



UNIVERZITET U NIŠU  
MEDICINSKI FAKULTET



**Maja M. Vujović**

**RAZVOJ NOVE ANALITIČKE METODE ULTRA  
BRZE TEČNE HROMATOGRAFIJE SA TANDEM  
MASENIM DETEKTOROM ZA ODREĐIVANJE  
AMBROKSOL HIDROHLORIDA I NJENA  
PRIMENA**

doktorska disertacija

Mentor  
Akademik Prof. dr Milan Jokanović

Niš, 2015.



UNIVERSITY OF NIŠ  
FACULTY OF MEDICINE



**Maja M. Vujović**

**DEVELOPMENT OF A NEW ULTRA HIGH  
PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY  
- TANDEM MASS SPECTROMETRY METHOD  
FOR DETERMINATION OF AMBROXOL  
HYDROCHLORIDE IN SERUM WITH  
APPLICATION**

doctoral thesis

Mentor  
Academician Prof. dr Milan Jokanović

Niš, 2015.

Mentor: **Akademik Prof. dr Milan Jokanović**, redovni profesor na Medicinskom fakultetu u Nišu

Članovi komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije:

**Prof. dr Goran Nikolić**, predsednik

Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu

---

**Akademik Prof. dr Milan Jokanović**, mentor i član

Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu

---

**Prof. dr Vesna Kilibarda**, član

Vojnomedicinska Akademija u Beogradu

---

U Nišu, dana

---

*....u životu te ništa neće sputavati osim tvojih misli,  
ograničavati osim tvojih strahova i  
kontrolisati osim tvojih ubeđenja....*

*M. Williamson*

*Emiliji s ljubavlju,*

## **Zahvalnica**

*Ova doktorska disertacija rađena je na Odseku za farmaciju, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu, Toksikološkoj laboratoriji Zavoda za sudsku medicinu u Nišu i prostorijama Galenike a.d. Beograd. Izradom rada rukovodio je Akademik prof. dr Milan Jokanović, redovni profesor Medicinskog fakulteta, Odsek farmacija u Nišu, koji mi je pružio nesebičnu stručnu i kolegijalnu pomoć u izradi i pisanju ovog rada, pri čemu mu se iskreno i najtoplije zahvaljujem.*

\*

*Prof. Goranu Nikoliću i prof. dr Vesni Kilibardi se zahvaljujem na važnim stručnim sugestijama i podršci.*

\*

*Zahvaljujem svojim dugogodišnjim kolegama i saradnicima Zavoda za sudsku medicinu u Nišu, gde mi je omogućeno nesmetano izvođenje eksperimentalnog dela disertacije. Posebno se zahvaljujem direktoru, prof. dr Radovanu Karadžiću, pomoćniku direktora, prof. dr. Goranu Iliću i svojoj dragoj kolegici i prijateljici, načelniku Toksikološke laboratorije ZSM, specijalisti toksikološke hemije, Biljani Milosavljević.*

\*

*Takođe, želim da se zahvalim svojoj porodici. Roditeljima i bratu, čija me je beskrajna ljubav i podrška vodila do kraja, i mojoj večitoj inspiraciji i smislu, ćerki Emiliji, kojoj i posvećujem ovaj rad.*

\*

*Hvala svima na jednom divnom iskustvu.*

## I Autor

---

<i>Ime i prezime:</i>	<b>Maja M. Vujović</b>
<i>Datum i mesto rođenja:</i>	<b>10.04.1971. god., Niš, Srbija</b>
<i>Sadašnje zaposljenje:</i>	<b>Asistent na UNO Farmacija - Toksikologija sa analitiko</b>

---

## II Doktorska disertacija

---

<i>Naslov:</i>	<b>Razvoj nove analitičke metode ultra brze tečne hromatografije sa tandem masenim detektorom za određivanje ambroksol hidrohlorida i njena primena</b>
<i>Broj stranica:</i>	<b>196</b>
<i>Broj slika:</i>	<b>43</b>
<i>Broj tabela:</i>	<b>36</b>
<i>Broj bibliografskih podataka:</i>	<b>150</b>
<i>Ustanova i mesto gde je rad izrađen:</i>	<b>Departman za farmaciju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu; Toksikološka laboratorija Zavoda za sudsku medicinu u Nišu; Vivarijum Galenika a.d. Beograd</b>
<i>Naučna oblast:</i>	<b>Farmacija, Analitika lekova, Toksikologija</b>
<i>Mentor:</i>	<b>Akademik prof. dr Milan Jokanović</b>

---

## III Ocena i odbrana

---

<i>Datum prijave teme:</i>	<b>24.02.2015.god.</b>
<i>Datum prihvatanja doktorske disertacije:</i>	<b>22.05.2015.god.</b>
<i>Komisija za ocenu podobnosti teme i kandidata:</i>	<b>Prof. dr Goran Nikolić, predsednik Prof. dr Milan Jokanović, mentor i član Prof. dr Vesna Kilibarda, član</b>
<i>Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:</i>	<b>Prof. dr Goran Nikolić, predsednik Prof. dr Milan Jokanović, mentor i član Prof. dr Vesna Kilibarda, član</b>
<i>Datum odbrane doktorske disertacije:</i>	

---

## IV Nučni doprinos doktorske disertacije:

---

Maja M. Vujović, Milan Jokanović, Goran M. Nikolić. Development of a new ultra-high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry method for determination of ambroxol hydrochloride in serum with pharmacokinetic application. Hemijska industrija, 2015, u štampi, DOI:10.2298/HEMIND150625048V.

---

## **Razvoj nove analitičke metode ultra brze tečne hromatografije sa tandem masenom detektorom za određivanje ambroksol hidrohlorida i njena primena**

### **Izvod**

Ambroksol hidrohlorid je ekspektorans koji se uspešno primenjuje u mukolitičkoj terapiji više od trideset godina. Lek reguliše sekreciju mukoze ali pokazuje i antioksidativno, antiinflamatorno, analgetičko, lokalno anestetičko, antivirusno i antibakterijsko dejstvo. Primenjuje se u mukolitičkoj terapiji kod akutnih i hroničnih bronhopulmonalnih bolesti povezanih sa povećanim stvaranjem i poremećajem formiranja i transporta mukusa. Cilj ovog naučnog istraživanja je razvoj nove analitičke metode za određivanje ambroksola u serumu primenom ultra-brze tečne hromatografije sa tandem masenim detektorom (UHPLC–MS/MS) i njena primena u *in vivo* i *in vitro* uslovima. Validacija analitičke metode sprovedena je u skladu sa priručnikom Internacionalne Komisije za harmonizaciju i validaciju bioanalitičkih metoda ICH. Linearnost, preciznost, tačnost, ekstrakcioni prinos, *carryover*, robustnost i test stabilnosti opterećenih seruma čuvanih na različitim uslovima zadovoljili su sve kriterijume prihvatanja, te je zaključeno da je postavljena metoda prihvatljiva po svim za parametrima validacije. Hromatografsko razdvajanje ambroksola i verapamila (IS) izvršeno je na submikrometarskoj koloni Phenomenex Kinetex™ RP - C<sub>18</sub> (2.1 mm x 50 mm, 1.3µm), sa nepuferskom mobilnom fazom metanol – 0.01% mravlja kiselina u vodi (90:10 v/v) pri brzini protoka od 0.3 mL/min. Za MS detekciju primenjena je elektrosprej pozitivna jonizacija (ESI) masenog spektrometra u multi reakcionom monitoring modu (MRM) sa tipičnim jonskim tranzicijama  $m/z$  378.9→263.8 za ambroksol i  $m/z$  455.2→165.0 za IS pri kolizionim energijama od -20 V i -25 V. Električni naponi na interfejsu i detektoru bili su redom 4.5 kV i -1.92 kV. Linearnost metode je utvrđena sa srednjim koeficijentom korelacije ( $r$ ) > 0.999 u koncentracionom opsegu 0.5 - 200 ng/mL sa limitom detekcije (LOD) od 0.25 ng/mL i donjim limitom kvantifikacije (LLOQ) 0.5 ng/mL. Rezultati intra- i interdnevne preciznosti i tačnosti izmerene u tri različita dana pokazali su prihvatljive vrednosti od ±15%. UHPLC-MS/MS metoda se pokazala pouzdanom i visoko osjetljivom za određivanje ambroksola u kratkom vremenu trajanja analize od minuta i po. Shodno tome, metoda je pogodna za analizu

velikog broja uzoraka za kratko vreme što čini proces validacije bržim i efikasnijim. Razvijena i validirana metoda ultra brze tečne hromatografije sa tandem masenim detektorom za određivanje ambroksola je uspešno primenjena u *in vivo* i *in vitro* ispitivanjima. U *in vivo* za određivanje farmakokinetičkih parametara ambroksola u serumu kunića nakon primene jedne oralne doze od 30 mg, a *in vitro* za ispitivanje brzine rastvaranja ambroksola iz tableta prema odgovarajućim farmakopejama . Nova metoda mogla bi da ima značajnu primenu u farmaceutskoj industriji u ispitivanju novih farmaceutskih oblika ambroksola. To se odnosi na izbor optimalne farmaceutske formulacije ambroksola proverom farmakokinetike leka na kunićima pre studije bioekvivalencije na ljudima.

**Ključne reči:** Ambroksol hidrohlorid; UHPLC–MS/MS; serum; farmakokinetika

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Analitike lekova, Toksikologija

**UDK:** 616.085; 661.12



# **Development of a new ultra high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry method for determination of ambroxol hydrochloride in serum with application**

## **Summary**

Ambroxol hydrochloride is an expectorant agent, successfully applied in mucolytic therapy for acute and chronic bronchopulmonary diseases. The drug regulates not only mucus secretion but also showed antioxidant, anti-inflammatory and local anesthetic properties. Ambroxol is applied in mucolytic therapy of acute and chronic diseases associated with increased production and disruption of the formation and transportation of mucus. The purpose of this study was to develop an ultra-high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS) method for the simple determination of the ambroxol in serum with *in vivo* and *in vitro* application. The validation of the method was performed according the ICH (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) guidelines Q2A/Q2B for the validation of bioanalytical methods. Linearity, precision, extraction recovery, carryover, and stability test of the spiked serums stored under different conditions satisfy the acceptance criteria. The presented method was found to be appropriate for all validation parameters. The chromatographic separation was achieved in a submicron Kinetex RP - C<sub>18</sub> column (2.1 mm x 50 mm, 1.3µm) using the mobile phase methanol – 0.01% formic acid aqueous solution (90:10 v/v) at a flow rate of 0.3 mL/min. The ESI mass spectrometry in the MRM mode was used with a typical transitions *m/z* 378.9→263.8 for ambroxol and *m/z* 455.2→165.0 for IS at collision energies -20 V and -25 V, respectively. The admitted voltages for interface and detector were 4.5 kV and -1.92 kV. Linearity was determined with an average coefficient of determination >0.999 over the dynamic range from 0.5 - 200 ng/mL with LOD and LOQ of 0.25 ng/mL and 0.5 ng/mL, respectively. The results of the intra- and inter-day precision and accuracy determined in different days were all found to be within the acceptable limits ±15%. The reported UHPLC–MS/MS method was proved to be reliable and highly sensitive for the determinations of ambroxol in short analysis run time for an only minute and a half. Consequently, the method is enabled a hundred of injections

per day which makes the validation process faster and more efficient. Developed a new UHPLC–MS/MS method of ultra high - performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry for the determination of ambroxol, was proven useful in the *in vivo* and *in vitro* assays. The present method was applied to the *in vivo* pharmacokinetic study after a single oral dose administration of 30 mg ambroxol tablet to rabbits, and to the *in vitro* dissolution tests according the relevant pharmacopeia. The new method could be applied in the pharmaceutical industry in the study of new pharmaceutical forms of ambroxol. This also applies to the selection of the optimal pharmaceutical formulation ambroxol checking the pharmacokinetics of the drug on rabbits before the bioequivalence study in humans.

**Key words:** Ambroxol hydrochloride; UHPLC-MS/MS; serum; pharmacokinetics

**Scientific field:** Pharmacy

**Narrow scientific field:** Drug Analysis, Toxicology

**UDC:** 616.085; 661.12

## LISTA SKRAĆENICA

---

HPLC	High Performance Liquid Chromatography
UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography
PDA	Photo Diode Array Detector
MS/MS	Tandem maseni detector
API	Atmospheric Pressure Ionization
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
ESI	Electrospray Ionization
CID	Collision Induced Dissociation
SIM	Selected Monitoring Mode
MRM	Multiple Reaction Monitoring
SCAN	Full Scan Mode
PP	Protein precipitation
LLE	Liquid-liquid extraction
SPE	Solid Phase Extraction
MF	Mobilna faza
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantification
LLOQ	Lower Limit of Quantification
STD	Standardni uzorak
QC	Quality Control
CC	Calibration Curve
LQC	Low Quality Control
MQC	Medium Quality Control
HQC	High Quality Control
ICH	International Conference on Harmonization Guideline
FDA	Food and Drug Administration
EPA	Environmental Protection Agency
GMP	Good Manufacturing Practice
ISO	International Organization for Standardization
GLP	Good Laboratory Practice
GMP	Good Manufacturing Practice
Ph. Eu.	Evropska farmakopeja
BP	Britanska farmakopeja
USP	Američka farmakopeja
JP	Japanska farmakopeja

## SPISAK TABELA

---

### Poglavlje 4

<b>Tabela 4.1.2.1.</b> Rezultati regresione analize kalibracionih kriva 1, 2 i 3 STD standarda ambroksola na pet koncentracionih nivoa 0.5-10-20-100-200 ng/mL;UHPLC-MS/MS.....	57
<b>Tabela 4.1.3.1.</b> Vrednosti <i>Pause Time</i> i <i>Dwell Time</i> , napona Q1 i Q3 kvadrupola i kolizionih energija (CE) za jonske tranzicije ambroksola, m/z 378.9→263.8 i verapamila (IS), m/z 455.3 →164.90.....	58
<b>Tabela 4.2.1.</b> Srednje vrednosti ekstrakcionih prinosa seruma opterećenih ambroksolom 1 mg/L ( $\lambda=210$ nm, n=3) primenom metode precipitacije, tečno – tečne ekstrakcije i tečno – čvrste ekstrakcije, HPLC/PDA.....	62
<b>Tabela 4.2.2.</b> Srednje vrednosti ekstrakcionih prinosa seruma opterećenih ambroksolom 5 mg/L ( $\lambda=210$ nm, n=3) primenom metode precipitacije, tečno – tečne ekstrakcije i tečno – čvrste ekstrakcije, HPLC/PDA.....	63
<b>Tabela 4.2.3.</b> Srednje vrednosti ekstrakcionih prinosa seruma opterećenih ambroksolom 10 mg/L ( $\lambda=210$ nm, n=3) primenom metode precipitacije, tečno – tečne ekstrakcije i tečno – čvrste ekstrakcije, HPLC.....	63
<b>Tabela 4.3.1.1.</b> Tačnost i preciznost merenja kalibratora kalibracione krive 1CC za devet koncentracionih nivoa ambroksola 0.5-2-5-10-20-50-100-150-200 ng/mL, n=6.....	66
<b>Tabela 4.3.1.2.</b> Tačnost i preciznost merenja kalibratora kalibracione krive 2CC za devet koncentracionih nivoa ambroksola 0.5-2-5-10-20-50-100-150-200 ng/mL, n=6.....	68
<b>Tabela 4.3.1.3.</b> Tačnost i preciznost merenja kalibratora kalibracione krive 3CC za devet koncentracionih nivoa ambroksola 0.5-2-5-10-20-50-100-150-200 ng/mL, n=6.....	70
<b>Tabela 4.3.1.4.</b> Rezultati regresione analize kalibracionih krivih kalibratora (opterećeni serumi) ambroksola 1, 2 i 3 CC; UHPLC-MS/MS.....	73
<b>Tabela 4.3.1.5.</b> Tačnost i preciznost kalibracione krive 1CC ambroksola (0.5-2-5-10-20-50-100-150-200 ng/mL, n=6).....	73
<b>Tabela 4.3.1.6.</b> Tačnost i preciznost kalibracione krive 2CC ambroksola (0.5-2-5-10-20-50-100-150-200 ng/mL, n=6).....	74
<b>Tabela 4.3.1.7.</b> Tačnost i preciznost kalibracione krive 3CC ambroksola (0.5-2-5-10-20-50-100-150-200 ng/mL, n=6).....	74
<b>Tabela 4.3.1.8.</b> Validacioni izveštaj kalibracione krive 1CC.....	75
<b>Tabela 4.3.1.9.</b> Validacioni izveštaj kalibracione krive 2CC.....	75
<b>Tabela 4.3.1.10.</b> Validacioni izveštaj kalibracione krive 3CC.....	75
<b>Tabela 4.3.3.1.</b> Statistička evaluacija LOD.....	76
<b>Tabela 4.3.4.1.</b> Statistička evaluacija LLOQ.....	77
<b>Tabela 4.3.5.1.</b> Tačnost i preciznost merenja kontrola 1QC na četiri koncentraciona	

