dextromethorphan, codeine phosphate) and expectorants, together with sympathomimetics (e.g. ephedrine or pseudoephedrine hydrochloride), antihistamines (e.g. chlorpheniramine maleate, diphenhydramine hydrochloride or doxylamine succinate) or analgesics (e.g. acetaminophene) are available. Common formulations of these products are liquids or suspensions and therefore require the addition of preservatives (e.g. benzoic acid, sodium benzoate, methylparabene, propylparabene). The action, properties and structures of these ingredients have been detailed in various references [1]. Several methods have been reported for the determination of ingredients in cough-cold preparations. High-performance liquid chromatography (HPLC) is the commonest approach for assaying of the drugs, because the method is accurate, simple and does not require prior conversion of the drugs to the base form as needed in the gas-liquid chromatographic methods (GLC) [2]. For HPLC assays numerous modes of detection have been employed including ultraviolet [3] conductometric [4], fluorescence [5] or mass spectrometric detection [6]. Most of the reported analytical procedures, like spectrophotometric and derivative spectrophotometric methods [7], gas chromatography (GC) [8], micellar liquid chromatography [9] ion pairing high power liquid chromatography [10], capillary electrophoresis [11], thin layer chromatography (TLC) [12], were validated for the determination of ingredients in cough-cold preparations.

Doxylamine succinate (DS) (2-dimethylaminoethoxy-phenylmethyl-2-picoline succinate salt) is a sedating antihistamine with antimuscarinic and pronounced sedative effects. DS is frequently used in multicomponent preparations for the treatment of cough and cold. [13].

Ephedrine and its salts, e.g. ephedrine sulfate (ES) ((1*R*, 2*S*)-2-methylamino-1-phenylpropan-1-ol sulfate salts), are used orally, intravenously, intramuscularly and topically for a variety of conditions such as allergic disorders, colds, hypotensive conditions. [14].

Dextromethorphan hydrobromide (DHB) (*d*-*cis*-1,2,3-9,10,10a-hexahydro-6-methoxy-11-methyl-4*H*-10, 4*a*-iminoethanophenanthrene hydrobromide salts) is a cough suppressant used for the relief of non-productive cough; it has a central action on the cough center in the medulla [15].

Paracetamole (P) (*para*-aminophenol derivative) has analgesic and antipyretic properties and weak anti-inflammatory activity. It is also useful in diseases accompanied with pain, discomfort and fever, such as the common cold and other viral infections [16].

Sodium benzoate (SB) has antibacterial and antifungal properties. It is used as preservative in pharmaceutical formulations including oral preparations. Benzoic acid and sodium benzoate are typically employed in concentration of up to 0.2% and 0.5%, respectively. Sodium benzoate is a common ingredient of cough preparations [1]. All structures on investigated compounds are presented in Figure 1.

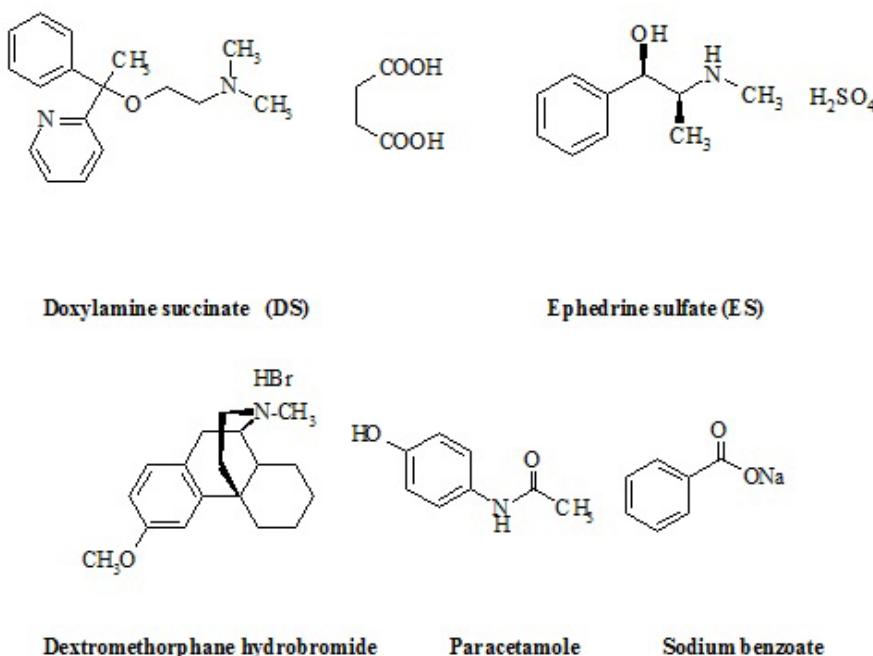


Figure 1. Chemical structures of compounds in cough-cold syrup formulation
Slika 1. Hemiska struktura jedinjenja koja ulaze u sastav sirupa

The aim of this study was to develop reversed phase high performance liquid chromatographic (RP-HPLC) method for the determination of five compounds in syrup formulation (active compounds: doxylamine succinate, ephedrine sulfate, dextromethorphan hydrobromide, paracetamole and preservative sodium benzoate).

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

All chemicals and reagents (acetonitrile, *ortho*-phosphoric acid and water) were HPLC grade. Working standard of doxylamine succinate, ephedrine sulfate, dextromethorphan hydrobromide, paracetamole and sodium benzoate were BP quality and used without further purification.

2.2 Apparatus

The chromatographic system Hewlett Packard 1100 (*Agilent*, Technologies) consisted of HP 1100 pump, HP 1100 UV–VIS detector. UV detection was performed at 210 nm and 270 nm. The samples were introduced through a Rheodyne injector valve with a 20 µL sample loop. All data analysis and chromatogram processing was performed by HP ChemStation software. The pH measurements were carried out with a Radiometer pH meter (Copenhagen, Denmark).

2.3 Standard solutions

Stock solutions were prepared by dissolving the respective working standard substances in mixture of acetonitrile:water (20:80 V/V pH 2.5) to obtain the concentration of 69 µg mL⁻¹ for DS, 74 µg mL⁻¹ for ES, 125 µg mL⁻¹ for DHB, 1259 µg mL⁻¹ for P and 255 µg mL⁻¹ for SB.

Concentration ranges of standard solutions for calibration curves were from 6.9 µg mL⁻¹ to 69.0 µg mL⁻¹ from DS, from 7.4 µg mL⁻¹ to 74.0 µg mL⁻¹ for ES, from 12.5 µg mL⁻¹ to 125.0 µg mL⁻¹ for DHB, from 126.0 µg mL⁻¹ to 1260.0 µg mL⁻¹ for P and from 25.5 µg mL⁻¹ to 255.0 µg mL⁻¹ for SB.