nivoa ambroksola: niskom (QC <sub>1</sub> , LLOQ, 0.5 ng/mL), srednjem 1 (QC <sub>2</sub> , M1QC, 20 ng/mL), srednjem 2 (QC <sub>3</sub> , M2QC, 100 ng/mL) i visokom (QC <sub>4</sub> , HQC, 200 ng/mL).....	79
<b>Tabela 4.3.5.2.</b> Tačnost i preciznost merenja kontrola 2QC na četiri koncentraciona nivoa ambroksola: niskom (QC <sub>1</sub> , LLOQ, 0.5 ng/mL), srednjem 1 (QC <sub>2</sub> , M1QC, 20 ng/mL), srednjem 2 (QC <sub>3</sub> , M2QC, 100 ng/mL) i visokom (QC <sub>4</sub> , HQC, 200 ng/mL).....	80
<b>Tabela 4.3.5.3.</b> Tačnost i preciznost merenja kontrola 3QC na četiri koncentraciona nivoa ambroksola: niskom (QC <sub>1</sub> , LLOQ, 0.5 ng/mL), srednjem 1 (QC <sub>2</sub> , M1QC, 20 ng/mL), srednjem 2 (QC <sub>3</sub> , M2QC, 100 ng/mL) i visokom (QC <sub>4</sub> , HQC, 200 ng/mL).....	81
<b>Tabela 4.3.5.4.</b> Intra- i interdnevna preciznost i tačnost merenja kalibratora CC (0.5-2-5-10-20-50-100-150-200 ng/mL, n=6).....	82
<b>Tabela 4.3.5.5.</b> Intra- i interdnevna preciznost i tačnost merenja kontrola QC (0.5-20-100-200 ng/mL, n=6).....	83
<b>Tabela 4.3.6.1.</b> Evaluacija uticaja matriks efekta na MS/MS jonizaciju ambroksola (2 ng/mL) i interenog standarda (20 ng/mL), n=3.....	84
<b>Tabeli 4.3.7.1.</b> Površine pikova, izmerene koncentracije, preciznost i tačnost merenja na dva koncentraciona nivoa testiranih uzoraka QC ambroksola (20 i 200 ng/mL, n=6) pri testu (a) kratkotrajne stabilnosti, (b) dugotrajne stabilnosti, (c) na autosempleru i (d1/d2) zamrzavanja/odmrzavanja (3 ciklusa).....	85
<b>Tabela 4.3.7.2.</b> Evaluacija stabilnosti testiranih QCs uzoraka ambroksola u serumu (20 ng/mL i 200 ng/mL, n=6).....	88
<b>Tabela 4.3.7.3.</b> Stabilnost osnovnog rastvora ambroksola u serumu (10 ng/mL, n=3).....	88
<b>Tabela 4.3.8.1.</b> Srednji ekstrakcioni prinosi ambroksola nakon tečno-čvrste ekstrakcije (20-100-200 ng/mL, n=6).....	89
<b>Tabela 4.3.10.1.</b> Površine pikova, izmerene koncentracije, preciznost i tačnost merenja standarda ambroksola na dva koncentraciona nivoa (20 i 200 ng/mL, n=3) pri promeni (a) temperature kolone ±5°C, (b) udela organskog dela mobilne faze ±5% metanola, (c) protoka mobilne faze ±0.05 ml/min i (d) na uspostavljenim uslovima metode.....	91
<b>Tabela 4.3.10.2.</b> Evaluacija robustnosti UHPLC-MS/MS metode pri koncentracijama standarda ambroksola 20 ng/ml i 200 ng/ml (n=3).....	93

<b>Tabela 4.4.1.</b> Koncentracije ambroksola u serumu kunića 1, 2 i 3 u osam vremenskih tačaka (0-0.25-0.5-1-2-4-6-24 h).....	94
<b>Tabela 4.4.2.</b> Srednje vrednosti farmakokinetičkih parametara kod kunića nakon primene jedne oralne doze ambroksola od 30 mg (n=3).....	94
<b>Tabela 4.5.1.</b> Srednje koncentracije i procenat rastvorenog ambroksola iz tableta sa vremenom na pH 1.2 i $37.0\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ , n=3.....	98
<b>Tabela 4.5.2.</b> Srednje koncentracije i procenat rastvorenog ambroksola iz tableta sa vremenom na pH 4.5 i $37.0\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ , n=3.....	99
<b>Tabela 4.5.3.</b> Srednje koncentracije i procenat rastvorenog ambroksola iz tableta sa vremenom na pH 6.8 i $37.0\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ , n=3.....	100
<b><u>Poglavlje 5</u></b>	
<b>Tabela 5.1.2.1.</b> Najčešći organski rastvarači za TTE.....	108
<b>Tabela 5.4.9.1.</b> Tipične varijacije u testiranju robustnosti metode (izokratski mod).....	144

## SPISAK SLIKA

---

### **Poglavlje 1**

<b>Slik 1.1.1.</b> Ambroksol hidrohlorid.....	1
<b>Slika 1.3.3.1.</b> Shimadzu 8030 LC-MS tandem maseni spektrometar.....	18
<b>Slika 1.3.3.2.</b> Šema osnovnih delova Shimadzu 8030 LC-MS tandem masenog spektrometra.....	19
<b>Slika 1.3.3.3.</b> Kvadrupolni analizator.....	22
<b>Slika 1.3.3.4.</b> SIM – Single Ion Monitoring mod.....	22
<b>Slika 1.3.3.5.</b> Šema elektronskog multiplikatora pri registrovanju (+) jona.....	24
<b>Slika 1.3.3.6.</b> Šema MRM – Multi Reaction Monitoring moda. Q1: SIM, Q2: Fragmentacija za selektovani 1 MRM, Q3: S.....	25
<b>Slika 1.5.1.</b> Grafička zavisnost koncentracije leka u plazmi sa vremenom pri i.v. primeni kod otvorenog jednodimenzionalnog modela.....	30
<b>Slika 1.5.2.</b> Grafička zavisnost koncentracije leka u plazmi sa vremenom pri i.v. primeni kod otvorenog dvodimenzionalnog modela.....	31

### **Poglavlje 4**

<b>Slika 4.1.1.1.</b> UV apsorpcioni spektar standarda ambroksol hidrohlorida, 10 mg/L u metanolu u odnosu na biblioteku UV/VIS spektara .....	52
<b>Slika 4.1.1.2.</b> UV apsorpcioni spektar standarda verapamil hidrohlorida, 10 mg/L u metanolu u odnosu na biblioteku UV/VIS spektara.....	53
<b>Slika 4.1.1.3.</b> Hromatogram standarda ambroksola (1 mg/L) i verapamila (IS, 10 mg/L) na 210 nm; HPLC/PDA.....	53
<b>Slik 4.1.1.4.</b> Hromatogram standarda ambroksola (5 mg/L) i verapamila (IS, 10 mg/L) na 210 nm; HPLC/PDA.....	54
<b>Slika 4.1.1.5.</b> Hromatogram standarda ambroksola (10 mg/L) i verapamila (IS, 10 mg/L) na 210 nm; HPLC/PDA.....	54
<b>Slika 4.1.1.6.</b> Kalibraciona kriva za određivanje ambroksola metodom internog standarda; HPLC/PDA.....	55
<b>Slika 4.1.2.1.</b> Kalibraciona kriva 1STD standarda ambroksola (0.5-10-20-100-200 ng/mL) u odnosu na IS (20 ng/mL verapamila); UHPLC-MS/MS.....	55
<b>Slika 4.1.2.2.</b> Kalibraciona kriva 2STD standarda ambroksola (0.5-10-20-100-200 ng/mL) u odnosu na IS (20 ng/mL verapamila); UHPLC-MS/MS.....	56

<b>Slika 4.1.2.3.</b> Kalibraciona kriva 3STD standarda ambroksola (0.5-10-20-100-200 ng/mL) u odnosu na IS (20 ng/mL verapamila); UHPLC-MS/MS.....	56
<b>Slika 4.1.3.1.</b> TIC jonski hromatogrami sa najintezivnijim jonima (a) m/z 378.9 za ambroksol i (b) m/z 455.3 za IS (verapamil) pri koncentraciji 100 mg/L.....	59
<b>Slika 4.1.3.2.</b> Tipični MS produkt-jon maseni spektri protonizovanog molekuskog jona (a) ambroksola, m/z 378.9→263.8 i (b) IS, verapamila, m/z 455.2→165.0 u MRM modu sa naznačenim fragmentacijama.....	60
<b>Slika 4.1.3.3.</b> MRM jonski hromatogram a) ekstrakta seruma bez internog standarda (blank), b) ekstrakta seruma sa internim standardom (nula, zero), c) ekstrakta opterećenog seruma, 20 ng/mL ambroksol (m/z 378.9→263.8) i 20 ng/mL IS (m/z 455.3→164.9) i d) ekstrakta seruma kunića 4h nakon administracije jednokratne oralne doze ambroksola od 30 mg.....	61
<b>Slika 4.2.1.</b> Hromatogram seruma opterećenog ambroksolom (1 mg/L) i IS (10mg/L) nakon neutralne precipitacije proteina na 210 nm; HPLC/PD.....	64
<b>Slika 4.2.2.</b> Hromatogram seruma opterećenog ambroksolom (5 mg/L) i IS (10mg/L) nakon tečno-čvrste ekstrakcije (Strata-XC) na 210 nm; HPLC/PDA.....	64
<b>Slika 4.3.1.5.</b> Kalibraciona kriva kalibratora ambroksola 1CC (0.5-2-5-10-20-50-100 150-200 ng/mL).....	72
<b>Slika 4.3.1.6.</b> Kalibraciona kriva kalibratora ambroksola 2CC (0.5-2-5-10-20-50-100 150-200 ng/mL).....	72
<b>Slika 4.3.1.7.</b> Kalibraciona kriva kalibratora ambroksola 3CC (0.5-2-5-10-20-50-100 150-200 ng/mL).....	72
<b>Slika 4.3.3.1.</b> MRM jonski hromatogram ambroksola na LOD; 0,25 ng/mL.....	76
<b>Slika 4.3.4.1.</b> MRM jonski hromatogram ambroksola na LLOQ; 0,5 ng/mL.....	77
<b>Slika 4.3.9.1.</b> Hromatogram standarda ambroksola 300 ng/mL.....	90
<b>Slika 4.3.9.2.</b> Hromatogram uzorka blank seruma QC <sub>0</sub> nakon injektovanja standarda ambroksola od 300 ng/mL.....	90
<b>Slika 4.4.1.</b> Krive zavisnosti koncentracije ambroksola u serumu kunića 1 (a), 2 (b), 3 (c) sa vremenom nakon primene jedne oralne doze ambroksola od 30 mg (0-0.25-0.5-1-2-4-6-24h) i (d) uporedni prikaz kriva.....	96
<b>Slika 4.4.2.</b> Srednja kriva zavisnosti koncentracija - vreme u serumu kunića nakon primene jedne oralne doze ambroksola od 30 mg.....	97
<b>Slika 4.5.1.</b> Profil brzine rastvaranja ambroksola sa vremenom iz tableta na pH 1.2 i 37.0±0.5 °C.....	101



<b>Slika 4.5.2.</b> Profil brzine rastvaranja ambroksola sa vremenom iz tableta na pH 4.5 i $37.0 \pm 0.5$ °C.....	101
<b>Slika 4.5.3.</b> Profil brzine rastvaranja ambroksola sa vremenom iz tableta na pH 6.8 i $37.0 \pm 0.5$ °C.....	101
<b>Slika 4.5.4.</b> Uporedni prikaz profila brzine rastvaranja ambroksola sa vremenom iz tableta pri različitim pH vrednostima na $37.0 \pm 0.5$ °C.....	102
<b><u>Poglavlje 5</u></b>	
<b>Slika 5.1.1.1.</b> Precipitacija proteina.....	106
<b>Slika 5.1.3.1.</b> Vrste kopolimerizovanih adsorbenasa (Oasis®, Waters); HLB - neutralni; MCX - katjonski jonoizmenjivač; MAX - anjonski jonoizmenjivač.....	111
<b>Slika 5.1.3.2.</b> Osnovne faze SPE ekstrakcije; kondicioniranje ( <i>conditioning</i> ), nanošenje uzorka ( <i>sample addition</i> ), pranje ( <i>washing</i> ) i eluiranje analita ( <i>elution</i> ).....	112
<b>Slika 5.2.1.</b> Dobro hromatografsko razdvajanje dva analita.....	115
<b>Slika 5.2.2.</b> Grafički prikaz van Deemter-ove jednačine.....	118
<b>Slika 5.4.2.1.</b> Grafički prikaz linearnosti i opsega analitičke metode; response – odgovor, amount - koncentracija, intercept - odsečak, slope - nagib, sensitivity – osetljivost, LOD - limit detekcije, LOQ - limit kvantifikacije.....	131
<b>Slika 5.4.3.1.</b> Limit detekcije i limit kvantifikacije preko odnosa signal/šum.....	132

# SADRŽAJ

---

UVOD.....	1
1.1. AMBROKSOL HIDROHLORID.....	1
1.2. VALIDACIJA BIOANALITIČKIH METODA.....	5
1.3. UHPLC-MS/MS.....	9
1.3.1. Tečna hromatografija (HPLC).....	9
1.3.2. Ultra brza tečna hromatografija (UHPLC).....	14
1.3.3. Masena spektrometrija.....	14
1.4. PRIPREMA BIOLOŠKIH UZORAKA.....	26
1.5. OSNOVNI FARMAKOKINETIČKI PARAMETRI.....	28
1.6. TESTOVI BRZINE RASTVARANJA AKTIVNE SUPSTANCE IZ TABLETA.....	34
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	37
2.1. Predmet i plan istraživanja.....	37
2.2. Ciljevi istraživanja.....	38
3. EKSPERIMENTALNI DEO .....	40
3.1. Hemikalije i reagensi.....	40
3.2. Pribor.....	41
3.3. Priprema osnovnih rastvora, radnih rastvora i opterećenih seruma.....	41
3.4. Metode za pripremu bioloških uzoraka.....	42
3.4.1. Precipitacija proteina.....	43
3.4.2. Tečno-tečna ekstrakcija.....	43
3.4.3. Tečno-čvrsta ekstrakcija.....	43
3.5. Metode hromatografskog i spektrofotometrijskog određivanja.....	47
3.5.1. HPLC/PDA.....	47
3.5.2. UHPLC- MS/MS.....	48
3.6. Validacioni parametri.....	49
3.7. Eksperiment na animalnom modelu kunića - <i>in vivo</i> eksperiment.....	50
3.8. Disolucioni test ambroksola iz tablete - <i>in vitro</i> eksperiment .....	50
3.9. Farmakokinetička i statistička analiza podataka.....	51
4. REZULTATI .....	52
4.1. REZULTATI HROMATOGRFSKIH I SPEKTROFOTOMETRIJSKIH PARAMETARA.....	52
4.1.1. HPLC/PDA.....	52
4.1.2. UHPLC.....	55
4.1.3. MS/MS spektrometrija.....	57
4.2. REZULTATI PRIPREME UZORAKA SERUMA.....	62
4.3. REZULTATI ODREĐIVANJA VALIDACIONIH PARAMETARA.....	65
4.3.1. Kalibracione krive.....	65
4.3.2. Opseg linearnosti.....	75
4.3.3. Limit detekcije .....	76

4.3.4. Limit kvantifikacije.....	77
4.3.5. Tačnost i preciznost metode.....	78
4.3.6. Specifičnost / selektivnost.....	83
4.3.7. Stabilnost bioloških uzoraka.....	84
4.3.8. Ekstrakcioni prinos.....	89
4.3.9. <i>Carry-over</i> efekat.....	89
4.3.10. Robustnost metode.....	90
4.4. REZULTATI FARMAKOKINETIČKE STUDIJE NA KUNIĆIMA.....	93
4.5. REZULTATI TESTA BRZINE RASTVARANJA AMBROKSOLA IZ TABLETA.....	97
5. DISKUSIJA .....	103
5.1. PRIPREMA UZORAKA SERUMA.....	103
5.1.1. Precipitacija proteina.....	105
5.1.2. Tečno-tečna ekstrakcija.....	106
5.1.3. Tečno-čvrsta ekstrakcija.....	109
5.2. OPTIMIZACIJA UHPLC SISTEMA.....	114
5.3. OPTIMIZACIJA MS/MS DETEKTORA.....	123
5.4. VALIDACIONI PARAMETRI.....	126
5.4.1. Kalibracione krive i linearnost.....	126
5.4.2. Opseg merenja.....	130
5.4.3. Granica detekcije i granica kvantifikacije.....	131
5.4.4. Tačnost i preciznost metode.....	134
5.4.5. Specifičnost / selektivnost.....	137
5.4.6. Testovi stabilnosti bioloških uzoraka.....	140
5.4.7. Ekstrakcioni prinos.....	142
5.4.8. <i>Carry-over</i> efekat.....	143
5.4.9. Robustnost metode.....	143
5.4.10. Test podobnosti sistema.....	145
5.5. FARMAKOKINETIČKA STUDIJA NA KUNIĆIMA.....	146
5.6. TEST BRZINE RASTVARANJA AMBROKSOLA IZ TABLETA.....	148
6. ZAKLJUČAK.....	151
7. LITERATURA .....	154
PRILOZI.....	168
BIOGRAFIJA AUTORA.....	178

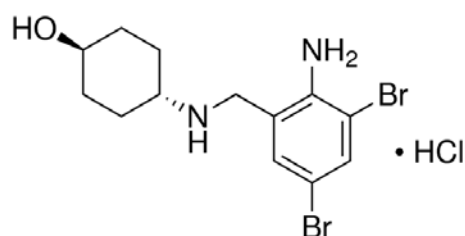
## UVOD

### 1.1. AMBROKSOL HIDROHLORID

*IUPAC*: trans-4-[(2-amino-3,5-dibromobenzil)amino]ciklo-heksanol hidrohlorid

*Hemijski naziv*: Cikloheksanol, 4-(N-(2-amino-3,5-dibromobenzil)amino)-, hidrohlorid

*Hemijska formula*:  $C_{13}H_{18}Br_2N_2O \cdot HCl$



*Slika 1.1.1. Ambroksol hidrohlorid*

*CAS#*: 23828-92-4

*Molekulska masa*: 414.564

*Sinonimi*: FLUIXOL (2-amino-3,5-dibromo-N-(trans-4-hidroksicikloheksil)benzilamin); ABRAMEN; BLUIBRON; (trans-4-[(2-amino-3,5-dibromobenzil)amino]cikloheksanol hidrohlorid); Ankisol; AMBRIL; mucolar; Antobron; Stas-Hustenloser; Ambroksol HCl; DURAMUCAL (cis-4-((2-Amino-3,5-dibromobenzil)amino)cikloheksanol hidrohlorid); FRENOPECT; Ambron;

*Izgled i fizičko stanje*: beli ili žućkasti kristalni prašak

*Rastvorljivost*: delimično u vodi, dobro u metanolu i nerastvoran u metilen hloridu

*Tačka topljenja*: 235 - 240°C

*Tačka ključanja*: 468.6°C na 760 mmHg

*Teperatura paljenja*: 237.2°C

*Uslovi čuvanja*: 2-8°C

*LogP*: 4.96 [1, 2].

Ambroksol hidrohlorid je polusintetski derivat organskog jedinjenja vasicina iz grma *Adhatoda vasica* široko rasprostranjenog u Aziji. Predstavlja aktivni N-desmetil metabolit mukolitika bromoheksina od koga se razlikuje odsustvom metil grupe i supstitucijom sa hidroksilnom grupom u trans para položaju cikloheksanskog prstena [3]. Više od trideset godina (od 1973.god.) uspešno se primenjuje u mukolitičkoj terapiji respiratornih bolesti. Slabo se rastvara u vodi, stoga predstavlja značajan izazov za formulacije. Proizvodi u različitim farmaceutskim formulacijama uključujući intravenske i intramuskularne rastvore, sirupe, granule, tablete supozitorije. Idealan je kandidat za kontrolisano oslobađanje doziranog oblika, što bi rezultiralo u produženoj kliničkoj efikasnosti, smanjenoj učestalosti doziranja i smanjenim nuspojavama [4].

Iako precizan mehanizam dejstva još nije u potpunosti razjašnjen, poznat je sekretolitični i sekretomotorni efekat ispitan u različitim studijama na životinjama i ljudima. Veruje se da je transport mukusa poboljšan smanjenjem viskoziteta i aktivacijom cilijarnog epitela [5,6]. Rezultati prekliničkih ispitivanja ukazuju da ambroksol povećava količinu serozne bronhijalne sekrecije i smanjuje mogućnost infekcije [7]. Predpostavlja se da ambroksol smanjuje hiper-bronhijalnu aktivnost povećanjem protoka lipofosfatidilholina i/ili modifikacijom epitelijalne sekrecije pri ujednačenom i kontinuiranom doziranju leka. Ambroksol stimuliše sintezu alveolarnih surfaktanata, površinski aktivnih lipoproteinskih kompleksa (dipalmitoil fosfatidilholin, DPPC) delujući direktno na pneumocite tipa 2 u alveolama i Klara ćelijama u regionu malih disajnih puteva [8,9]. Aktivacija kiselih mukopolisaharid-razgrađujućih enzima dovodi do snižavanja površinskog napona alveolarne tečnosti i viskoznosti sputuma čime se olakšava njegov transport i izbacivanje [10]. Ambroksol pomaže formaciju i izbacivanje površinski aktivnog materijala u alveolarnom i bronhijalnom regionu pluća dece i odraslih. Ovi efekti su bili prikazani u ćelijskim kulturama i u *in vivo* uslovima različitih vrsta [11,12,13].

Farmakologija ambroksola je veoma zanimljiva zbog toga što je do sada poznato najmanje šest mehanizama njegovog dejstva i to: da olakšava klirens i izbacivanje mukusa [14,15], olakšava produktivni kašalj [16,17], ima antioksidansno [18-26], antiinflamatorno [27-32], analgetičko [33], lokalno anestetičko [34], antivirusno [35] i antibakterijsko dejstvo [36-39]. Ambroksol se primenjuje u

mukolitičkoj terapiji kod akutnih i hroničnih bronhopulmonalnih bolesti povezanih sa povećanim stvaranjem i poremećajem formiranja i transporta mukusa [40- 45].

Povećanje sekrecije u respiratornom traktu, produkcija surfaktanta u plućima i stimulacija cilijarne aktivnosti, dovode do poboljšanog protoka mukusa i njegovog transporta. Pojačana sekrecija tečnosti i mukocilijarni klirens olakšavaju iskašljavanje [46]. Lokalno anestetičko dejstvo ambroksola posmatrano na modelu oka kunića tumači se sposobnošću blokiranja natrijumovih kanala [47]. *In vivo* studije su pokazale da ambroksol blokira klonirane nervne natrijumske kanale, a ovo vezivanje je reverzibilno i zavisno od koncentracije [48, 49]. Pokazalo se da ambroksol *in vivo* značajno smanjuje oslobađanje citokina iz krvi kao i mononuklearnih i polimorfonuklearnih ćelija vezanih za tkiva [50]. Ova farmakološka svojstva su u skladu sa pratećim zapažanjima u ispitivanjima kliničke efikasnosti za lečenje simptoma gornjih disajnih puteva ambroksolom, čime dolazi do ublažavanja bola i nelagodnosti vezanih za bol u regionu uho-nos-traheja [51, 52]. Ambroksol se često kombinuje sa antibioticima (amoksicilin, doksiciklin, eritromicin itd.), čak i u jednoj tableti ili sirupu, jer se tako povećava koncentracija antibiotika u bronhopulmonalnom sekretu i sputumu [53-57].

Studije su pokazale i terapeutsku efikasnost ambroksola u tretmanu respiratornog distress sindroma (RSD) kod dece [58-61], kao i Gošerove-ove autoimune bolesti [62].

Farmakokinetika ambroksola kod ljudi je dobro poznata. Posle oralne primene ambroksol se brzo i potpuno resorbuje, a najveća koncentracija u plazmi ( $C_{max}$ ) dostiže se u roku od 1 do 2.5 sata nakon primene tableta sa trenutnim oslobađanjem. Kod tableta sa odloženim delovanjem javlja se odložena resorpcija ( $T_{max} = 6.5 \pm 2.2$  h) i bioraspložitost od 95% u odnosu na dozu od 30 mg dva puta dnevno trenutno oslobađanog leka. Vezuje se za proteine plazme u visokom procentu (oko 70-80%). Na bioraspložitost ambroksola u krvi ne utiče prisustvo hrane. Distribucija ambroksola iz krvi u tkiva je brza, pri čemu se najveća koncentracija dostiže u plućima [63]. Volumen distribucije nakon oralne primene se procenjuje na 552 L i renalnim klirensom 53 mL/min [64]. Oko 30% date oralne doze eliminiše se metabolizmom prvog prolaza. Ambroksol se metaboliše uglavnom mikrozomalnim enzimima jetre procesima glukuronidacije i razgradnjom do dibromantranilne kiseline u prisustvu CYP3A4. Ambroksol se eliminiše sa poluvremenom eliminacije do 10

časova [65]. Prolazi placentu, a takođe dospeva i u cerebrospinalnu tečnost i mleko dojilja. Zbirno poluvreme eliminacije za ambroksol i njegove metabolite je 22 sata. Metaboliti nastali u jetri se u procentu od 90% izlučuju urinom, dok se nepromenjeni ambroksol izlučuje urinom u frakciji manjoj od 10%. Kod ozbiljnih bolesti bubrega i jetre može se javiti zadržavanje i akumulacija ambroksola u organizmu i umanjeni klirens za 20 – 40% [13].

Toksičnost. Studije *in vivo* su pokazale da je ambroksol nisko toksičan za pacove, miševe i kuniće. Nije teratogen, mutagen i kancerogen [66-68]. Srednja letalna doza ambroksola za pacova nakon jedne oralne doze iznosi: LD<sub>50</sub> – 8.9 g/kg [66]. Pri upotrebi leka mogu se javiti povremeno gastrointestinalni poremećaji (muka, povraćanje, bol u stomaku), a veoma retko reakcije preosetljivosti (svrab kože, oticanje lica, gubitak daha, svrab, groznica) i ozbiljne alergijske reakcije do šoka kao što su Stiven-Džonson-ov sindrom (povišena telesna temperatura i pojava osipa sa plikovima na koži i sluznicama) i Lyel-ov sindrom (oboljenje po život opasno, gde se javljaju plikovi teškog stepena koji podsećaju na opekotine). Do sada nisu zabeleženi ozbiljni slučajevi trovanja. Može biti primećena privremena uznemirenost i dijareja. U ekstremnom predoziranju javlja se pojačana salivacija, povraćanje i pad krvnog pritiska sa cirkulatornim poremećajima [13].

Analitika. U literaturi je opisan veliki broj hromatografskih i nehromatografskih metoda za određivanje ambroksola u najrazličitim uzorcima. Zabeležena su ispitivanja ambroksola u farmaceutskim preparatima (tablete, sirup, prašak) i bološkim uzorcima humanog i životinjskog porekla. Ambroksol je ispitivan u *in vitro* i *in vivo* studijama bioekvivalence, farmakokinetičkim studijama i testovima brzine rastvaranja različitih formulacija leka samostalno i u kombinaciji sa drugim lekovima [69-77]. Od nehromatografskih metoda najzastupljenija je primena UV/VIS spektrofotometrije [78-80], elektrohemijske metode (potencimetrija i amperometrija) [81-83] i kapilarna elektroforeza [69, 84-86], a od hromatografskih HPLC metode [70-73, 87-95], tankoslojna [96] i gasna hromatografija [97,98]. U novije vreme ambroksol se određuje savremenim, visokoosetljivim i specifičnim LC-MS i LC-MS/MS metodama u veoma niskim koncentracijama [74, 75, 99-102].

Pregledom publikovanih radova iz oblasti LC-MS i LC-MS/MS za određivanje ambroksola uočene su mogućnosti za unapređenje ovih metoda što je i postavljeno kao jedan od osnovnih naučno-istraživačkih ciljeva ove teze. Cilj

istraživanja bio je razvoj nove metode za analizu ambroksola primenom ultra-brze tečne hromatografije sa tandem masenim detektorom (UHPLC-MS/MS) i prikaz njene primene. Analitička metoda je razvijena i validirana u skladu sa savremenim standardima koji se primenjuju u oblasti farmacije. Validacijom analitičke metode dobijeni su podaci o njenoj tačnosti i preciznosti, o odnosu između koncentracije ambroksola i odgovora aparata, o uticaju interferencija iz matriksa uzorka na MS/MS analizu i o najmanjim koncentracijama koje se mogu identifikovati i kvantifikovati tom metodom. Validacijom analitičke metode dokazano je da su dobijeni rezultati merenja tačni i validni u skladu sa propisanim kriterijumima. Nova analitička metoda je proverena u *in vitro* i *in vivo* eksperimentima. U *in vitro* uslovima urađeni su testovi brzine rastvaranja ambroksola iz tableta prema odgovarajućim farmakopejama, a *in vivo* farmakokinetička studija tableta ambroksola na kunićima. Validirana metoda bi mogla naći značajnu primenu u farmaceutskoj industriji.

## 1.2. VALIDACIJA BIOANALITIČKIH METODA

Validacija ili vrednovanje analitičkih metode je postupak kojim se utvrđuje koji od parametara kvaliteta metode ispunjavaju uslove i garantuju pouzdanost tokom rutinske primene metode. Validacija se ostvaruje mnogobrojnim analitičkim merenjima i testiranjima. Dobijeni rezultati se dokumentuju laboratorijskim protokolima i izveštajma u elektronskoj i papirnoj formi, i predstavljaju propratnu dokumentaciju svake validirane metode. Akreditovane laboratorije vrše validacije u skladu sa državnim propisima ili propisima drugih regulatornih agencija. Dobro definisani i dokumentovani validacioni protokoli ne predstavljaju samo dokaz regulatorne usklađenosti, već i dokaz da su analitički sistemi i metode pogodni i pouzdani za namensku upotrebu. Validacioni protokoli olakšavaju i transfer metoda sa jednog na drugi analitički sistem. Godine 1987. god., američka Agencija za hranu i lekove (FDA) je prva objavila specifikacije analitičkih metoda u skladu sa zakonskim regulativama, koje su navedene u aktuelnom izdanju američke farmakopeje (USP).

Najveći broj LC metoda se danas primenjuje u farmaceutskoj industriji, pa će iz tog razloga ovde biti opisane samo validacione procedure za te namene. I u drugim akreditovanim oblastima (industrija, hrana, veterina) su validacione procedure za LC metode dobro definisane i regulatorno usklađene. Npr. laboratorije monitoringa



životne sredine se usklađuju sa propisima Agencije za zaštitu životne sredine (EPA), dok neke druge sa direktivama Međunarodne organizacije za standardizaciju (ISO). U industrijskim procesima validacija LC metoda se vrši u skladu sa regulativama Dobre proizvođačke prakse (GMP) i Globalnim sistemom za standardizaciju ISO 9000 (*Global Management Standards*) i drugim ISO standardima. Ostale neakreditovane industrijske i akademske laboratorije, iako ne podležu zakonskoj regulativi, koriste GLP (Principi dobre laboratorijske prakse) i ICH, FDA i druge propisane postupke za validaciju i razvijanje LC metoda visokog kvaliteta u cilju dobijanja tačnih i pouzdanih rezultata. Validacije analitičkih metoda i drugih laboratorijskih postupaka za farmaceutske svrhe opisane su u ogovarajućim farmakopejama (USP, BP, Ph Eur) [103].

Smernice i vodiči USP (*US Pharmacopeia, Chapter 1225, Validation of Compendial Methods*), FDA (*Food and Drug Administration*), i ICH (*International Conference on Harmonization Guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*), EPA i druge za validaciju analitičkih postupaka, tehnika ili tehnologija, koje se koristi u akreditovanim laboratorijima su u većem delu teksta slične i mogu se primeniti na sve analitičke procedure [104-107].

Validacija može biti delimična ili potpuna i obuhvata 4 faze: 1) validaciju softvera, 2) kvalifikaciju ili validaciju analitičkih instrumenata, 3) validaciju metode, i 4) validaciju pogodnosti sistema. Potpuni proces validacije otpočinje potvrđivanjem softvera i kvalifikacijom instrumenta, zatim se ispituje i razvija analitička metoda koja se validira kvalifikovanim instrumentom, i na kraju potvrđuju performanse usvojene metode testom pogodnosti sistema. Svi navedeni postupci su od podjednake važnosti u postupku validacije i optimizacije analitičke metode.