A mixed working standard solution was prepared in concentrations of 27.4 µg mL⁻¹ for DS, 29.6 µg mL⁻¹ for ES, 49.8 µg mL⁻¹ for DHB, 252.0 µg mL⁻¹ for P and 102.0 µg mL⁻¹ for SB.

2.4. Sample preparation

Sample solution was prepared by adding 5 mL of syrup formulation to a 50 mL volumetric flask along with around 30 mL of mixture of acetonitrile : water (20:80 v/v pH 2.5). This degas for 10 min. The volumetric flask was filled to the mark with mixture of acetonitrile:water (20:80 v/v pH 2.5) and the resulting solution was filtered through 0.45 µm nylon membrane filter. Sample solution for determination P was preparing by adding 5 mL of syrup formulation to 25 mL volumetric flask.

2.5. Chromatographic conditions

In the presented investigation the best separation of these five compounds was achieved using XTerraTM column 150 mm x 4.6 mm, 5 µm particle size. This column differs from the other C₁₈ columns by methyl groups attached to free silanol groups. In that way duration of the separation is shortened and peak symmetry improved. For the separation and determination of DS, ES, DHB, P and SB in cough-cold syrup formulation the best results were obtained using gradient elution system. Mobile phase A was water, pH adjusted at 2.5 with 85 % *ortho* phosphoric acid. Mobile phase B was acetonitrile. Method development led to the mobile phase and flow rate timetable shown in the Table I. Time for analysis was less than 8 min.

Table I Mobile phase time table

Tabela I Program gradijentnog eluiranja

Time (min)	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)	Flow rate (mL/min)
0	90	10	1
2.5	90	10	1
3.5	80	20	1.5
6.5	80	20	1.5
8.5	90	10	1

3. Results and discussion

The choice of the method depends on factors such as the nature of the drug, the complexity of the sample and the intended use. In this study the conditions were influenced by the physical-chemical properties of investigated substances such as solubility, polarity, UV absorption and interference.

Influence of the mobile phase composition on the separation of DS, ES, DHB, P and SB was investigated following retention times and peak symmetry. It was important to obtain the most appropriate conditions when: a) DS and ES were satisfactory separated, b) DS and ES separated from the peak of the excipients and c) DHB was not retained for a very long time that affected peak shape. Changes in mobile phase strength by increasing or decreasing content of acetonitrile in mobile phase had a great influence on chromatographic behavior of these substances. The retention times of all compounds decreased with increase of acetonitrile content, where there was a parallel decrease in

the polarity of the mobile phase. Moreover, the rate of decrease was higher for drugs with higher molecular mass, such as DS and DHB, which are also more bulky and less polar nature, compared with those having lower molecular mass and being more polar, such as ES, P and SB. The results indicate that hydrophobic interaction of the drugs with the column was one of the essential operating mechanisms for the above column separation.

Identification was based on retention times by comparison with commercial standards. Optimal retention times for all compounds are shown in the Table II.

Table II The retention times of the compounds in the cough-cold syrup

Tabela II Retenciona vremena ispitivanih analita u sirupu

Compound	Retention time (min)
Doxylamine succinate	2.22
Ephedrine sulfate	2.39
Dexamethasone hydrobromide	6.61
Paracetamole	2.98
Sodium benzoate	5.42

There was baseline resolution of all the drugs with the exception of DS-ES, were the values for resolution factor was about 1. In generally all drugs could be determined simultaneously in a single chromatographic run. The concentrations were adjusted so that peak areas were not too high and peaks were not obscuring a neighboring one.

After establishing the optimal conditions proposed RP-HPLC method was validated. Selectivity towards the other excipients in the syrup formulation, linearity, accuracy and precision were investigated.

Selectivity of an analytical method is defined as its ability to measure accurately an analyte in the presence of interferences, such as synthetic precursors, excipients and known degradation products that may be expected to be present in the sample matrix. Analyzing the chromatograms obtained for the laboratory mixture and excipient good selectivity of the developed RP-HPLC method was shown.

Resolution between the DS and ES as well as DS and compound from excipient ($t_R=2.037$ min) is satisfactory ($R_s=1.5$).

Linear relationships of peak area over the mentioned concentration ranges for DS, ES, DHB, P and SB were obtained. The important parameters of calibration curves:

slope (a), intercept (b), correlation coefficient (r), standard deviation of the slope (S_a) and standard deviation of the intercept (S_b) are presented in Table III.

Table III Basic attributes of calibration curve for DS, ES, DHB, P and SB

Tabela III Podaci za linearu regresionu analizu za DS, ES, DHB, P i SB

	Doxylamine succinate	Ephedrine sulfate	Dexamethasone hydrobromide	Paracetamole	Sodium benzoate
Data points (N)	5	5	5	5	5
Calibration equation ($y = ax + b$)	$y = 37.69x + 36.14$	$y = 95.92x + 39.77$	$y = 150.58x + 23.486$	$y = 474.88x + 13.24$	$y = 67.54x + 16.64$
Correlation coefficient (r)	0.9990	0.9998	0.9993	0.9994	0.9999
Standard error of intercept (S_b)	1.0	0.41	0.52	0.25	0.07
Standard error of slope (S_a)	46.9	20.25	43.54	179.01	12.07
Significance of intercept (t_a)	0.8	4.74	3.46	2.65	5.59

The precision and accuracy of the proposed method was investigated and results are presented in Table IV.

Table IV Precision and accuracy results**Tabela IV** Rezultati za tačnost i preciznost metode

Compound	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Found ($\mu\text{g/mL}$)	CV (%)	R (%)
Doxylamine succinate	13.7	13.6 \pm 0.0001 ^a	0.7	99.27
	27.4	27.3 \pm 0.0001 ^a	0.4	99.63
	54.8	55 \pm 0.0004 ^a	0.72	100.36
Ephedrine sulfate	14.8	14.8 \pm 0.0001 ^a	0.67	100
	29.6	29.5 \pm 0.0001 ^a	0.34	99.66
	59.1	59.2 \pm 0.0003	0.51	100.17
Dextromethorphan hydrobromide	24.9	24.6 \pm 0.0002 ^a	0.81	100
	49.8	50 \pm 0.0002 ^a	0.26	100.40
	99.6	97.4 \pm 0.0009 ^a	0.92	97.79
Paracetamole	252	251 \pm 0.0002 ^a	0.1	99.60
	504	507 \pm 0.0002 ^a	0.32	100.60
	756	756 \pm 0.0002 ^a	0.1	100
Sodium benzoate	51	51 \pm 0.0005 ^a	0.1	100
	102	102 \pm 0.0001 ^a	0.1	100
	204	204 \pm 0.0002 ^a	0.09	100

^aSD - Standard Deviation (n=10)

The results for standard deviation (SD), coefficient of variation (CV) and *Recovery* (R) show that the described RP–HPLC method is precise and can be used for the routine analysis of dosage forms that contain DS, ES, P, SB and DHB.