U farmaceutskim istraživanjima vrši se validacija nekoliko tipova analitičkih metoda u zavisnosti od namene i svrhe. Razlikuju se metode za određivanje aktivnih komponenti (AK), pomoćnih supstanci (PS), nečistoća, brzine rastvaranja i bioanalitičke metode (BM). Metode za određivanje aktivnih komponenti odnose se na merenje koncentracije AK u lekovima i praškastim supstancama, kao i njihovo međusobno upoređivanje (određivanje varijabilnosti u različitim serijama istog leka). Testovi nečistoća određuju moguće prisutne sporedne supstance u leku koje potiču od sirovina, procesa proizvodnje i/ili raspadanja tokom čuvanja ili procesuiranja leka. Testovi stabilnosti kvantifikuju proizvode raspadanja AK pod određenim uslovima

(npr. sobna ili povišena temperatura), dok disolucioni testovi mere koncentraciju AK u rastvorima koji simuliraju otpuštanje AK iz leka u fiziološkim uslovima odnosno organizmu (npr. želudac, creva). Navedene metode se odnose na određivanje AK u lekovima (tablete, praškovi), dok se bioanalitičke metode odnose na određivanje analita u biološkom materijalu. Bioanalitičkim metodama se najčešće određuju lekovi i njihovi metaboliti u biološkim uzorcima kao što su plazma ili urin, ali i tkivima humanog i životinjskog porekla. Primenuju se u kliničkoj farmakologiji, toksikologiji, ispitivanju bioraspoloživosti leka, biekvivalencama i drugim studijama koje zahtevaju farmakokinetičku evaluaciju (procenu) leka u biološkom materijalu. Kao i kod drugih analitičkih metoda i bioanalitičke metode u akreditovanim laboratorijama moraju biti validirane kako bi se obezbedila relevantnost rezultata. Sve metode analize, bilo određivanja gotovih proizvoda, sirovina, aktivnih supstanci lekova ili bioanalitičke metode imaju svoje specifičnosti u procesu razvoja i validacije [103].

Validacija bioanalitičkih metoda je dodatno usložnjena prisustvom matriksa uzorka (veliki broj interferirajućih supstanci iz farmaceutskih formulacija ili biološkog materijala), malim količinama uzorka i analita, prisustvom metabolita i primenom složenih instrumentalnih tehnika. Postizanje visoke osjetljivosti i selektivnosti ovih metoda je od velike važnosti za predklinička i klinička farmakokinetička ispitivanja lekova. Kao i kod drugih metoda, karakteristike bioanalitičkih metoda se moraju dokazati postupcima validacije i dokumentovati, čime se garantuje njihova pouzdanost u daljoj primeni. Validacija bioanalitičkih metoda obično uključuje HPLC sistem sa tandem- masenim detektorom (LC-MS/MS). Osetljive i selektivne LC-MS/MS metode omogućuju kvantifikaciju analita sa prihvatljivom preciznošću i tačnošću pri koncentracijama nižim nego kod većine drugih HPLC detektora. Tipične kratke submikrometerske kolone (30-50 mm x 2.1 mm i.d., veličina čestica  $\leq 2 \mu\text{m}$ ) se koriste za brzo razdvajanje kod velikog broja uzoraka generisanih kliničkim studijama. Razdvajanja se ostvaruju u izokratskom ili gradijent modu za vreme trajanja analize  $< 5$  min. Priprema uzorka, kako bi se uklonio višak proteina i drugih potencijalnih interferenci može zahtevati mnogo napora i vremena skoro podjednako kao razvoj same LC metode. Automatizacija pripreme i analize uzoraka su uobičajene kako bi se skratilo vreme analiza.

Postavljenje bioanalitičke metoda može se podeliti na tri dela: 1) priprema referentnih standarda, 2) razvoj i validacija metode i 3) praktična primena validirane metode u analizi lekova. Parametri koji se ispituju u validaciji bioanalitičkih metoda su: tačnost, preciznost (ponovljivost - eng. *repeatability*, međupreciznost - eng. *intermediate precision*, reproducibilnost/obnovljivost - eng. *reproducibility*), selektivnost/specifičnost, limit detekcije, limit kvantifikacije, linearnost, opseg i robustnost (postojanost).

Određivanje parametara validacije podeljeno je u nekoliko faza:

- Selektivnost/specifičnost
- Kalibracione krive standarda i kalibratora (LOD, LOQ, linearnost, opseg), i
- Tačnost, preciznost i prinos
- Stabilnost [104, 106].

### **Kontrola kvaliteta i garancija kvaliteta bioanalitičke metode (QA/QC)**

Validacija bioanalitičkih metoda vrši se u cilju dobijanja pouzdanih i tačnih rezultata merenja, i predstavlja garanciju kvaliteta primenjenog analitičkog postupka. Izrazi *kontrola kvaliteta* (eng. *Quality Control*, QC) i *garancija kvaliteta* (eng. *Quality Assurance*, QA) se često koriste kao sinonimi. Međutim, u propisima sistema kvaliteta, ova dva termina imaju različita značenja i funkcije. Garancija kvaliteta se odnosi na kvalitet procesa proizvodnje odnosno analitički postupak, dok se kontrola kvaliteta odnosi na kvalitet proizvoda ili kvalitet dobijenih rezultata merenja primenjenom analitičkom metodom. Bez obzira na funkciju, oba kvaliteta čine celinu u proceni kvaliteta jednog procesa/metode i od suštinske su važnosti za dobijanje tačnih i pouzdanih rezultata koji su u skladu sa odgovarajućim propisima.

*Kontrola kvaliteta* (QC) je aktivnost kojom se određuje prihvatljivost ili neprihvatljivost rezultata merenja, a određuje se upoređivanjem dobijenih rezultata sa kriterijumima vodiča za validaciju bioanalitičkih metoda. Kontrola se izvodi pomoću kontrolnih uzoraka (QCs). Prema FDA smernicama najmanje tri koncentraciona nivoa QCs u duplikatu treba uključiti u svaku analizu: jedan od tri puta na LLOQ (nizak QC), jedan srednji (srednji QC) i jedan visoki (visoki QC) blizak gornjoj granici opsega očekivanih koncentracija merenja. QCs pružaju osnovu prihvatanja ili odbacivanja rezultata merenja. Najmanje 67% od ukupno svih QCs merenja na svim

koncentracionim novoima (npr. najmanje četiri od šest) treba da bude u garnicama  $\pm 15\%$  od svojih nominalnih (teorijskih) vrednosti. Na svakom koncentracionom nivou, najmanje 50% QCs trebao da bude u garnicama  $\pm 15\%$  od svojih nominalnih koncentracija. Minimalan broj QCs je najmanje 5% od broja nepoznatih uzoraka ili ukupno šest QCs, u zavisnosti od toga šta je veće. Preporučuje se da se kalibracioni standardi (kalibratori) i QCs pripremaju od odvojenih opterećenih osnovnih rastvora, ali mogu i iz istog ukoliko su potvrđene stabilnost i tačnost merenja. Jedan izvor praznog uzorka (matriksa) se može koristiti, pod uslovom da je potvrđeno odsustvo uticaja matriks efekata na ekstrakcioni prinos i detekciju. Očekuje se barem jedna demonstracija preciznosti i tačnosti kalibratora i QCs pripremljenih od odvojenih osnovnih rastvora. Kriterijum za prihvatanje/odbacivanje kalibratora i QCs treba da se zasniva na teorijskim vrednostima koncentracije analita.

Optimizacija instrumenata vrši se odvojenim opterećenim uzorcima nezavisno od ostalih merenja, a rezultati prikazuju u validacionim izveštajima metode. Kalibracione krive i QCs treba da budu uključeni u svako analitičko merenje (eng. *run*). Analitički run treba da se sastoji od QCs, kalibratora, i jedne ili više serija analiziranih uzoraka, pri čemu se QCs injektuju najmanje dva puta na svim QC nivoima (npr. LLOQ, srednji, visoki).

*Garanciju kvaliteta* (QA) se ispituje prema procedurama i propisanim radnih uputstava laboratorije, koja moraju biti u skladu sa propisima. Na početku procesa validacije, QA mogu dati smernice za sistematizaciju i pisanje validacionih protokola i drugih dokumenata validacije, a tokom analitičke faze, QA-a daje garanciju da se primenjuje ispravna metoda ili postupak, i da je kvaliteta rada u saglasnosti sa laboratorijskim i zakonskim smericama i propisima [103].

### 1.3. UPHLC-MS/MS

#### 1.3.1. Tečna hromatografija (HPLC)

Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC) je separaciona analitička tehnika koja se koristi za razdvajanje istih, sličnih i/ili različitih supstanci iz analizirane smeše. Razdvajanje se ostvaruje na osnovu različitih raspodela ispitivanih supstanci između dve faze - pokretne (mobilne) i nepokretne (stacionarne). Mobilna faza je

tečnost, dok je stacionarna faza čvrsta ili tečna fiksirana na analitičkoj koloni ili nekoj drugoj čvrstoj podlozi. Tečnom hromatografijom se mogu kvalitativno i kvantitativno, a prvenstveno kvantitativno, analizirati manje ili više složene smeše jedinjenja rastvorenih u mobilnoj fazi [108].

Razdvajanje se dešava usled različitih afiniteta komponenata smeše između pokretne i nepokretne faze. Analiti nošeni strujom mobilne faze se usled različitih fizičko-hemijskih osobina se različitom jačinom vezuju za stacionarnu fazu i različito zadržavaju na hromatografskoj koloni. Analiti koji imaju veći afinitet prema stacionarnoj fazi (manji prema mobilnoj fazi) duže se zadržavaju i sporije prolaze kroz kolonu i obrnuto. Kontinualnim protokom mobilne faze analiti se sukcesivno eluiraju sa kolone i kvalitativno razdvajaju. Razdvojeni analiti različito vreme putuju kroz kolonu i u različito vreme dospevaju do detektora gde se registruju u vidu električnog signala. Električni signal se preko kompjutera beleže kao hromatografski pik. Površina hromatografskog pika je direktno proporcionalan koncentraciji analita. Svaki hromatografski pik predstavlja odgovor detektora za specifični analit, a skup pikova svih razdvojenih analita predstavlja LC hromatogram. Hromatogram otpočinje sa pikom analita koji najbrže prođe kroz kolonu, a završava pikom analita sa najdužom retencijom na koloni. Cilj svake LC analize je postizanje uskih i visokih pikova koji su pokazatelj dobrog i efikasnog hromatografskog razdvajanja.

Nizom savremenih tehničkih inovacija omogućeno je da se sa različitim parovima pokretna/nepokretna faza LC analize vrše jednim jedinstvenim aparatom, koji se naziva tečni hromatograf visokih performansi tj. HPLC (eng. *High Performance Liquid Chromatography*). HPLC omogućuje kontinualnu izmenu hemijskog sastava pokretne faze u cilju poboljšanja razdvajanja, povezivanje sa raznim tipovima detektora (*diode-array*, UV/VIS, fluorescentni, maseni spektrometar i dr.) i automatizaciju postupka od uzimanja uzorka do detektovanja hromatograma i kvalitativne i kvantitativne obrade podataka odnosno identifikacije komponenti i određivanje njihove koncentracije. HPLC predstavlja tečnu hromatografsku tehniku gde se tečnost kroz kolonu potiskuje pod pritiskom od 400 - 600 bara. Sam naziv potiče od poboljšanja performansi standardnih aparata za tečnu hromatografiju. Savremeni HPLC modeli omogućuju analize vrlo malih količina uzorka u količini rastvarača od nekoliko mililitara. Analize su tačnije, praktičnije i ekonomičnije u

odnosu na klasično eluiranje analita kroz vertikalnu hromatografsku kolonu [109,110].

Delovi tečnog hromatografa su: 1) rezervoar za tečnost, 2) pumpa, 3) injektor, 4) kolona, 5) detektori, 6) integrator sa pisačem za prikupljanje i obradu signala sa detektora i 7) kolektor otpada [111,112].

### Osnovni hromatografski parametri

#### Koeficijent raspodele (K)

Raspodela molekula analita između dve faze određena je zakonom raspodele:

$$K = C_s / C_m$$

gde je K - koeficijent raspodele,  $C_s$  - koncentracije analita u stacionarnoj fazi,  $C_m$  - koncentracije analita u mobilnoj fazi. Molekuli analita prelaze brzo iz jedne u drugu fazu uspostavljajući dinamičku ravnotežu raspodele između dve faze, tako je odnos koncentracija analita u dve faze određen gornjim zakonom.

Dok je u mobilnoj fazi, molekul je nošen brzinom kretanja mobilne faze, dok se za vreme nalaženja u stacionarnoj fazi molekul neće kretati. Zato se komponente sa većim K sporije kreću kroz stacionarnu fazu u odnosu na komponente čiji je K manji. U idealnom slučaju koeficijent raspodele je konstantan u širem opsegu koncentracija. U takvom slučaju, krive koje pokazuju raspodelu analita u dve faze u zavisnosti od koncentracija su linearne (linearna hromatografija). U praktičnom radu linearnost je uglavnom prisutna pri niskim koncentracijama analita, dok se pri višim koncentracijama vrlo često javljaju odstupanja.

#### Faktor kapaciteta ( $k'$ )

U hromatografiji se za opisivanje raspodele analita između dve faze koristi i faktor kapaciteta, definisan kao odnos količina (molova) analita u dve faze:

$$k' = n_s / n_m = C_s V_s / C_m V_m$$

tako da je

$$k' = K V_s / V_m$$

gde su  $V_s$  - zapremina stacionarne faze,  $V_m$  - zapremina mobilne faze. Faktor kapaciteta zavisi od izbora vrste rastvarača, kao i promene odnosa njihovih zapremina u sastavu mobilne faze.

Faktor selektivnosti ( $\alpha$ )

Izražava odnos koeficijenata raspodele ili faktora kapaciteta dve komponente npr. komponente A i B:

$$\alpha = K_B / K_A = k'_B / k'_A$$

Razdvajanje komponenti smeše će se lakše ostvariti ako je  $\alpha$  vrednost veća. Obično se uzima da je faktor selektivnosti veći od jedinice ( $\alpha > 1$ ), tako da se brojilac odnosi na komponentu koja ima veći K. Selektivnost je mera uzajamne raspodele komponenata smeše u toku hromatografskog procesa i mera za pokretljivost ovih komponenata. Povećanjem faktora kapaciteta  $k'_B$  povećava se razdvajanje ali se povećava i vreme trajanja analize, pa se velike vrednosti faktora  $k'_B$  izbegavaju ( $> 10$ ). Optimalne se smatraju vrednosti između 2 i 5.

Retenciono vreme ( $t_R$ )

Retenciono vreme ili vreme zadržavanja  $t_R$ , je vreme koje prođe od unošenja analita u kolonu do momenta njenog izlaženja iz kolone. Retenciono vreme zavisi od čitavog niza faktora kao što su fizičko - hemijske osobine mobilne faze (polarnost, viskozitet), količina stacionarne faze, temperatura kolone, brzina protoka mobilne faze, dimenzije kolone, vrsta, krupnoća, oblik čestica stacionarne faze i način pakovanja kolone [113]. Pri konstantnim eksperimentalnim uslovima,  $t_R$  direktno zavisi od karakteristika analita (polarnost, rastvorljivost), pa se zbog toga može koristiti za hromatografsku identifikaciju [114].

Teorijski podovi

Jedan od načina opisivanja procesa razdvajanja analita u hromatografskoj koloni je teorija destilacije. Po ovoj teoriji hromatografska kolona je podeljena na uske horizontalne slojeve koji se nazvaju teorijski odsecci ili podovi, po analogiji sa konceptom teorije frakcione destilacije. Slično destilacionim procesima, hromatografski procesi se mogu posmatrati kao niz ravnoteža koje se uspostavljaju jedna za drugom. Kretanje analita i rastvarača posmatra se kao serija uzastopnih prenosa iz jednog odsečka kolone u drugi, gde se u svakom odsečku kolone uspostavlja ravnoteža raspodele analita između stacionarne i mobilne faze. Deo stacionarne faze u jednoj koloni koji odgovara jednom teorijskom podu naziva se

visina ekvivalentna teorijskom podu (HETP). Ovo je važna veličina, posebno u primeni hromatografske metode u praksi. Visina ekvivalentna teorijskom podu se često označava kao H ili h, i može da se dobije deljenjem dužine kolone (L) sa brojem teoretskih podova (N):  $H = L / N$ .

#### Efikasnost kolone

Oblik hromatografskih pikova je merilo efikasnosti kolone, pa su kod efikasnih kolona hromatografski pikovi odvojeni i uzani. Efikanost kolone se povećava sa povećanjem broja uspostavljenih ravnoteža raspodele analita, odnosno sa brojem teorijskih podova, pa se kvantitativno efikasnost kolone može izraziti:

$$N = 16 (t_R / w)^2$$

gde je N - broj teoretskih podova, W - širina osnove pika, a  $t_R$  - retenciono vreme.

Broj N je merilo efikasnosti kolone i može se odrediti eksperimentalno iz snimljenih hromatograma.

#### Rezolucija

Rezolucija ili razdvojenost maksimuma dva uzastopna pika meri se preko *stepena razdvajanja* (R). Rezolucija je jedna od najboljih merila efikasnosti hromatografskog odvajanja dva analita. Što su hromatografski pikovi udaljeniji i uži, to je stepen razdvajanja dva analita veći. Ova veličina je merilo *selektivnosti stacionarne faze* i zavisi od odnosa koeficijena raspodele anlita A i B ( $\alpha = K_B/K_A$ ) kao i od efikasnosti kolone pod određenim uslovima. Rezolucija se može izraziti kao odnos udaljenosti maksimuma dva pika prema srednjoj širini pika:

$$R = t_{r,B} - t_{r,A} / (W_A + W_B) / 2$$

gde su  $W_A$  i  $W_B$  - širine pikova analita A i B izražene istim jedinicama kao i retenciona vremena  $t_{r,B}$  i  $t_{r,A}$ . Razdvajanje je bolje, što je selektivnost veća odnosno preklapanje hromatografskih pikova manje. Ako se dva pika istih površina posmatraju kao dve Gaussove krive, onda je za  $R = 1$  preklapanje 2.27 %, za  $R = 1.5$  preklapanje je 0.13 %, a za  $R = 2$  preklapanje 0.003 %. Kao kriterijum potpunog razdvajanja dva pike uzima se vrednost  $R = 1.5$  [113,114].



### 1.3.2. Ultra brza tečna hromatografija (UHPLC)

U tečnoj hromatografiji se više od četiri decenije smanjivanje čestica stacionarne faze uspešno koristilo za poboljšanje efikasnosti hromatografskog razdvajanja. Kod standardnih HPLC aparata, pozitivni uticaj ovog efekta dostigao je plato usled ograničenja u konstrukciji aparata i nemogućnosti pumpi da postignu pritiske veće od 400 bara. Međutim, uvođenjem nove UHPLC tehnologije (eng. *Ultra-High Pressure Liquid Chromatography*) sa upotrebom pumpi boljih performansi (održavaju pritisak do 1300 bari) i kolona sa submikrometarskim česticama (1.3 – 2.1  $\mu\text{m}$ ), ova ograničenja su prevaziđena i time stvorene nove, naprednije mogućnosti u oblasti tečne hromatografije.

UHPLC predstavlja najnoviji pravac tečne hromatografije pod visokim pritiskom do 1000 i više bara. UHPLC označava tečnu hromatografiju ultra visokih performansi koja donosi prednosti u brzini, rezoluciji i osetljivosti HPLC metoda. Razvila se prvenstveno za potrebe današnje farmaceutske industrije koja teži da smanji troškove i vreme analiza za razvoj novih lekova, a da u isto vreme zadrži kvalitet analize. Ovaj trend prihvaćen je i u drugim laboratorija tako da je UHPLC danas opšte prihvaćena tehnologija i široko primenjena u različitim oblastima nauke i tehnologije. UHPLC povećanjem brzine omogućuje veći broj analiza za kraće vreme, a time i veću produktivnost laboratorija. Jedna od najznačajnijih karakteristika ultra-brze tečne hromatografije je primena kolona sa veoma sitnim česticama (<2,5  $\mu\text{m}$ ) i malim dužinama (30-50 mm). Primena submikrometarskih kolona znatno skraćuje vreme trajanja analize, potrošnju organskih rastvarača i povećava efikasnost hromatografskog razdvajanja. Osnovni princip razdvajanja kod UHPLC tehnologije je isti kao kod klasičnih HPLC sistema [111].

### 1.3.3. Masena spektrometrija

Masena spektrometrija (MS) je analitička tehnika zasnovana na razdvajanju jonizovanih atoma ili molekula u gasovitoj fazi prema njihovom odnosu masenaelektrisanje,  $m/z$  [115]. Jonizacijom analita formiraju se karakteristični joni intaktnih atoma ili molekula, i/ili grupe jona koje predstavljaju fragmente jonizovanih molekula. Joni se razdvajaju pod dejstvom magnetnog i/ili električnog polja u

visokom vakuumu (tipično  $10^{-5}$  Pa) i grafički beleže u vidu masenog spektra kao relativni intenziteti odnosa  $m/z$  svakog jona sa vremenom. Mogućnost razdvajanja jonskih masa zavisi od samog instrumenta. Dobrom rezolucijom se smatra rezolucija manja od 1 atomske jedinice mase (u) [108, 116].

MS tehnika može dati više informacija o analiziranoj supstanci sa manjom količinom uzorka nego bilo koja druga analitička tehnika. Identifikacija molekula iz masenog spektra je mnogo olakša primenom savremenih kompjuterskih programa i baza podataka. Predstavlja najpouzdaniju analitičku tehniku za određivanje tačnih relativnih atomskih ( $A_r$ ) i molekulskih masa ( $M_r$ ). Nedostatak je razgradnja uzorka tokom analize i slaba ekonomičnost usled neophodnosti primene rastvarača i standarda izuzetno visoke čistoće. Prisustvo interferirajućih supstanci znatno utiče na izgled masenih spektara. Maseni spektri lošijeg izgleda dovode do pogrešanog zaključivanja i netačnih rezultata [117]. Tačna MS merenja imaju veliki značaj u određivanju strukture nepoznatih jedinjenja. Analiza molekulskih fragmenta omogućuje identifikaciju analita empirijski ili poređenjem sa publikovanim bibliotekama spektara ukoliko su snimljeni pod istim MS uslovima (otisak prsta). Selektivnost MS metoda može se povećati i alternativnim praćenjem odgovarajućih  $m/z$  vrednosti jona od interesa u tzv. selektovanom monitoring modu (SIM). U kvantitativnim i kvalitativnim MS merenjima široku primenu ima i multi reakcioni monitoring mod (MRM). Postoji i mogućnost kontrolisane fragmentacije, gde se izlazeći joni iz jednog masenog analizatora usmeravaju na fragmentaciju u sledeći analizator (MS/MS,  $MS^n$ ) čime se postiže visoka selektivnost i specifičnost metode. LC-MS/MS predstavlja jednu od vodećih visoko osetljivih analitičkih metoda koja omogućuje detekciju, identifikaciju i kvantifikaciju analiziranih jedinjenja kao i utvrđivanje nepoznatih struktura na osnovu puteva fragmentacije.

Veoma je širok opseg jedinjenja koja se mogu analizirati LC-MS/MS tehnikom, što je uslovalo njenu najraznovrsniju primenu. Koristi se za analizu lekova, pesticida, droga, aminokiselina, peptida, proteina, nukleinskih kiselina, ugljenih hidrata, azo - jedinjenja, steroida, oligonukleotida, šećera, ugljovodonika, antibiotika i metalo-organskih jedinjenja i raznih drugih organskih jedinjenja. Najpogodnija za analizu su jedinjenja srednje i visoke polarnosti sa relativnom molekulskom masom većom od 50 amu. Poboľšane performanse u pogledu brzine, osetljivosti i rezolucije omogućile su primenu ove metode u najrazličitijim oblastima kao što su: analiza

kvaliteta životne sredine, hrane, u biohemiji za analizu biomolekula i proteina, u kontroli sredstava zloupotrebe, u farmaceutskoj i biofarmaceutskoj industriji za otkrivanje i razvoj novih lekova i njihovih metabolita, kontroli kvaliteta lekova, itd. [118, 119]. U medicinskoj praksi, LC-MS/MS tehnika ima veoma značajnu primenu u prevenciji i/ili praćenju mogućih bolesti genetske, endokrinološke, metaboličke ili hematološke etiologije. Zbog velike osetljivosti naročito važnu primenu nalazi u pre-natalnim i post-natalnim *screenig* procedurama [120].

### **Prednosti MS/MS metode**

- Osetljivost  $\geq 1$  pg, zavisi od vrste i osobina analita. MS/MS detektori su osetljiviji od GC, LC i LC-MS detektora.
- Selektivnost ne zavisi od hromatografske rezolucije. Koeluirajući pikovi mogu biti identifikovani na osnovu selekcije jonskih masa, odnosno analiti različitih relativnih molekulskih masa ( $M_r$ ) mogu biti razdvojeni pozivanjem specifičnog masenog hromatograma iako imaju slično ili isto retenciono vreme. Za konfirmaciju identiteta analita osim retencionog vremena ( $R_t$ ) koristi se i poređenje odnosa masa jona kao i poređenje spektara sa bibliotekom spektara (opciono).
- Mogućnost analize širokog spektra analita od slabo isparljivih, polarnih, do termolabilnih analita i dr.
- Određenost pikova; MS/MS formira jedinstveni maseni spektar analita, čak iako se nalazi u veoma kompleksnom matriksu.
- Određuje molekulske mase jedinjenja, potvrđuje  $M_r$  poznatih jedinjenja a identifikuje  $M_r$  nepoznatih analita.
- Omogućuje strukturne informacije o analitu; kontrolisanom fragmentacijom formiraju se jonski fragmenti koji omogućuju utvrđivanje strukture nepoznatih analita.
- Omogućuje brzi razvoj analitičkih metoda; MS/MS ima mogućnost spektralne identifikacije eluirajućeg analita bez poznavanja tačnog retencionog vremena.
- Adaptibilan za različite matrikse; MS/MS skraćuje vreme i pojednostavljuje pripremu uzorka.
- Primenjiv za širok opseg jedinjenja i različite uslove tečnog hromatografa.
- Jednostavnost primene; kvantifikacija je brza i jednostavna;

- 
- Skraćuje vreme i troškove analize, pa omogućuje analizu većeg broja uzoraka za kraće vreme (1000 uzoraka po analizi).
  - Stabilnost i robustnost sistema
  - Dobar linearno - dinamički odgovor detektora
  - Obezbeđuje informacije nedostupne korišćenjem konvencionalnih HPLC metoda.

### **Nedostaci MS/MS metode**

Osnovni nedostatak MS/MS tehnike je nedostatak univerzalne, komercijalne korisničke biblioteke masenih spektara. Međutim, snimanjem sopstvene, korisničke biblioteke nakon završenog analitičkog postupka pod poznatim uslovima može se ovaj nedostatak nadomestiti. MS/MS detekcija zahteva specifičnu optimizaciju i podešavanje napona detektora za svaki analit posebno pa nije pogodna ni za *screening* analize [119, 120].

### **Maseni spektrometar**

Osnovna funkcija tandem masenog detektora je stvaranje pozitivnih ili negativnih jona iz analiziranog uzorka, njihovo razdvajanje prema odnosu masaelektrisanje ( $m/z$ ) i registrovanje vrste i količine prisutnih jona. Za ostvarivanje ovih funkcija MS detektor koristi sledeće osnovne delove: jonski izvor (stvaranje pozitivnih ili negativnih jona pod atmosferskim pritiskom), tandem maseni analizator (filtriranje/razdvajanje jona u visokom vakuumu), detektor (registrovanje jona) i pisač (kopjuter sa štampačem). Osnovi delovi i princip rada MS/MS tehnike biće predstavljeni na modelu aparata Shimadzu 8030 LCMS tandem maseni spektrometar (Sl.1.3.3.1.).



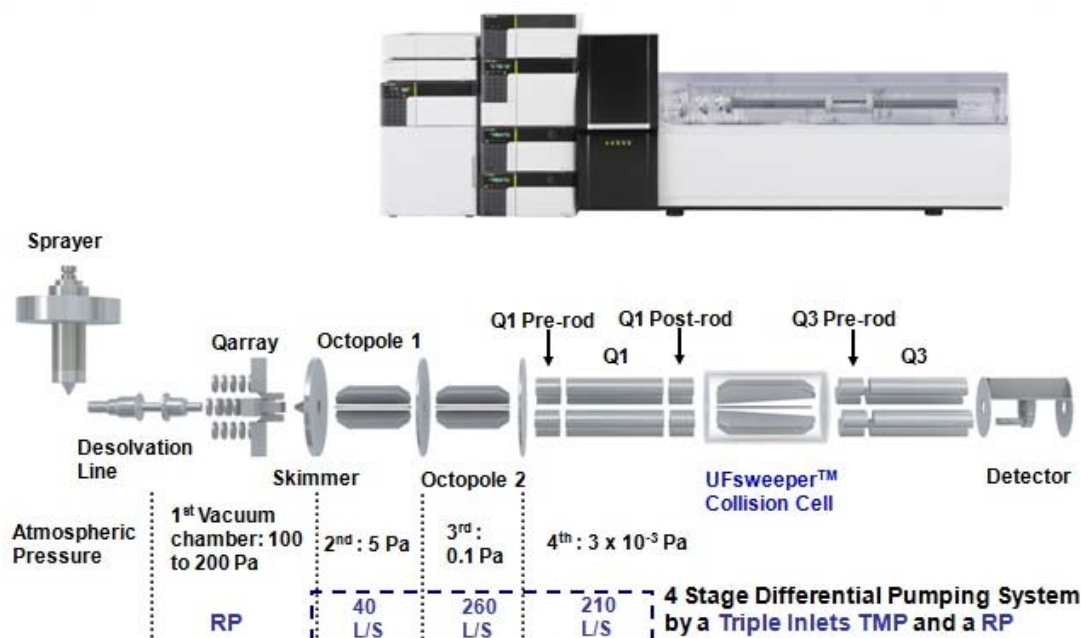
*Slika 1.3.3.1. Shimadzu 8030 LC-MS tandem maseni spektrometar*

### **Princip rada masenog spektrometra**

Nakon razdvajanja u hromatografskoj koloni, eluirani analiti u struji mobilne faze dospevaju u jonski izvor, gde se dešavaju dva procesa. Prvi, formiranje jednostruko ili višestruko naelektrisanih jona i drugi isparavanje molekula rastvarača (mobilna faza). Jedanput stvoreni joni prelaze iz jonskog izvora u maseni analizator gde se razdvajaju pod dejstvom promenljivog električnog i magnetnog polja u visokom vakuumu. Svako vrednosti elektromagnetnog polja odgovara određena jonska vrsta okarakterisana svojim odnosom mase prema naelektrisanju ( $m/z$ ), što utiče na brzinu njihovog kretanja i različito vreme pristizanja na detektor. Maseni analizatori funkcionišu u uslovima visokog vakuuma kako bi se kontrolisala fragmentacija odnosno jonima omogućio slobodni prolaz kroz instrument bez dodatnog sudaranja sa molekulima vazduha. Detektor registruje pristigle jone, prevodi u električni signal, pojačava i beleži pisačem u vidu masenog spektra analita. Grafička zavisnost intenziteta struje pristiglih jona (Intensity, Abundance) od  $m/z$  predstavlja maseni spektar, a uređaj za ovu vrstu analize maseni spektrometar [121].

### Osnovni delovi Shimadzu 8030 LCMS tandem masenog spektrometra (Slika 1.3.3.2.) :

- 1) *Sistem za unošenje uzorka* (SI, eng. *Sample Introduction*); uzorak u jonski izvor može dospeti putem UHPLC hromatografske kolone, infuzione špric pumpe, itd.
- 2) *Jonski izvor* na atmosferskom pritisku (API, eng. *Atmospheric Pressure Ionization System*); jonizacija analita vrši se na atmosferskom pritisku hemijskom (APCI, eng. *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) i/ili elektrosprej jonizacijom (ESI, eng. *Electrospray Ionization*).
- 3) *Tandem maseni analizator* (TMS, eng. *Tandem Mass Spectrometer*); kvadrupolni analizatori Q1 i Q3 povezani kolizionom ćelijom Q2 (CID, eng. *Collisions Induction Dissociation*,) u visokom vakuumu.
- 4) *Detektor* (eng. *Detector*); beleži promenu intenziteta struje jona određene mase sa vremenom.
- 5) *Sistem za obradu i štampanje masenih spektara* (DS, eng. *Data System*); softverski sistem LabSolutions LCMS Version 5.4. [119].



Slika 1.3.3.2. Šema osnovnih delova Shimadzu 8030 LC-MS tandem masenog spektrometra

Kuplovanje tečnog hromatografa sa masenim spektrometrom uslovio je razvoj vrlo moćne analitičke tehnike za kvantitativno određivanje analita u tragovima. Osnovna prepreka u konstrukciji LC-MS aparata bila je neusaglašenost relativno velike količine rastvora koja dospeva iz sistema za unošenje uzorka (LC kolone) u vakuum masenog detektora pri jonizaciji na atmosferskom pritisku. U rešavanju ovog problema konstruisano je nekoliko tipova interfejsa za jonizaciju od kojih se u praksi najšire primenjuju dva moda: ESI – elektrosprej jonizacija i APCI – hemijska jonizacija na atmosferskom pritisku. API razdvaja analit od rastvarača, jonizuje molekule analita i održava vakuum u masenom detektoru [120].