The contents of the five drugs in the cough-cold syrup were determined by the proposed method and the important statistical values, such as coefficient of variation (CV) and *Recovery* (R), are given in Table V. The chromatograms of standard mixture and cough-cold syrup are shown in Figure 2 and Figure 3, respectively.

Table V The results of the content determination in sirup (n=10)**Tabela V** Rezultati određivanja sadržaja komponenata u sirupu

Compound	Label value (g/100mL)	Average values (g/100mL)	Found (%)
Doxylamine succinate	0.025	0.0236	94.50
Ephedrine sulfate	0.0267	0.0264	98.79
Dextromethorphan hydrobromide	0.050	0.051	102.48
Paracetamole	2.0	2.004	100.19
Sodium benzoate	0.100	0.103	103.37

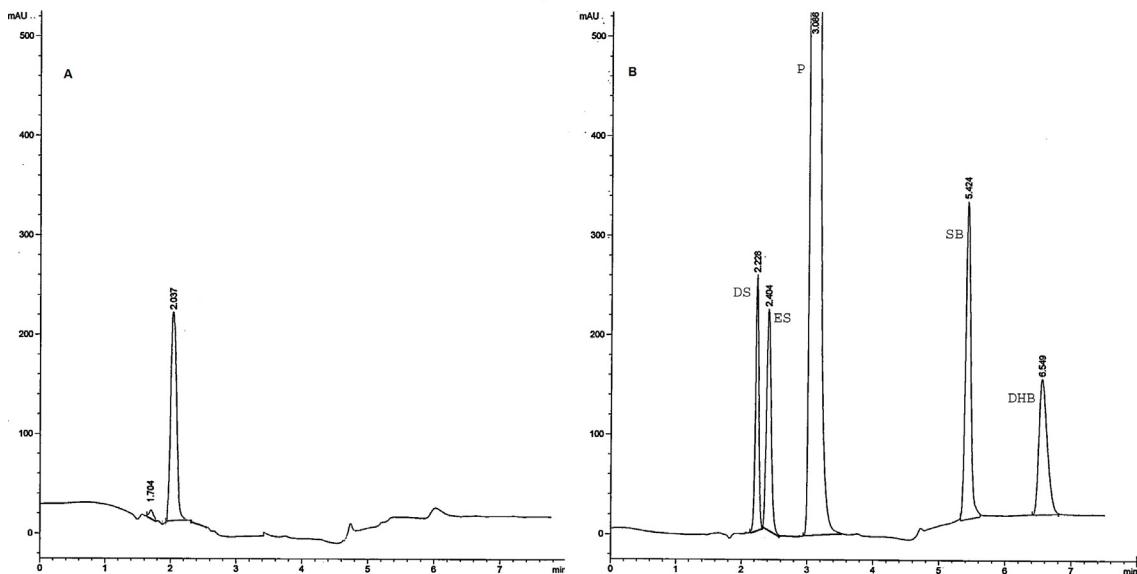


Figure 2. HPLC chromatograms: A) placebo mixture and B) all compounds in standard solution: DS-doxylamine succinate, ES-ephedrine sulfate, P-paracetamole, SB-sodium benzoate, DHB-dextromethorphan hydrobromide; detection was carried out at a $\lambda = 210$ nm

Slika 2. HPLC hromarogrami: A) placebo smeše i B)smeše rastvora standarnih supstanci: DS-doksilamin-sukcinat, ES-efedrin-sulfat, P-paracetamol, SB-natrijum benzoat, DHB-dekstrometorfan hidrobromid; UV detekcija na 210 nm

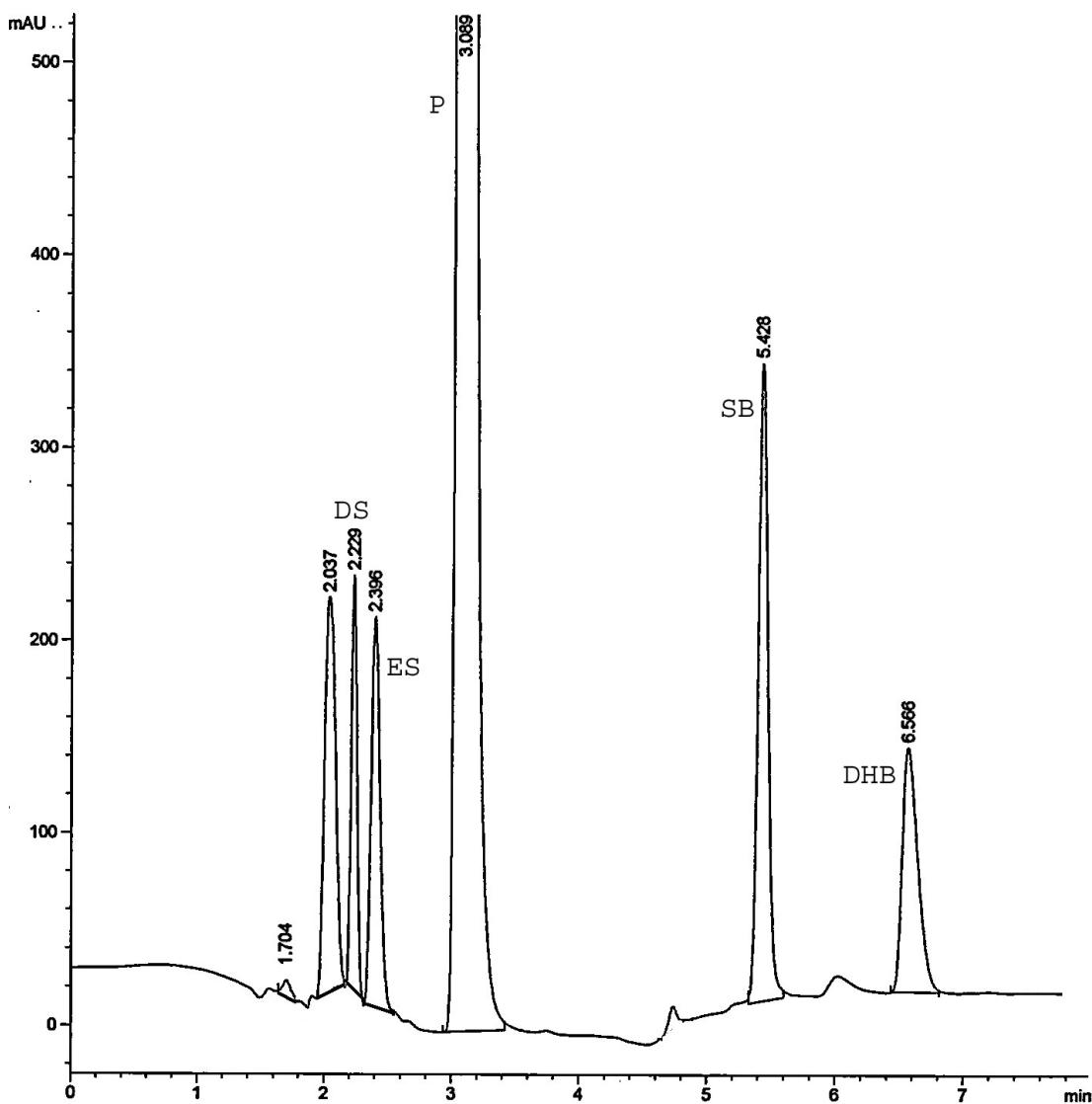


Figure 3. HPLC chromatogram of all compounds in cough-cold syrup formulation: DS-doxylamine succinate, ES-ephedrine sulfate, P-paracetamole, SB-sodium benzoate, DHB-dextromethorphan hydrobromide; detection was carried out at a $\lambda = 210$ nm

Slika 3. HPLC hromatogram analiziranog rastvora sirupa za kašalj: DS-doksilamin-sukcinat, ES-efedrin-sulfat, P-paracetamol, SB-natrijum benzoat, DHB-dekstrometorfan hidrobromid; UV detekcija na 210 nm

Determination of P (Figure 4) was performed at 270 nm because the response at 210 nm was too high, so the precision of determination was not satisfactory.

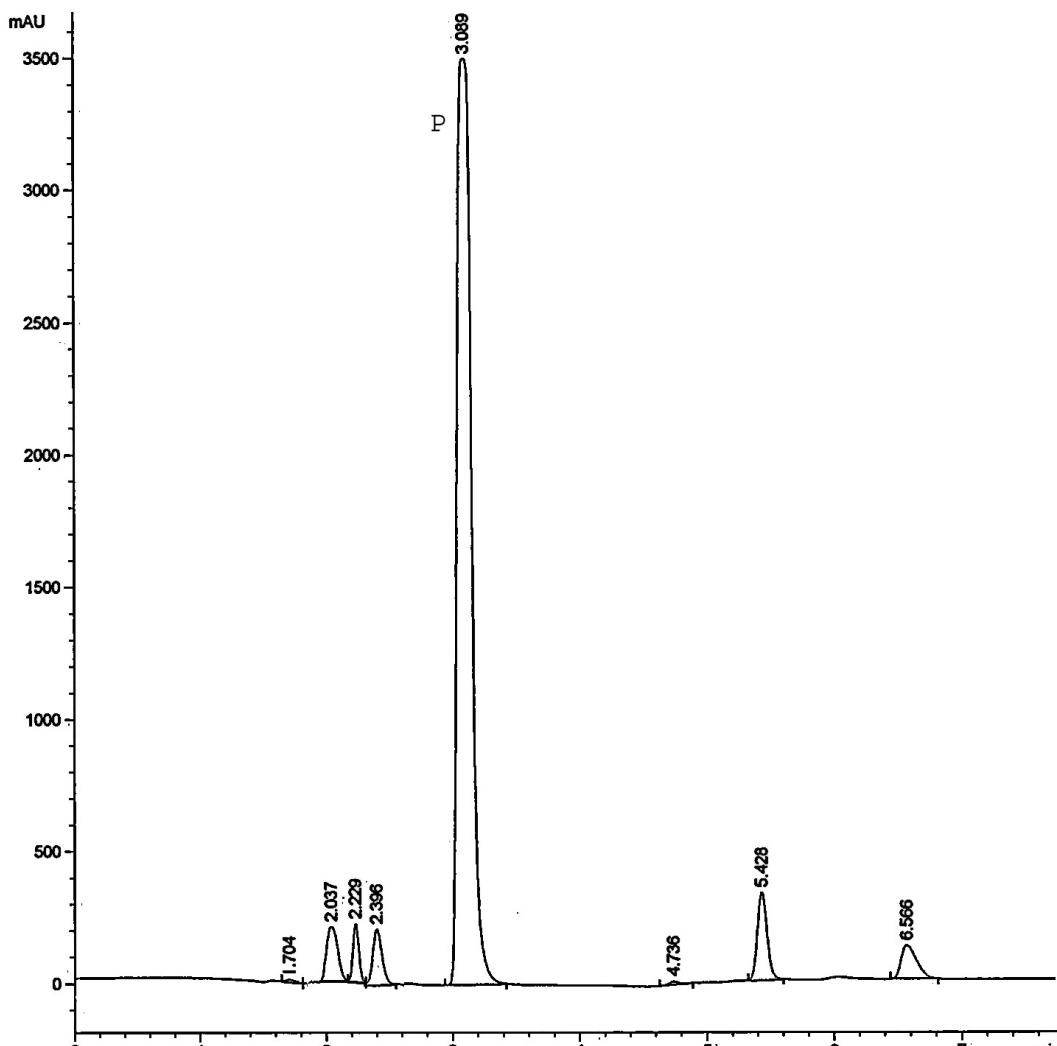


Figure 4. Chromatogram of all compounds in cough-cold syrup formulation; detection was carried out at a $\lambda = 270$ nm

Slika 4. Hromatogram analiziranog rastvora sirupa detektovan na 270 nm

4. Conclusions

The proposed gradient reverse-phase HPLC method enables simultaneous determination of DS, ES, DHB, P and SB because a good separation and resolution of the chromatographic peaks was achieved. Method is applicable for a qualitative and quantitative analysis of the cough-cold syrup formulation. The obtained results are in a good agreement with the declared contents. The developed RP–HPLC method is useful for simple, rapid, accurate and precise routine assay of syrup formulation.

Acknowledgement

This work was partially supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (Grants no.172041).

References

1. Group of authors (2009) Sodium benzoate, In: Sweetman SC (ed.), Martindale The complete drug reference, 36th ed., London, p. 1630
2. Harsono T, Yuwono M, Indrayanto G. Simultaneous determination of some active ingredients in cough and cold preparations by gas chromatography, and method validation. J.AOAC 2005; 88(4):1093-8.
3. Hood DJ, Cheung HY. A chromatographic method for rapid and simultaneous analysis of codeine phosphate, ephedrine HCl and chlorpheniramine maleate in cough-cold syrup formulation. J Pharm Biomed Anal 2003;30(5):1595-601.
4. Lau OW, Mok CS. High-performance liquid chromatographic determination of active ingredients in coug-cold syrups with indirect conductometric detection. J Chromatog A 1995, 693(1):45-54.
5. Bartoletti RA, Belpaire FM, Rosseel MT. High-performance liquid chromatography determination of dextromethorphan and its metabolites in urine using solid-phase extraction. J Pharm Biomed Anal 1996, 14(8-10):1281-86.
6. Eichhold TH, Quijano M, Seibel WL, Cruze CA, Dobson RLM, Wehmeyer KR. Highly sensitive high-performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the analysis of dextromethorphan in human plasma. J Chromatog B Biomed Sci Appl 1997, 698(1-2):147-54.