### **Elektrosprej jonizacija**

Elektrosprej jonizacija (ESI) predstavlja proces formiranja jona iz uzorka u tečnoj fazi tj. rastvora koji se ulaskom u jonski izvor raspršuje, obrazuje fine kapljice "spreja" i jonizuje. Proces prelaska jona iz tečne u gasovitu fazu pod atmosferskim pritiskom naziva se isparavanje jona. Osnovna prednost ESI tehnike je mogućnost analize jedinjenja koja nisu pogodna za gasno – masenu i termosprej analizu, kao što su termolabilna jedinjenja odnosno jedinjenja raspadljiva na visokim temperaturama i jedinjenja velikih molekulskih masa ( $M_r \geq 200\ 000$ ). Naročito je pogodna za analizu jonizovanih i polarnih jedinjenja kao što su biološki polimeri (proteini, peptidi, glikoproteini i nukleotidi), lekovi i njihovi metaboliti i industrijski polimeri (polietilenglikol).

ESI je blaga jonizaciona tehnika koja vrši jonizaciju molekula sa minimalnom fragmentacijom. U masenim spektrima preovlađuju protonizovani,  $[M+H]^+$  ili deprotonizovani,  $[M-H]^-$  molekulski joni koji omogućuju određivanje  $M_r$  ispitivanog jedinjenja prisutnog čak i u tragovima (visoka osetljivost). ESI jonizacijom polarne supstance malih molekulskih masa (manjih od 1000 amu) formiraju jednostruko (+) ili (-) narektrisane jone, dok supstance velikih molekulskih masa, kao što su proteini, mogu formirati višestruko narektrisane jone. Ako se jonizacija vrši u prisustvu kontaminanata ili aditiva ( $NH_4^+$  ili  $Na^+$  joni), može doći do formiranja tzv. adukt jona. Npr. amonijumov adukt jon ( $M + NH_4^+$ ) tj.  $(M + 18)^+$ , natrijumov adukt jon ( $M + Na^+$ ) tj.  $(M + 23)^+$ , itd. Snimljeni maseni spektri tada pokazuju pored glavnog

molekulskog jona i druge dodatne jone ili mogu da pokazuju samo druge jone bez molekulskog jona [122].

Elektrosprej jonizacija je izuzetno pogodna za određivanje protonizovanih i deprotonizovanih molekulskih jona, čija je determinacija kao prekursor jona veoma značajna u daljem procesu MS/MS optimizacije i kvantifikacije analita. Glavni nedostatak ESI jonozacije je mogućnost pojave efekta supresije i/ili pojačanja jonizacije usled prisustva koeluirajućih analita ili interferirajućih supstanci iz matriksa. Matriks efekat predstavlja osnovni uzrok greške MS/MS kvantifikacije, pa je priprema uzorka od velikog značaja u analitičkom postupku. Kao nedostatak javlja se i mogućnost nelinearnog odgovora detektora kod viših koncentracija, kao i usaglašavanje optimalnih pH vrednosti za ESI i mobilnu fazu [123].

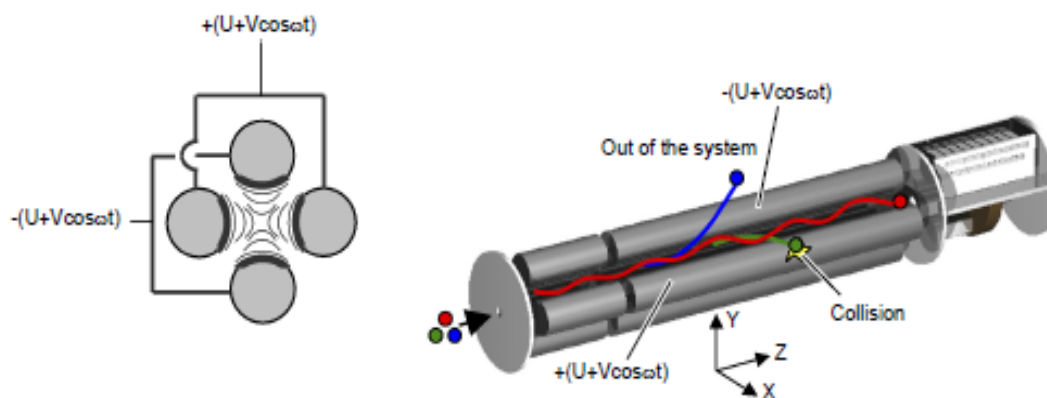
### **Kvadruploni maseni analizator**

Maseni analizator je deo MS/MS spektrometra koji vrši razdvajanje jona ili fragmenata jona analita formiranih na atmosferskom pritisku ili u regionu visokog vakuma masenog analizatora (produkti kolizijom idukovane disocijacije). Postoji nekoliko tipova masenih analizatora koji se rutinski primenjuju u tečno - masenoj spektrometriji koji se međusobno razlikuju po fundamentalnom procesu razdvajanja jona prema odnosu masa - naelektrisanje.

Maseni analizatori tipa kvadrupol (eng. *Quadrupole Mass Analyzers*) vrši razdvajanje jona pomoću elektostatičkog potencijala prisutnog na pojedinim delovima masenog analizatora. Određeni joni se selektuju prema  $m/z$  odnosu i detektuju, dok se neselektovani joni odbacuju iz masenog analizatora [120].

Osnovni princip razdvajanja jona u kvadrupolnom analizatoru zasniva se na različitom oscilacivanju jona pri prolasku kroz aksijalno simetrično radiofrekventno polje [109]. Maseni analizator se sastoji od četiri paralelne elektrode i pred-elektroda (pre-rods) kao što je prikazano na slici 1.3.3.3.

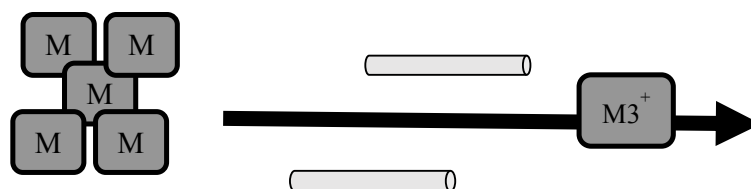




Slika 1.3.3.3. Kvadrupolni analizator

Ukoliko se u MS analizatoru podese specifični parametri, omogućuje se stanje stabilnog oscilovanja samo jona u određenom opsegu odnosa masa-naelektrisanje ( $m/z$ ) i prolaz kroz analizator do detektora. Joni izvan ovog  $m/z$  opsega osciluju nestabilno, sudaraju se sa elektrodama i izleću sa primarne putanje kretanja, pa se i ne detektuju.

Propuštene jone registruje detektor i proizvodi električni signal koji se dalje obrađuje do izgleda masenog spektra. Registrovanje svih jona koji pristignu pod datim uslovima na detektor predstavlja totalni jonski hromatogram (SCAN, eng. *full scan mode*,) mod. Mogućnost podešavanja određenih parametara i dovođenje u fokus detektora samo jona određenih  $m/z$  vrednosti predstavlja pojedinačni monitoring modul analize (SIM, eng. *Single Ion Monitoring*,) koji povećava osetljivost i selektivnost MS analize (Sl. 1.3.3.4.).



Slika 1.3.3.4. SIM – Single Ion Monitoring mod

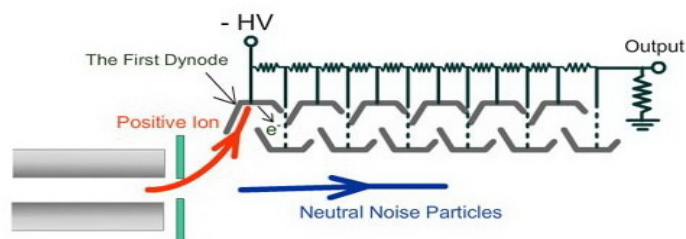
Termin MS/MS se odnosi na kuplovanje dva ili više masena analizatora. Tandem maseni spektrometar Shimadzu 8030 LCMS je opremljen sa dva masena kvadrupola Q1 i Q3. Prednost tandem masenih analiza je mogućnost dobijanja strukturnih informacija iz fragmenata jona izolovanih u Q1 masenom analizatoru, i veća osetljivost i selektivnost pri kvantifikaciji selektovanih jonskih tranzicija primenom i Q1 i Q3 masenih analizatora [119].

### **Koliziona ćelija**

Koliziona ćelija Q2 koja predstavlja visokofrekventni usmerivač jona pozicioniran između kvadrupola Q1 i Q3. Koliziona ćelija uz pomoć inertnog gasa argona omogućuje dodatnu, kolizijom indukovanu fragmentaciju (disocijaciju) molekulskih jona (CID, eng. *Collision Induced Dissociation*) nastalih u jonskom izvoru i propuštenih kroz prvi maseni kvadrupol Q1. Dodatna fragmentacija se ostvaruje na određenom CID naponu, ubrzavanjem kretanja stvorenih jona (prekursor joni) i preostalih neutralnih molekula uslovljavajući njihovo međusobno i/ili sudaranje sa molekulima vazduha i/ili argona. Krajnji ishod je cepanje veza u molekulu analita i stvaranje novih jonskih fragmenata - produkt jona. Najčešće nastaju fragmenti raskidanjem C – N i C – O veza. U drugom kvadrupolu Q2 mogu se dalje pratiti svi novonastali joni ili samo selektovane jonske masa. Primenom CID-a obogaćuje se izgled masenih spektra, a analiza postaje specifičnija i osetljivija.

### **Detektor**

Detektor je veoma važan deo masnog spektrometra koji registruje prisustvo i količinu propuštenih (+) i (-) jona kroz MS analizator i proizvodi odgovarajući električni signal. Svako detektovanje električnog signala može se podeliti u četiri faze: detektovanje, pojačanje, snimanje masenog spektra i izračunavanje i obrada podataka (MS analiza). Postoji više vrsta detektora ali najširu primenu ima elektronski multiplikator koji je prikazan na slici 1.3.3.5. prikazan je proces rada elektroskog multiplikatora pri registrovanju (+) jona [122, 123].



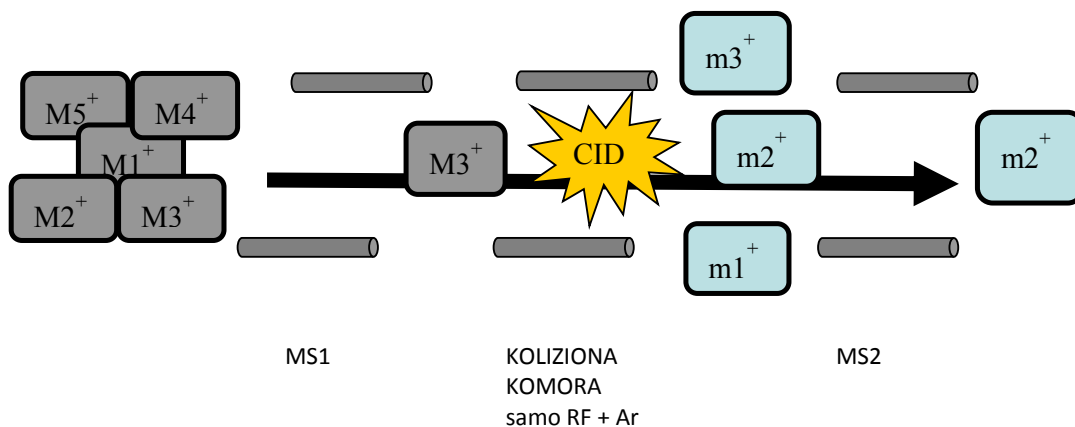
Slika. 1.3.3.5. Šema elektronskog multiplikatora pri registrovanju (+) jona

### MS/MS analiza

Trajni zapis i registrovanje stvorenog električnog signala MS detektora ostvaruje se digitalno pomoću računara sa odgovarajućim softverskoim programom. Kod MS/MS analize bez obzira na vrstu primenjene jonizacije, postoji mogućnost snimanja jonskih hromatograma u totalnom modu (TIC, eng. *Total Ion Chromatogram*) i modu selektovanih jonskih masa (SIM, eng. *Selected Ion Monitoring*). TIC je totalni jonski hromatogram koji predstavlja sumu intenziteta svih jonskih masa u zavisnosti od vremena dok SIM jonski hromatogram predstavlja intenzitete jedne ili više izabranih jonskih masa u zavisnosti od vremena. TIC merenja se uglavnom koriste za kvalitativnu MS analizu i određivanje molekuskog jona i izbor najpogodnijeg jonizacionog moda, dok se SIM koristi za povećanje osetljivosti metode i kvantifikaciju analita. Prednost MS/MS analize je mogućnost selektovanja određenih jonskih masa od interesa za analizu. Selektovani joni u prvom kvadrupol Q1 analizatoru se nazivaju Prekursor joni. Prekursor joni sudaranjem sa molekulima inertnog gasa argona u kolizionoj ćeliji Q2 (CID) formiraju Produkt jone. Merenjem produkt jona u drugom kvadruplonom Q3 analizatoru dobijaju se informacije o strukturi prekursor jona što predstavlja osnovu MS/MS analize. Shimadzu 8030 LCMS omogućuje nekoliko tipova analiza: SCAN i/ili SIM analize za Q1 i Q2 kvadrupol.

### Multi reakcioni monitoring mod (MRM)

MRM (eng. *Multi Reaction Monitoring*) predstavlja skraćenicu za multireakcioni monitoring mod ili SRM (eng. *Selected Reaction Monitoring Mod*), selektovani reakcioni monitoring mod ili samo tranzicija masa. MRM je najčešće korišćena funkcija u tandem-kvadrupol tehnologiji (>99%). Metoda analize u ovom modu podrazumeva podešavanja i fiksiranje određenih  $m/z$  masa u oba kvadrupola Q1 i Q3. Prekursor joni se selektuju u Q1, a Produkt joni formirani u CID komori u Q3. U masenom spektru detektuju se samo Produkt joni (jedan ili više) predstavljeni kao tranzicija jona npr. Reserpin MRM: 609.10 > 195.05 (+), što predstavlja klasičan MS/MS prikaz za identifikaciju i kvantifikaciju specifičnog analita. Kako se prate samo selektovane jonske mase, MS analiza postaje visoko osetljiva i specifična sa minimalnom verovatnoćom detektovanja neželjenih supstanci. MRM mod je izuzetno pogodan za anлізу analita koji se nalazi u tragovima u kompleksnim matriksima (Sl. 1.3.3.6).



Slika 1.3.3.6. Šema MRM – Multi Reaction Monitoring moda. Q1: SIM, Q2:

Fragmentacija za selektovani 1 MRM, Q3: SIM

Za korišćenje MRM funkcije LC-MS aparata neophodno je poznavati jon koji će se fragmentisati (Prekursor jon), zatim jone koji će se pojaviti nakon fragmentacije (Produkt joni) i kolizionu energiju (različite kolizije energije formiraju različite

---

Produkt jone). Optimizacija MRM-a je neophodan preduslov za postizanje maksimalnog intenziteta jona [119].

#### 1.4. PRIPREMA BIOLOŠKIH UZORAKA

U procesu razvijanja nove bioanalitičke metode izolovanje analita iz kompleksnih bioloških uzoraka predstavlja veoma važan deo. Kompletna bioanalitička metoda uključuje uzorkovanje, čuvanje, pripremu i analizu uzoraka, pri čemu adekvatna priprema predstavlja jedan od ključnih segmenata. Smatra se da priprema uzorka utiče na uspešnost hromatografske analize više od 80 %, pa je osnovni cilj svake pripreme, izolovanje željenih analita u što većem prinosu i čistijem obliku. Ispitivane supstance se često u biološkom matriksu nalaze u veoma niskim koncentracijama, pa je primena visokoosetljivih analitičkih metoda npr. LC-MS/MS za njihovo detektovanje od male koristi ukoliko je uzorak neadekvatno pripremljen odnosno ukoliko je analit iz uzorka izolovan u malom prinosu i čistoći. Neadekvatna priprema uzorka utiče i na lošiji izgled hromatograma, skraćuje vek analitičkih kolona, usporava rad i/ili zapušta hromatografske sisteme, izaziva pojavu *carry over* efekta i smanjuje samu osetljivost metode [124].

Pripremu uzorka čine i ukoncentrisanje ili razblaženje uzorka, kao i uklanjanje neželjenih, interferirajućih endogenih i egzogenih supstanci koje stvaraju pozadinske jone i izazivaju supresiju jonizacije u MS/MS analizi [125]. Desalinizacija uzorka i uklanjanje K- i Na- soli umanjuje mogućnost formiranja adukt jona, a filtriranje i centrifugiranje plazme, mleka ili tkiva prečišćava uzorke od malih molekula i proteina. Endogene interferirajuće supstance mogu biti ugljeni-hidrati, proteini, masti, i drugi biološki konstituenti, dok egzogene interference predstavljaju plastifikatori, masnoće, antioksidansi i sl. [126]. Složenost postupka pripreme u velikoj meri zavisi od prirode uzorka, leka ili otrova koji se analizira (uključujući i njegovu nestabilnost ili kada je znatno izmetabolisan) i od primenjene hromatografske metode.