7. Dogan HN, Duran A. Simultaneous spectrophotometric determination of aspirin, acetaminophen and ascorbic acid in pharmaceutical preparations. *Pharmazie* 1998, 53:781-4.
8. Raj SV, Kapadia SU, Argekar AP. Simultaneous determination of pseudoephedrine hydrochloride and diphenhydramine hydrochloride in cough syrup by gas chromatography (GC). *Talanta* 1998, 46(1):221-25.
9. Gil-Agustí M, Monferrer-Pons L, García-Alvarez-Coque MC, Esteve-Romero J. Determination of active ingredients in cough-cold preparations by micellar liquid chromatography. *Talanta* 2001, 54(4):621-30.
10. Paciolla MD, Jansen SA, Martellucci SA, Osei AA. A fast and efficient determination of amines and preservatives in cough and cold liquid and suspension formulations using a single isocratic ion-pairing high power liquid chromatography method. *J Pharm Biomed Anal* 2001, 26(1):143-49.
11. Zhang L, Hu Q, Chen G, Fang Y. Simultaneous determination of the active ingredients in composite pseudoephedrine hydrochloride tablets by capillary electrophoresis. *Anal Chem Acta* 2000, 424(2): 257-62.
12. Yaqing Z, Shourong H, Qingshe L. TLC-UV spectrophotometry of fast-acting syrup for cold. *Zhongguo Yiyao Gongy Zazhi* 1991, 22(11):506-7.
13. Vida J, Yevich J. Sedative-Hypnotics, In: Abraham DJ (ed), *Burgers Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, Volume 6: Nervous System agents, 6th ed., New Jersey, 2003, p. 212-4.
14. Buss AD, Cox B, Waigh RD. Natural Products as Leads for New Pharmaceuticals, In: Abraham DJ (ed), *Burgers Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, Volume 1: Drug Discovery, 6th ed., New Jersey, 2003, p. 884-6.
15. Buckett BJ, Terra SG, Walker J. Single nucleotide polymorphisms and pharmacogenomics-individually designed drug therapy, In: Abraham DJ (ed), *Burgers Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, Volume 4: Antocoids, Diagnostics and Drug from New Biology, 6th ed., New Jersey, 2003, p. 627.
16. Group of authors Paracetamole, In: Sweetman SC (ed.), *Martindale The complete drug reference*, 36th ed., London, (2009) p. 108.

Razvoj i validacija RP–HPLC metode za analizu višekomponentnog sirupa za kašalj

Branka Ivković^{*}, Bojan Marković, Sote Vladimirov

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za Farmaceutsku hemiju,
Vojvode Stepe 450, Beograd, Srbija

*Autor za prepisku, e-mail: blucic@pharmacy.bg.ac.rs; telefon + 381 11 39 51 335

Kratak sadržaj

U ovom radu opisana je brza, efikasna, ekonomična reverzno fazna HPLC metoda za identifikaciju i određivanje doksilamin-sukcinata, efedrin-hidrohlorida, dekstrometorfant hidrobromida, paracetamola kao aktivnih komponenti i natrijum-benzoata kao konzervansa u sirupu za kašalj. Razdvajanje komponenata, njihova identifikacija i određivanje postignuto je na C18 stacionarnoj fazi (XTerraTM RP 18, Waters (150 mm x 4,6 mm, 5 µm veličine čestica) uz gradijentno eluiranje sa mobilnom fazom koju čine voda (čiji je pH podešen na 2,5 sa ortofosfornom kiselinom) i acetonitril kao organski rastvarač. Za detekciju ispitivanih jedinjenja korišćen je UV/VIS detektor podešen na 210 nm (doksilamin sukcinata, efedrin-hidrohlorida, dekstrometorfant hidrobromida i natrijum-benzoata) tj. 270 nm (paracetamol). Kako je definisana metoda namenjena za identifikaciju i određivanje aktivnih supstanci i konzervansa u sirupu za kašalj, od parametara validacije ispitani su: selektivnost/specifičnost, linearost, tačnost i preciznost. Svaki od parametara je statistički potvrđen. Dobijene vrednosti statističkih parametara ($r \geq 0,999$, $CV \leq 2\%$ i *Recovery* od 98 % – 102 %) ukazuju da je definisana RP–HPLC metoda pogodna za identifikaciju i određivanje doksilamin-sukcinata, efedrin-hidrohlorida, dekstrometorfant hidrobromida, paracetamola i natrijum-benzoata u sirupu za kašalj.

Ključne reči: RP–HPLC, sirup za kašalj, validacija metode

Značaj međulaboratorijskih uporednih ispitivanja za unapređenje performansi rada laboratorija za kontrolu kvaliteta lekova

Gordana Pejović^{1,2*}

¹Agencija za lekove i medicinska sredstva Srbije, Vojvode Stepe 458, Beograd, Srbija

² Univerzitet u Beogradu - Fakultet organizacionih nauka, Katedra za upravljanje kvalitetom, Jove Ilića 154, Beograd, Srbija

*autor za prepisku, e-mail: gordana.pejovic@alims.gov.rs

Kratak sadržaj

Međulaboratorijska uporedna ispitivanja (PT šeme) su poslednjih nekoliko decenija postala posebno značajna za unapređenje performanse laboratorija za ispitivanje i etaloniranje, tako da su i jedan od preduslova za uspešnu akreditaciju laboratorija. U radu se posebno obrazlaže značaj PT šema za laboratorije za kontrolu kvaliteta lekova, koje na evropskom nivou učestvuju samo u onim PT šemama koje organizuje Evropski direktorat za kvalitet lekova i zaštitu zdravljia. Takođe, prikazani su i bitni preduslovi za akreditaciju prvog nacionalnog PT provajdera u oblasti kontrole kvaliteta lekova, kao i aspekti osiguranja kvaliteta jedne PT šeme u ovoj oblasti. Nacionalna kontrolna laboratorija poseduje neophodne resurse, kao i potrebnu kompetentnost za organizaciju i sprovođenje PT šema, te se može akreditovati kao PT provajder. Istaknuto je da bi učešće laboratorija za kontrolu kvaliteta koje pripadaju farmaceutskoj industriji u ovim ispitivanjima predstavljalo poseban napredak u jačanju poverenja između farmaceutske industrije i nacionalnog regulatornog tela, jer bi se rezultati PT šema koristili isključivo u edukativne svrhe sa ciljem unapređenja i harmonizacije metoda ispitivanja lekova koji se nalaze na nacionalnom tržištu.

Ključne reči: međulaboratorijska uporedna ispitivanja, regulatorno telo, performansa laboratorije, akreditacija

1 Opšte o međulaboratorijskim uporednim ispitivanjima

Više decenija laboratorije u svetu koriste šeme međulaboratorijskih uporednih ispitivanja (eng. *Proficiency testing schemes* – PT šeme) kao eksternu kontrolu kvaliteta svog rada. Tokom poslednjih godina PT šeme su dobine na značaju, imajući u vidu da je u nekim zemljama učešće u PT šemama obavezno u postupku akreditacije, dok u drugim zemljama akreditaciona tela preporučuju učešće u PT šemama kao alat za unapređenje kvaliteta rada laboratorija.

Od uvođenja standarda ISO 17025 1999. godine PT šeme kao instrument za kontrolu kvaliteta su naročito u upotrebi. U tački 5.9. standarda SRPS ISO 17025:2006 zahteva se da „...laboratorija mora da poseduje procedure za upravljanje kvalitetom radi praćenja valjanosti obavljenih ispitivanja i etaloniranja. Rezultujući podaci moraju se zapisati tako da se mogu lako naći i, ako je pogodno, moraju se koristiti statističke tehnike za preispitivanje rezultata. To praćenje mora se planirati i preispitivati, a može da obuhvati, pored ostalog, sledeće:

- a) pravilnu upotrebu overenih referentnih materijala i/ili internu kontrolu kvaliteta korišćenjem sekundarnih referentnih materijala;
- b) učešće u programima međulaboratorijskih poređenja ili programima ispitivanja sposobnosti;...“ [1].

Ovaj zahtev standarda se u praksi najčešće sprovodi tako što organizator PT šeme šalje set uzoraka za ispitivanje laboratorijama učesnicama. Ispitivanje i analiziranje nepoznatog uzorka se sprovodi istim metodama i tehnikama koje laboratorije rutinski koriste u svom svakodnevnom radu, što je definisano protokolom PT šeme koji se takođe dostavlja uz uzorak. Rezultati ispitivanja i analiziranja se vraćaju organizatoru PT šeme na dalju procenu usaglašenosti sa predviđenim rezultatima za konkretnе uzorke. Organizator je u obavezi da pripremi izveštaj koji obuhvata rezultate koje su laboratorije učesnice ostvarile, metodu koja se koristi za ispitivanje i analiziranje, ciljne vrednosti očekivane za svaku mernu veličinu u svakom ispitivanom uzorku, distribuciju rezultata svih učesnika u PT šemi, kao i ocenu pouzdanosti rezultata svake laboratorije učesnice. U slučaju da su rezultati ispitivanja van opsega očekivanih i ciljnih vrednosti, laboratorijama se dalje sugeriše da preispitaju način svog rada i utvrde uzrok odstupanja.

Primarni cilj međulaboratorijskih uporednih ispitivanja je da laboratorijama pruži podršku u postupku unapredjenja kvaliteta njihovih rezultata. Većina PT šema je usmerena ka poboljšanju kvaliteta laboratorijskih podataka i ima edukativni karakter. Neke šeme dodatno pružaju praktičnu pomoć i savet u slučajevima kada su laboratorije pokazale lošu performansu prilikom učešća u nekoj PT šemi. Potrebno je istaći da učešće u PT šemama treba koristiti kao dopunu internih procedura za kontrolu kvaliteta

rada laboratorije, jer pruža dodatnu eksternu proveru kapaciteta rada i pouzdane indikatore za dalje unapređenje performansi rada laboratorije.

Osim navedenog, PT šeme se mogu organizovati i radi ispunjenja sledećih ciljeva:

- poređenje sopstvenih rezultata sa rezultatima drugih laboratorijskih analizom identičnih uzoraka;
- procena tačnosti u slučajevima kada je na raspolaganju nesertifikovani referentni materijal;
- unapređenje kvaliteta rada laboratorije preko korektivnih mera koje se iniciraju na osnovu rezultata dobijenih u PT šemama i
- omogućavanje olakšane obuke osoblja korišćenjem uzoraka materijala sa poznatim vrednostima [2].

U slučaju zvaničnih laboratorijskih za kontrolu kvaliteta lekova u Evropi međulaboratorijska uporedna ispitivanja organizuje i u potpunosti sprovodi Evropski direktorat za kvalitet lekova i zaštitu zdravlja (eng. *European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare - EDQM & HealthCare*) u skladu sa zahtevima standarda ISO/IEC 17043 [3]. Osnovni cilj PT šema koje organizuje EDQM jeste da se osigura da su rezultati dobijeni u okviru mreže zvaničnih laboratorijskih za kontrolu lekova (eng. *General European Official Medicines Control Laboratories – OMCL Network*) međusobno uporedivi i da laboratorijske članice ove mreže ostvaruju isti kvalitet performanse. Stoga se PT šeme u OMCL mreži organizuju redovno, na godišnjem nivou, a obuhvataju širok spektar fizičko-hemijskih i bioloških metoda analize (4).

Osim navedenih PT šema koje se odnose na laboratorijske članice OMCL mreže, u ovom trenutku nema drugih PT šema, kako na nacionalnom tako ni na regionalnom nivou, koje bi se odnosile na ispitivanje kvaliteta lekova. Potrebno je istaći da bi u ovoj vrsti PT šema osim zvaničnih laboratorijskih za kontrolu kvaliteta lekova, moglo da učestvuju i laboratorijske za kontrolu kvaliteta u okviru farmaceutske industrije, imajući u vidu da ova vrsta laboratorijskih nema mogućnost učešća u PT šemama koje organizuje EDQM. Ovo je posebno značajno stoga što u literaturi nema dovoljno podataka o kvalitetu performanse laboratorijskih za kontrolu kvaliteta u okviru farmaceutske industrije. Nacionalna regulatorna tela za lekove kontrolisu segmente proizvodnog procesa lekova kroz različite regulatorne procedure (registracija, obnova ili varijacije), ali dokumentacija koja je u ovim procedurama dostupna ne daje kompletну sliku o performansi rada ovih laboratorijskih. Dodatni aspekt je i činjenica da laboratorijske za kontrolu kvaliteta u okviru farmaceutske industrije nemaju obavezu akreditacije, a samim tim ni obavezu učešća u PT šemama.

Cilj ovog rada je da prikaže značaj međulaboratorijskih uporednih ispitivanja za laboratorijske koje obavljaju kontrolu kvaliteta lekova, kako onih laboratorijskih koje

pripadaju zvaničnim regulatornim telima, tako i laboratorijskim za kontrolu kvaliteta u okviru farmaceutske industrije.