##### **Vrste interferirajućih supstanci:**

1) *Soli* u zavisnosti od koncentracije u uzorku i primenjene detekcione tehnike mogu u velikoj meri uticati na osetljivost metode. LC i LC-MS analize su znatno manje

podložne kontaminaciji solima u odnosu na GC i GC-MS analize gde može doći do depozicije soli u samom sistemu.

2) *Proteini* imaju relativno visoku koncentraciju u biloškim uzorcima i hrani. Fizičko taloženje proteina predstavlja mehanički rizik. Strukura varira od naelektrisanih, visoko polarnih do hidrofobnih neutralnih vrsta, a njihovo ponašanje u prirodnom obliku može da varira od uzorka do uzorka.

3) *Masti* odnosno hidrofobni, a ponekada i naelektrisani deo molekula lipida može izazvati ozbiljene probleme u hromatografiji; fizička nadogradnja na stacionarnu fazu → znatne promene u hromatografiji, jonska supresija → gubitak osetljivosti metode, itd.

4) *Pigmenti* usled rektivne prirode u LC i LCMS analizi mogu izazvati gubitak performansi kolone i supresiju jonizacije, a kod GC i GCMS analize taloženje i kvar aparata.

5) *Surfaktanti*; površinski aktivne supstance koje se, ako su lipidne prirode, mogu i fizički vezati za stacionarnu fazu kolone i izmeniti hromatografiju, zatim izazivaju supresiju jonizacije i utiču na smanjenje osetljivosti.

6) *Čvrste čstice* [126].

### **Metode pripreme uzoraka za MS/MS analizu**

Priprema uzoraka za masenu analizu može se vršiti na više načina:

1) *Razblaživanje uzorka* je brz i jednostavan način pripreme većeg broja uzoraka za kraće vreme. Veliki nedostatak ove metode je nepotpuno uklanjanje interferenci, što može dovesti do kontaminacije kolone i instrumenta. Redukovano ukoncentrisanje i supresija jonizacije su takođe veliki nedostaci, te kao takva nalazi slabu primenu.

2) *Precipitacija ili deproteinizacija proteina (PP)* predstavlja efektivnu metodu za uklanjanje proteina (albumin) iz uzoraka plazme, i omogućuje pripremu većeg broja uzoraka za kraće vreme. Pogodna je za automatizaciju i predstavlja opštu metodu za pripremu uzoraka plazme. Nedostaci su što ne uklanja soli i masti iz uzoraka, što može izazvati kontaminaciju kolone i instrumenta, kao i otežano uparavanje rastvarača.

### 3) Ekstrakcione metode:

- *Tečno - tečna ekstrakcija* (TTE) je klasična ekstrakcija organskim rastvaračima nemešljivim sa vodom. Prednost je što je jeftina i efikasno uklanja neorganska jedinjenja i soli, a nedostaci redukovano ukoncentrisanje, pa ekstrakti moraju da se uparavaju, koristi velike količine rastvarača (hlorisanih), komplikovana za automastizaciju, neselektivna, stvara emulzije i loše razdvaja faze. Tečno - tečnom ekstrakcijom se dobijaju ekstrakti zadovoljavajuće čistoće, ali sam postupak je nisko reproduktivan i dugo traje.

- *Tečno - čvrsta ekstrakcija* (SPE, eng. *Solid Phase Extraction*) je ekstrakcija organskim rastvaračima na čvrstom nosaču, koja se može svrstati u adsorbcionu tečno – čvrstu hromatografsku metodu manjih dimenzija. Najbolje karakteristike pokazuje za uklanjanje interferenci i ukoncentrisavanje uzoraka. Odlikuje je visoka fleksibilnost i mogućnost ekstrahovanja celih grupa lekova, kao i mogućnost automatizacije. Glavni nedostatak je vreme potrebno za razvijanje SPE metode koje produžava vreme trajanja analize [127, 128].

U savremenoj analitici primenjuju se i druge metode za pripremu uzoraka, različitih karakteristika (brzina, osetljivost, selektivnost) i namena, kao što su: tečna ekstrakcija potpomognuta dejstvom mikrotalasa (eng. *Microwave-Assisted Solvent Extraction*; MASE), disperzivna tečno-čvrsta ekstrakcija (eng. *Dispersive Solid-Phase Extraction*; DSPE), ultrazvučna ekstrakcija (eng. *Ultrasonic Extraction*; USE), disperzija na čvrstoj fazi (eng. *Matrix Solid-Phase Dispersion*; MSPD), mikroekstakcije TTE, membranska ekstrakcija, ekstrakcija superfluidnim tečnostima, tečna ekstrakcija pod visokim pritiskom, itd. [129].

## 1.5. OSNOVNI FARMAKOKINETIČKI PARAMETRI

Farmakokinetika je nauka koja proučava procese kojima jedan lek u organizmu podleže. Opisuje kretanja leka od njegovog unošenja u organizam, preko distribucije kroz organe i tkiva putem sistemske cirkulacije, do krajnje eliminacije putem biotransformacije i izlučivanja. Osnovni farmakokinetički procesi uključuju apsorpciju, distribuciju, metabolizam i izlučivanja leka iz organizma.

Farmakokinetička ispitivanja se oslanjaju na matematičko opisivanje i modelovanje resorpcije, distribucije, biotransformacije i eliminacije leka u organizmu

u funkciji vremena. Postoji više vrsta farmakokinetičkih ispitivanja: klasična, prostorna (model - zavisna), neprostorna (model - nezavisna), populaciona, fiziološka, i dr. [130].

Farmakokinetička ispitivanja kvantitativno, matematički opisuju ponašanje leka u organizmu sa vremenom. Eksperimentalno dobijeni podaci se koriste za konstruisanje odgovarajućih FK modela i izračunavanje FK parametara leka. Poznavanje FK parametara omogućuje se ispravno doziranje leka, procena bioraspodivnosti leka i povezivanje FK i FD karakteristika leka. Dobijene informacije o akumulaciji, zasićenju eliminacije, vezivanju za proteine plazme. opisuju osnovne karakteristike ispitivanog leka, ali i pružaju mogućnost dizajniranja novih formulacija leka sa povoljnijim kinetičkim profilom. U toksikokinetičkim ispitivanjima dobijeni FK podaci imaju veliki značaj u interpretaciji toksičnosti ispitivane supstance, planiranju drugih studija toksičnosti i proceni bezbednosti ispitivane supstance kod ljudi [131, 132].

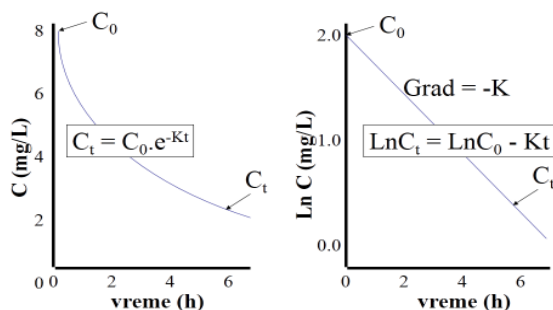
### **Klasična farmakokinetika**

Standardni pristup opisivanja kinetike lekova, prostorno-zavisan, predstavlja telo kao sistem od jednog ili dva dela (kompartmana), koji nisu povezani određenim anatomskim i morfološkim strukturama ili fiziološkim procesima. Kompartmani (prostori) hipotetički predstavljaju homogene delove biološkog sistema određene zapremine i koncentracije supstance u njemu. Definisani su početnim i krajnjim stanjem procesa i određenim biološkim karakteristikama. Prostorno-zavisni modeli se skoro uvek empirijski koriste za opisivanje kinetike leka u lako dostupnim telesnim tečnostima (uglavnom u krvi) ili izlučevinama (npr. urin, stolica, pljuvačka i dah), što ih čini izuzetno pogodnim za primenu u farmakokinetičkim studijama kod ljudi, gde nisu dostupna tkiva i organi za analizu. Složenost FK modela zavisi od načina primene leka i učestalosti doziranja leka.

*Model jednog prostora* (linearni otvoreni) je najjednostavniji prostorno-zavisan FK model i primenjuje se kod brze i trenutne raspodele leka između plazme, drugih telesnih tečnosti i tkiva. Ovaj model podrazumeva da je koncentracija leka u krvi ( $C_t$ ) proporcionalna koncentraciji leka u tkivima. Svaka promena koncentracije leka u krvi odražava se proporcionalnom promenom koncentracije leka u tkivima.



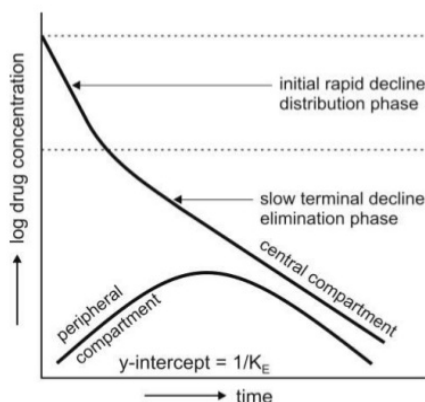
Kod jednodimenzionalnog FK modela brzina procesa eliminacije leka iz organizma prati kinetiku prvog reda. Brzina eliminacije direktno zavisi od koncentracije leka u organizmu u određenom vremenu. Odnos koncentracije leka sa vremenom se predstavlja aritmetičkim i logaritamskim graficima (Slika 1.5.1.), gde dobijene prave linije omogućavaju jednostavno određivanje farmakokinetičkih parametara [131, 132].



Slika 1.5.1. Grafička zavisnost koncentracije leka u plazmi sa vremenom pri i.v. primeni kod otvorenog jednodimenzionalnog modela

Linearna zavisnost koncentracije leka sa vremenom dobija se samo kod primene malih doza i pri niskim koncentracijama leka u plazmi. Pri većim koncentracijama zbog pojave saturacije gubi se linearnost, brzina eliminacija postaje konstantna (*kinetika nultog reda*), a odnos vrednosti koncentracija-vreme dobija izgled krive linije.

Ljudski organizam je FK model koji se sastoji od velikog broja prostora (organele, ćelije, tkiva) ali samo dve biološke tečnosti, pa se prostorni modeli prvenstveno odnose na njih. *Model dva prostora* (linearni otvoreni) je najjednostavniji višeprostrorni model, gde se raspodela leka može pratiti od nekoliko minuta do nekoliko sati. Raspodela leka se posmatra između centralnog (telesne tečnosti i tkiva u brzom ravnoteži sa krvlju) i perifernog prostora (tkiva gde se lek sporo raspoređuje). Lek unet u organizam se različitim brzinama i vremenima raspoređuje između centralnog i perifernog prostora do uspostavljanja ravnotežnog stanja. Na slici 1.5.2. predstavljena je zavisnost koncentracije leka u plazmi sa vremenom pri i.v. primeni kod otvorenog dvodimenzionalnog modela.



Slika 1.5.2. Grafička zavisnost koncentracije leka u plazmi sa vremenom pri i.v. primeni kod otvorenog dvoprostornog modela

### Farmakokinetički parametri jednodprostornog modela

Osnovni FK parametri modela jednog prostora se određuju analizom najjednostavnijeg FK modela - jednokratna, intravenska aplikacija leka i praćenje eliminacije merenjem koncentracije leka u plazmi sa vremenom. Glavna pretpostavka ove analize je kinetika prvog reda i linearnost, odnosno da brzina eliminacije leka nije konstantna, već se menja proporcionalno (eksponencionalno) sa promenom koncentracije leka u plazmi sa vremenom. Opadanjem koncentracije leka u plazmi smanjenje se i brzina eliminacije leka iz organizma.

Koncentracija leka u plazmi ( $C_t$ ) je jedan od važnijih parametara u farmakokinetici. Od trenutka unošenja u organizam, koncentracija leka se stalno menja pod uticajem svih farmakokinetičkih procesa (ADME), koji se odvijaju istovremeno, pa je pokazatelj raspodele leka u organizmu. Kod jednokratne i.v primene, koncentracija leka u plazmi izražava se kao:

$$C_t = C_0 \cdot e^{-k_{el} \cdot t}$$

$$\text{Log } C_t = \text{Log } C_0 - k_{el} \cdot t / 2.303 \quad (\text{mg/L})$$

gde je  $C_0$  - teorijska koncentracija leka u plazmi u nultom vremenu ( $t=0$ ),  $C_t$  - koncentracija leka u plazmi u vremenu  $t$ , a  $k_{el}$  - konstanta eliminacije prvog reda.

Kod peroralne primene, pojava leka u plazmi odložena je za vreme koje je potrebno da se lek resorbuje iz gastrointestinalnog trakta (*lag faza*). Brzina resorpcije

zavisi od primenjene doze leka i odvija se kinetikom prvog reda. Od primenjene doze leka resorbuje se samo deo ( $f$ ), koji definiše stepen biorasploživosti leka. Koncentracija leka u plazmi u funkciji vremena nakon peroralne primene, kod modela jednog prostora, izražava se sledećom jednačinom:

$$C = [f \cdot D \cdot k_{res} \cdot (e^{-k \cdot t} - e^{-k_{res} \cdot t})] / Vd (k_{res} - k)$$

gde je  $f$  - deo resorbovanog leka,  $D$  - doza,  $k_{res}$  - konstanta resorpcije.

Stepen resorpcije leka ( $f$ ) se izračunava kao odnos ukupne PIK primenom peroralne doze i PIK nakon intraveske infuzije iste doze leka:

$$f (\%) = PIK_{p.o.} / PIK_{i.v.} \cdot 100$$

gde je  $PIK_{p.o.}$  - površina ispod krive nakon peroralne primene,  $PIK_{i.v.}$  - površina ispod krive nakon intravske primene. Faktor  $f$  ima vrednosti  $\leq 1$  i njime se koriguju farmakokinetički parametri dobijeni nakon *per os* primene leka.

Konstanta brzine eliminacije ( $K_{el}$ ,  $K$ ,  $\beta$ ,  $\lambda$ ) je konstanta koja opisuje brzinu uklanjanja leka iz organizma. Lek se iz organizma može ukloniti metabolizmom, ekskrecijom i izdahnutim vazduhom.  $K_{el}$  je konstanta brzine prvog reda, ne zavisi od primenjene doze i izražava se sledećom jednačinom:

$$k_{el} = -a \cdot 2,303 \quad (1/h \text{ ili } 1/min)$$

gde je  $a$  - nagib prave zavisnosti koncentracija leka u plazmi od vremena uzorkovanja.

Konstanta brzine resorpcije ( $K_{res}$ ,  $\alpha$ ) se određuje kod *per os* primene lekova.  $K_{res}$  je konstanta koja opisuje brzinu resorpcije leka odnosno brzinu prolaza leka iz spoljašnje sredine u unutrašnji prostor organizma.  $K_{res}$  je ukupna konstanta brzine prvog reda i predstavlja se kao:

$$k_{res} = (\ln C_0 - \ln C_t) / t, \quad (1/h)$$

gde je  $C_0$  - teorijska koncentracija leka u plazmi u nultom vremenu ( $t=0$ ), a  $C_t$  - koncentracija leka u plazmi u vremenu  $t$  (u fazi resorpcije).

Maksimalna koncentracija leka u plazmi je  $C_{max}$ , a  $T_{max}$  maksimalno vreme odnosno vreme potrebno za postizanje maksimalne koncentracije leka u plazmi.  $C_{max}$  i  $T_{max}$  predstavljaju parametre brzine resorpcije leka.

Volumen distribucije ili zapremina raspodele ( $V_d$ ) je teoretska zapremina koju bi uneta količina leka zauzela i predstavlja odnos koncentracije leka u plazmi prema ukupno unetoj količini leka u organizam. Kod jednodimenzionalnog modela  $V_d$  se matematički izražava kao:

$$V_d = D/C_0, \quad (\text{mL ili L})$$

ili

$$V_d = Cl \cdot T_{1/2} / 0,693$$

gde je  $D$  - ukupna količina leka u organizmu,  $C_0$  - koncentracija leka u plazmi,  $Cl$  - klirens,  $T_{1/2}$  - vreme polueliminacije. Volumen distribucije zavisi od više faktora koji su vezani za osobine leka i organizma. Veći  $V_d$  imaju liposolubilni lekovi koji imaju veći afinitet prema tkivima, a obrnuto važi za hidrosolubine lekove.

Poluvreme eliminacije ( $T_{1/2}$ ,  $T_{50\%}$ ) je farmakokinetički parametar koji izražava dužinu zadržavanja leka u organizmu, odnosno brzinu eliminacije leka iz organizma. Definiše vreme potrebno da se koncentracija nepromenjenog leka u centralnom prostoru (krvi) smanji na polovinu od svoje početne vrednosti nakon postizanja dinamičke ravnoteže.

$$T_{1/2} = 0,693 / k_{el} \quad (\text{h})$$

Kod jednodimenzionalnog modela, gde se brzina eliminacije odvija kinetikom I reda, vreme polueliminacije predstavlja konstantnu vrednost i ne zavisi od početno primenjene doze leka.