2. Razvoj infrastrukture za akreditaciju prvog nacionalnog provajdera PT

2.1 Šeme za kontrolu kvaliteta lekova

U poslednjih nekoliko godina u Srbiji je razvijeno i uspešno sprovedeno nekoliko PT šema koje se odnose na medicinske, odnosno kliničke laboratorije. Iako ove šeme imaju veliki nacionalni i regionalni značaj, one nisu akreditovane u skladu sa zahtevima standarda ISO 17043, imajući u vidu da nacionalno akreditaciono telo (Akreditaciono telo Srbije – ATS) još uvek nije razvilo neophodne procedure za akreditaciju prema ovom standardu. Potrebno je napomenuti da je ATS u februaru 2012. godine pokrenuo inicijativu za uspostavljanje nacionalnog okvira za razvoj PT šema u različitim oblastima laboratorijskih usluga (kako u slučaju laboratorijskih za ispitivanje, tako i laboratorijskih za etaloniranje). U okviru ovog projekta brojne vodeće nacionalne ustanove su izrazile spremnost da postanu organizatori PT šema (tzv. PT provajderi) u oblastima u kojima poseduju odgovarajuću stručnost i potrebne materijalne i kadrovske resurse. Imajući u vidu da do sada nije organizovana nijedna PT šema koja se odnosi na laboratorijske za kontrolu kvaliteta lekova, Nacionalna kontrolna laboratorijska agencija za lekove i medicinska sredstva Srbije je zainteresovana da se kao PT provajder akredituje za ovaj tip međulaboratorijskih uporednih ispitivanja. Ovo je u skladu sa preporukama vodećih evropskih institucija – EURAHEM [5] i Evropske organizacije za eksterno obezbeđenje kvaliteta provajdera medicinskih laboratorijskih (eng. *European Organization for External Quality Assurance providers in Laboratory Medicine* – EQALM) da je poželjno da neprofitne organizacije budu akreditovane kao PT provajderi [6], imajući u vidu da je NKL neprofitna ustanova, odnosno predstavlja deo nacionalnog regulatornog tela. Akreditacijom PT provajdera se osigurava kvalitet predložene PT šeme, koja će predstavljati novi koncept saradnje između regulatornih tela i farmaceutske industrije.

Imajući u vidu da je kompetentnost NKL u oblasti laboratorijske kontrole kvaliteta dokazana višestrukim eksternim proverama sistema menadžmenta (uspešno realizovana nacionalna akreditacija prema zahtevima standarda SRPS ISO 17025, sertifikovan sistem menadžmenta kvalitetom prema zahtevima ISO 9001 i sistem menadžmenta zaštitom životne sredine prema zahtevima ISO 14001, uspešno realizovana akreditacija u sistemu OMCL mreže), može se smatrati da su ostvareni svi preduslovi koji se odnose na stručnu ekspertizu koju PT provajder mora da poseduje prilikom organizovanja i sprovođenja jedne PT šeme. Kao PT provajder NKL je u obavezi da brine o svim aspektima pripreme, organizovanja, sprovođenja jednog međulaboratorijskog uporednog ispitivanja, a poseban akcenat treba da bude stavljen na

statističku obradu rezultata i izveštavanje učesnika o rezultatima nakon što se studija okonča. Svi navedeni aspekti su definisani standardom ISO 17043:2010 [3], te su predmet ocene nacionalnog akreditacionog tela tokom akreditacije.

2.1 Bitni aspekti osiguranja kvaliteta planiranih PT šema

U postupku kontrole kvaliteta lekova i medicinskih sredstava na nacionalnom tržištu, NKL intenzivno komunicira sa predstavnicima farmaceutske industrije, kako bi se osiguralo da su ispunjeni svi zahtevi definisani u Pravilniku o načinu kontrole kvaliteta lekova i medicinskih sredstava [7]. Jedan od najvažnijih ciljeva NKL je ispunjenje Plana sistematske kontrole, koji je definisan u skladu sa dokumentom Evropskog direktorata za kvalitet lekova i zaštitu zdravlja „Risk based model for targeting medicinal products for Market Surveillance testing” [8]. Prema ovom dokumentu lekovi se klasifikuju na osnovu rizika moguće pojave defekta kvaliteta u toku roka trajanja leka, a u odnosu na sledeće faktore: farmaceutska svojstva proizvoda, proizvođač leka, klinička primena leka i pozicija na tržištu. Ovi faktori se ocenjuju na osnovu njihovog uticaja bilo na pojavu defekta kvaliteta, ili štete koju taj defekt kvaliteta može naneti pacijentu. Na osnovu navedenih kriterijuma, prema Planu sistematske kontrole, godišnje se uzorkuje i kontroliše oko 400 lekova sa nacionalnog tržišta.

Rezultati sistematske kontrole pokazuju da između 10 % – 15 % lekova prometovanih na tržištu Srbije ima neadekvatan kvalitet, odnosno da ne ispunjavaju kriterijume kvaliteta koji su odobreni dozvolom za lek. Ovo ukazuje na postojanje određenih problema u okviru laboratorija za kontrolu kvaliteta farmaceutske industrije, koji mogu biti posledica neadekvatne validacije metode, kalibracije opreme, ili nedostatka odgovarajućih kompetencija analitičara. Stoga je od suštinskog značaja razviti PT šeme koje će obuhvatiti različite metode i tehnike koje se odnose na analizu lekova obuhvaćenih sistematskom kontrolom. Na taj način bi se analizom rezultata laboratorija učesnica utvrdili potencijalni nedostaci metoda, a nakon toga definisale korektivne mere kojima bi se unapredile postojeće procedure ispitivanja. Očekuje se da bi ovo dovelo do harmonizacije metoda ispitivanja i posledično uticalo na ujednačen kvalitet lekova na tržištu Srbije.

U skladu sa navedenim, u prvoj fazi projekta razvoja PT šema u oblasti kontrole kvaliteta lekova predviđene su sledeće tehnike, odnosno metode ispitivanja:

- gubitak sušenjem,
- određivanje relativne gustine,
- volumetrijska titracija,
- semi-mikro određivanje vode (Karl-Fisher),
- utvrđivanje koncentracije analita tečnom hromatografijom i

- određivanje brzine oslobađanja lekovite supstance UV-VIS spektrofotometrijom.

NKL kao PT provajder posebnu pažnju treba da posveti osiguranju svih aspekata sistema kvaliteta, imajući u vidu da se sistem kvaliteta PT šema takođe ocenjuje tokom akreditacije. Ovo podrazumeva definisanje šeme distribucije uzoraka i referentnih standarda laboratorijama učesnicama, kontrolu uslova transporta, osiguranje tajnosti podataka o laboratorijama učesnicama (imajući u vidu da su rezultati PT šema namenjeni isključivo internoj primeni, odnosno unapređenju sistema kvaliteta laboratorije učesnice i ne služe za bilo kakvo rangiranje laboratorija). Ovi aspekti kvaliteta treba da budu definisani internim procedurama PT provajdera. Naročito bitan aspekt jeste definisanje protokola ispitivanja u okviru svake PT šeme pojedinačno, kao i analiza rezultata laboratorija učesnica i primena odgovarajućih statističkih tehnika za ukupnu procenu uspešnosti jedne PT šeme.

PT provajder svakoj laboratoriji učesnici dostavlja uzorke koji se ispituju, potrebne referentne standarde i protokol ispitivanja, sa naznakama u kom roku i na koji način je potrebno dostaviti rezultate ispitivanja. Uobičajeno je da se u PT šemama koriste one metode i tehnike koje laboratorije rutinski koriste u svom radu, tako da nije potrebna nikakva posebna priprema niti podešavanje laboratorijskih uslova za učešće u PT šemi.

Za statističku obradu podataka koristi se standard ISO 13528 koji definiše sve statističke metode koje je potrebno koristiti za analizu podataka dobijenih u okviru međulaboratorijskih uporednih ispitivanja. Naime, ovaj standard preporučuje primenu tzv. robusnih statističkih metoda, odnosno analizu srednjih vrednosti i standardne devijacije. Prednost ovih metoda je u tome što smanjuju uticaj onih rezultata koji su van očekivanih okvira na izračunate statističke parametre [9].

Prilikom izveštavanja o rezultatima PT šeme od posebnog značaja je analiza performanse svake od učesnica, koja se utvrđuje u odnosu na Z vrednost na osnovu sledeće jednačine (9):

$$z = \frac{x - X}{\hat{\sigma}}$$

gde je x rezultat ispitivanja koji je svaka pojedinačna laboratorija učesnica navela u svom izveštaju; X je ciljna vrednost (tzv. *assigned value*); $\hat{\sigma}$ je standardna devijacija za PT šemu.

U najvećem broju PT šema limiti su postavljeni u granicama $-2 \leq Z \leq +2$, te se rezultati van ovog opsega smatraju neprihvatljivim, odnosno laboratorija koja ostvari ovakav rezultat ima neodgovarajuću performansu.

Konačno, PT provajder treba naročitu pažnju da posveti pripremi izveštaja o međulaboratorijskom uporednom ispitivanju i blagovremenoj distribuciji izveštaja svim laboratorijama učesnicama. Uobičajeno je da se rezultati predstavljaju grafički, tako što se prikazuju ostvarene Z vrednosti svih laboratorijskih učesnika sa jasnim prikazom odstupanja od ciljne vrednosti, odnosno odstupanja od opsega $-2 \leq Z \leq +2$.

3. Zaključak

Zvanične nacionalne laboratorije za kontrolu kvaliteta lekova najčešće učestvuju u međulaboratorijskim uporednim ispitivanjima koje organizuje EDQM. Stoga je razvoj nacionalne PT šeme u ovoj oblasti od velikog značaja za ovaj tip laboratorijske kontrole, jer bi u ovim ispitivanjima učestvovalo i zvanične nacionalne kontrolne laboratorije zemalja u okruženju, čime se ostvaruje regionalni značaj.

Razvoj i akreditacija prvog nacionalnog PT provajdera u oblasti kontrole kvaliteta lekova ima značaj i u dodatnom unapređenju i usaglašavanju analitičkih metoda analize lekova koji su predmet ispitivanja u okviru Plana sistematske kontrole. PT šema bi se u ovom kontekstu koristila da pokaže da su analitičke procedure koje koriste laboratorijske učesnice efektivne i da su rezultati ispitivanja koje one ostvaruju tačni i precizni.

Dodatna vrednost ovakvog tipa PT šeme jeste njihova edukativna uloga, imajući u vidu da bi PT provajder imao ulogu i u tumačenju rezultata PT šeme, definisanju adekvatnih korektivnih mera kod onih laboratorijskih učesnika koji su imale neadekvatnu performansu kao i u praćenju njihovog daljeg sprovođenja. Ovo je u skladu sa stručnim preporukama da PT šeme treba da budu mogućnost za učenje i unapređenje, a ne ocenjivanje kompetentnosti laboratorijskih učesnica, mada se u velikom broju slučajeva upravo rezultati PT šeme koriste za ocenu da li je laboratorijska kompetentna da sprovede neko ispitivanje ili ne [10].

4. Literatura

1. SRPS ISO/IEC 17025:2006 - Opšti zahtevi za kompetentnost laboratorija za ispitivanje i laboratorija za etaloniranje, Institut za standardizaciju Srbije, 2006
2. Visser R. Interpretation of interlaboratory comparison results to evaluate laboratory proficiency. *Accred Qual Assur.* 2006; 10: 521–26.
3. ISO/IEC 17043:2010 - Conformity assessment — General requirements for proficiency testing. International Organisation for Standardisation, 2010.
4. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. [cited 30.05.2014]. Available from: <http://www.edqm.eu/en/Proficiency-Testing-Scheme-47.html>.
5. EURAHEM [cited 19.06.2014]. Available from: <http://www.eurachem.org/>.
6. Örnemark U, Boley N, Saeed K et al. Proficiency testing in analytical chemistry, microbiology, and laboratory medicine – working group discussions on current status, problems, and future directions. *Accredit Qual Assur.* 2001; 6:140-6.
7. Pravilnik o načinu kontrole kvaliteta lekova i medicinskih sredstava. Službeni glasnik RS 64/2011.
8. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. PA/PH/OMLC (07) 87 6R – Risk based model for targeting product for MS testing. Council of Europe, Strasbourg. 2008.
9. ISO 13528:2005 - Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons. International Organization for Standardisation, 2005.
10. Juniper IR. Quality issues in proficiency testing. *Accred Qual Assur.* 1999; 4: 336-41.

The importance of proficiency testing schemes for the performance improvement of medicines quality control laboratories

Gordana Pejović^{1,2*}

¹Medicines and Medical Devices Agency of Serbia, 458 Vojvode Stepe Street, Belgrade, Serbia

² University of Belgrade - Faculty of Organizational Science, Department for Quality Management, 154 Jove Illica Street, Belgrade, Serbia

*corresponding author, e-mail: gordana.pejovic@alims.gov.rs

Summary

In the last few decades proficiency testing schemes (PT schemes) have become especially important for the testing and calibration laboratories performance improvement, as well as one of the prerequisites for the successful accreditation of laboratories. This paper explains the particular significance of PT scheme for medicines quality control laboratories, which are participating only in the PT schemes organized by the European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare. Also, the paper describes the essential prerequisites for accreditation of the first national PT provider in the field of medicines quality control, as well as the quality assurance aspects of a PT scheme in this area. National Control Laboratory has the necessary resources and the required competence for the organization and implementation of the PT scheme, and may be accredited as a provider PT. It was pointed out that the participation of quality control laboratories belonging to the pharmaceutical industry in these studies represented a distinct improvement in the strengthening of trust between the pharmaceutical industry and the national regulatory body, because the results of PT schemes would be used for educational purposes only in order to improve and harmonize methods for analysis of drugs that are on the national market.

Keywords: proficiency testing schemes, regulatory body, laboratory performance, accreditation