Površina ispod krive (PIK, AUC) predstavlja meru ukupne količine tj. resorbovane količine leka u organizmu i određuje ga stepen resorpcije leka. Neparаметrski se izračunava metodom trapezoida korišćenjem podataka o koncentraciji leka i vremenu merenja koncentracije leka. PIK se može matematički izračunati i poznavanjem drugih farmakokinetičkih parametara kao što su konstanta eliminacije ( $k_{el}$ ), volumen distribucije ( $V_d$ ) i klirens ( $Cl$ ) za primenjenu dozu leka ( $D$ ):

$$PIK = D / V_d \cdot k_{el} = D / Cl \quad (\text{mg h/L})$$

Klirens ( $Cl$ ) je direktno merilo brzine eliminacije leka iz organizma. Definiše se kao volumen telesne tečnosti koji se očisti od leka u jedinici vremena, a izražava:

$$Cl = k_{el} \cdot Vd \quad (\text{mL/min ili L/h})$$

ili

$$Cl = D / PIK, \quad Cl = 0.693 \cdot Vd / T_{1/2}$$

Veće vrednosti klirensa podrazumevaju bržu eliminaciju leka iz centralnog prostora i obrnuto. Razlikujemo ukupni, bubrežni, hepatici (metabolički) i intrinzički (unutrašnji) klirens [132, 133].

## 1.6. TESTOVI BRZINE RASTVARANJA AKTIVNE SUPSTANCE IZ TABLETA

Lekovi su farmaceutske preparati koji se proizvode u različitim oblicima: tablete, dražeje, kapi, injekcije, masti, supozitorije, itd. Proces proizvodnje, pakovanja i stavljanja u promet gotovih lekova (formulacija farmaceutskih preparata) je precizno definisan zakonskom regulativom i propisima (Zakon o lekovima i medicinskim sredstvima i odgovarajući pravilnici) sa ciljem dobijanja kvalitetnih, bezbednih i efikasnih lekova.

Biofarmacija proučava sve faktore koji utiču na proces oslobađanja i resorpcije lekovite supstance od formulacije do mesta resorpcije. Da bi se lek resorbovao i dospao u sistemske cirkulaciju, neophodno je da se prvo oslobodi iz farmaceutskog oblika, rastvori u telesnim tečnostima, dospe do mesta resorpcije (rasprostiranje) i transportuje kroz određene biološke membrane. Mnogobrojni faktori utiču na brzinu oslobađanja i resorpciju leka i mogu se podeliti u tri osnovne grupe: 1) fizičko-hemijske, 2) biološke i 3) farmaceutske-tehnološke. U fizičko-hemijske faktore spadaju osobine leka i pomoćnih materija kao što su: stepen jonizacije i konstanta disocijacije, particioni koeficijent, rastvorljivost u vodi i organskim rastvaračima, veličina čestica, molekulska težina, polimorfizam, kompleksiranje i resorpcija, viskozitet, hemijska stabilnost i interakcije. Biološki faktori predstavljaju fiziološke uslove na mestu resorpcije i uključuju osobine ćelijskih membrana, mehanizam resorpcije i karakteristike sredine na mestu resorpcije (pH, prokrvljenost i dr.), dok farmaceutske-tehnološki faktori podrazumevaju osobine i način izrade leka (vrsta farmaceutskog oblika, vrsta i količina pomoćnih supstanci, primenjeni proces izrade, način čuvanja leka).

Biofarmacija izučava odnose između fizičko-hemijskih osobina, farmaceutskog oblika, doze i bioraspoloživosti leka u organizmu. *Biološka raspoloživost* (BR) predstavlja deo lekovite supstance koji iz primenjenog farmaceutskog oblika dospeva u sistemska cirkulaciju u nepromenjenom obliku. BR zavisi od obima i brzine resorpcije leka, pa se kinetika resorpcije leka može smatrati merom bioraspoloživosti leka.

Određivanje bioraspoloživosti lekova je neophodno za procenu bioekvivalentnosti generičkih sa referentnim lekovima. *Biološka ekvivalentnost ili bioekvivalenca* (BE) je odsustvo značajnih razlika u stepenu i brzini resorpcije dva farmaceutska preparata sa istom aktivnom supstancom kada se aplikuju istim ispitanicima u istim dozama. Dve različite formulacije istog leka se smatraju bioekvivalentnim ukoliko imaju istu ili sličnu bioraspoloživost (razlike u farmakokinetičkim parametrima između ispitivanog i referentnog leka treba da budu između 80 i 125%). Studije biološke ekvivalentnosti se rade za potrebe registracije generičkih lekova, pri čemu se kao referentni lek koristi već registrovan lek koji ima istu aktivnu supstancu [134].

U procesu proizvodnje čvrstih formulacija (tableta) vrše se različita ispitivanja kako bi se obezbedio odgovarajući kvalitet. Po Ph. Eur., ispituje se ujednačenost sadržaja lekovite supstance, variranje mase, raspadljivost tablete, otpornost tablete na lomljenje, čvrstina neobloženih tableta, određivanje sadržaja aktivne supstance, ispitivanje brzine rastvaranja aktivne supstance iz tablete (disolucioni test) i ispitivanje mikrobiološkog kvaliteta [135].

Disolucioni testovi se koriste za ispitivanje brzine oslobađanja aktivne supstance iz farmaceutskih preparata prema postupcima propisanim odgovarajućim farmakopejama Ph. Eur., BP, USP, JP [135-138]. Za ovu namenu koriste se oficinalne aparature različitih konstrukcija (sa lopaticama, korpicama, protočnim ćelijama) i načina rada (sa mešanjem ili protokom disolucionog rastvora). Merenja se vrše u disolucionim rastvorima različitog sastava i zapremine koje simuliraju fiziološke pH vrednosti u gastrointestinalnom traktu na određenoj temperaturi. Disolucioni testovi traju od 30-60 min za lekove sa trenutnim oslobađanjem i do 24 h za lekove sa modifikovanim oslobađanjem aktivne supstance. Uzorkovanjem ispitivanog rastvora u određenim vremenskim intervalima i merenjem koncentracije rastvorenog leka određuje se brzina oslobađanja aktivne supstance, koji se predstavlja

---

grafički i opisuje odgovarajućim matematičkim modelima. Najčešće primenjivani matematički modeli u praksi su: kinetika nultog reda, kinetika prvog reda, Higuchiev difuzioni model, Hixon-Crowell model, Korsmayer-Peppas model i dr. [134, 139]

Ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance u *in vitro* uslovima je veoma značajno u fazi razvoja i primene novih generičkih oblika lekova. Rutinski se koriste za biofarmaceutsku karakterizaciju leka odnosno procenu stabilnosti i kvaliteta oralnih formulacija leka primenom odgovarajućih validiranih analitičkih metoda. Merenjima se potvrđuje usklađenost brzine rastvaranja lekovite supstance iz ispitivanog preparata prema zahtevima farmakopeje i utvrđuje prisustvo eventualnih razlika i promena do kojih može doći u toku čuvanja preparata. Pod određenim uslovima disolucioni testovi se koriste i kao zamena za *in vivo* ispitivanja bioekvivalentnosti lekova, čime se smanjuje broj ispitivanja na ljudima i životinjama. Korelacija između *in vitro* – *in vivo* ispitivanja zasniva se na predviđanju *in vivo* kinetike rastvaranja aktivne supstance iz farmaceutskog preparata prema njegovom profilu brzine rastvaranja u *in vitro* uslovima. U ovim ispitivanjima eksperimentalni *in vitro* uslovi se podešavaju tako da što približnije opisuju biološke *in vivo* uslove (pH želuca/creva, temperatura i sl.) [140].

Osim navedenog značaja, disolucioni testovi nalaze i veliku primenu u novom sistemu klasifikacije lekova - Biofarmaceutski sistem klasifikacije (BCS, eng. *Biopharmaceutics Classification System*), koji se zasniva na rastvorljivosti, permeabilnosti i brzini rastvaranja aktivne supstance iz farmaceutskih preparata. Prema BCS, lekovi se na osnovu solubilnosti i permeabilnosti dele na: *grupu 1*: visoko solubilni - visoko permeabilni, *grupu 2*: nisko solubilni - visoko permeabilni, *grupa 3*: visoko solubilni - nisko permeabilni i *grupu 4*: nisko solubilni - nisko permeabilni lekovi [141].

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

### 2.1. Predmet i plan istraživanja

Ambroksol hidrohlorid je lek koji ima mukolitičko dejstvo i registrovan je za primenu na ljudima u obliku tableta i sirupa. Predmet ovog naučnog istraživanja je razvoj i validacija nove analitičke metode za analizu ambroksola primenom ultra brze tečne hromatografije sa tandem masenim detektorom (UHPLC-MS/MS), kao i njena primena. Analitička metoda određivanja ambroksola biće razvijena i validirana prema savremenim standardima koji se primenjuju u oblasti farmacije. Validacijom analitičke metode dobiće se podaci o njenoj tačnosti i preciznosti, o odnosu između koncentracije ispitivane supstance i odgovora aparata, o mogućim interferencijama iz matriksa uzorka, o najmanjim koncentracijama koje će se moći identifikovati i kvantifikovati tom metodom. Nova analitička metoda biće proverena u eksperimentima *in vitro* i *in vivo*. U *in vitro* uslovima biće urađeni testovi rastvorljivosti tableta ambroksola prema odgovarajućim farmakopejama. Pored toga, biće urađena farmakokinetička studija tableta ambroksola na kunićima. Pregledom dostupne literature utvrđeno je da ne postoje relevantne farmakokinetičke studije ambroksola na kunićima, pa će se odrediti osnovni farmakokinetički parametri ambroksola (površina ispod krive, poluvreme eliminacije, klirens, volumen distribucije, konstanta brzine resorpcije i eliminacije) kod kunića. Nova metoda bi mogla da ima primenu u farmaceutskoj industriji u ispitivanju novih farmaceutskih oblika ambroksola. To se odnosi i na izbor optimalne farmaceutske formulacije ambroksola proverom farmakokinetike leka na kunićima pre nego što se uradi studija bioekvivalencije na ljudima.



## 2.2. Ciljevi istraživanja

1. Razvoj nove analitičke metode UHPLC-MS/MS za određivanje ambroksola u biološkom materijau visoke osetljivosti, specifičnosti i reproducibilnosti.

2. Optimizacija validacionih parametara metode prema priručniku Internacionalne komisije za harmonizaciju i validaciju bioanalitičkih metoda, ICH Q2A/Q2B 1996 (International Conference on Harmonization Q2A/Q2B guidelines). Ispitaće se sledeći validacioni parametri:

- granica detekcije metode (LOD),
- granica kvantifikacije metode (LOQ),
- opseg linearnosti metode,
- intra- i interdnevna preciznost i tačnost metode,
- intralaboratorijska provera dobijenih rezultata,
- specifičnost/selektivnost metode - ispitivanje prisustva/odsustva interferenci, kao i matriks efekta – uticaja interferenci na povećanje i/ili smanjenje jonizacije analita,
- ekstrakcioni prinos ambroksola iz biološkog materijala,
- *carryover* - efekat,
- *cross-talk* efekat,
- test stabilnosti - ispitivanje uticaja različitih parametara (temperatura i sl.) na stabilnost uzoraka seruma opterećenih ambroksolom na različitim koncentracijama,
- test stabilnosti analitičkog standarda,
- robustnost metode

3. Optimizacija parametara ultra-brzog tečnog hromatografa; uticaj pH vrednosti, temperature, protoka i sastava mobilne faze na hromatografsko razdvajanje submikrometarskih RP- C18 kolona.

4. Optimizacija tandem-mesenog spektrometra; neophodno je izvršiti opštu i specifičnu kalibraciju aparata i odrediti najefikasniji mod jonizacije analita (ESI - elektrosprej ili APCI –hemijska jonizacija na atmosferskom pritisku u pozitivnom ili negativnom modu), jonskog monitoringa (multi reakcioni monitoring - MRM mod,

scan mod ili produkt jon monitoring mod, itd.) i optimalne napone detektora, kao i komore za kolizijom idukovanu disocijaciju jona (CID).

5. Optimizacija procedure izolovanja ambroksola iz biloškog materijala kako bi se postigla visoka osetljivosti i specifičnosti UHPLC-MS/MS metode. Za dobijanje ekstrakata visoke čistoće i prinosa ispitaće se procedure pripreme kao što su deproteinizacija uzorka, tečno-tečna ekstrakcija i tečno-čvrsta ekstrakcija primenom različitih organskih rastvarača i pH vrednosti.

6. Ispitivanje metode u farmakokinetičkoj studiji na kunićima i određivanje osnovnih farmakokinetičkih parametara kao što su površina ispod krive (PIK), poluvreme eliminacije ( $T_{1/2}$ ), klirens leka (Cl), volumen distribucije ( $V_d$ ) i drugi.

7. Nova analitička metoda biće proverena i u *in vitro* uslovima testovima rastvorljivosti tableta ambroksola prema odgovarajućim farmakopejama.

### 3. EKSPERIMENTALNI DEO

#### 3.1. Hemikalije i reagensi

- Analitički standard ambroksol hidrohlorida, čistoće 99 %, Fluka, Dorset, UK,
- Analitički standard verapamil hidrohlorida, interni standard (IS), čistoće 99 %, Fluka, Dorset, UK,
- Flavamed, 20 tbl. X 30 mg, Berlin Chemie AG (Menarini Group),
- Acetonitril, ACN, LCMS čistoće, Promochem, Wesel, Nemačka,
- Acetonitril, ACN, HPLC čistoće, JT Baker, USA,
- Metanol, MeOH, LCMS čistoće, Promochem, Wesel, Nemačka,
- Mravlja kiselina, HCOOH, LCMS čistoće, Promochem, Wesel, Nemačka,
- Sirćetna kiselina, CH<sub>3</sub>COOH, LCMS čistoće, Promochem, Wesel, Nemačka,,
- Amonijum-formijat, HCOONH<sub>4</sub>, LCMS čistoće, Fluka, Dorset, UK,
- Amonijum-acetat, CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>, LCMS čistoće, Promochem, Wesel, Nemačka,
- Amonijum hidroksid, NH<sub>4</sub>OH, p.a. čistoće, Sigma-Aldrich, Dorset, UK,
- Natrijum-acetat, CH<sub>3</sub>COONa, p.a. čistoće, Lach-Ner, Tovarni, Češka,
- Hlorovodonična kiselina, HCl, p.a. čistoće, Sigma-Aldrich, Dorset, UK,
- Natrijum-hidroksid, NaOH, p.a. čistoće, Lach-Ner, Tovarni, Češka,
- Ultra-čista dejonizovana Optima™ LC/MS voda, Fisher Chemical Waltham, MA, USA,
- Dikalijumhidrogen-fosfat, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, p.a. čistoće, Lach-Ner, Tovarni, Češka,
- Kalijumdihidrogen-fosfat, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, p.a. čistoće, Sigma-Aldrich, Dorset, UK,
- Dinatrijumhidrogen-fosfat, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, p.a. čistoće, Zorka Pharm, Šabac,
- Natrijumdihidrogen-fosfat, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, p.a. čistoće, Lach-Ner, Tovarni, Češka,
- Kalijum-hlorid, KCl, p.a. čistoće, Lach-Ner, Tovarni, Češka,
- Fosforna kiselina, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, p.a. čistoće, Lach-Ner, Tovarni, Češka,
- Borna kiselina, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, p.a. čistoće, Zorka Pharm, Šabac,
- Natrijum-tetraborat, Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 10 H<sub>2</sub>O, p.a. čistoće, Zorka Pharm, Šabac,
- Fosfatni pufer pH 6.7/25°C (100 mL 0,1M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>+ 38,6 mL 0,1M NaOH do 200 mL destilovana voda),
- Fosfatni pufer (PBS) pufer pH 7/25°C (200 mg KCl, 8000 mg NaCl, 200 mg, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1150 mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> do 1L destilovana voda, pH podešena sa 10% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>),

- Boratni pufer pH 9/25°C ( 50 mL 0.2 M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> + 59 mL 0,05M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> do 1L destilovana voda),
- Acetatni pufer pH 4.5/25°C (25 mL 0.2 M CH<sub>3</sub>COOH + 25 mL 0.2 M CH<sub>3</sub>COONa do 1L destilovana voda)
- Dejonizovana voda,
- Argon gas, čistoće 99,9999 %, Messer Tehnogas Niš,
- Generator azot gasa, čistoće 99,9999 %, Nitrogen Generator, Peak Scientific, UK

### 3.2. Pribor

- Automatske pipete, Brandon, BioHit Proline,
- Digitalna analitička vaga, E50 S/2 Gibertini,
- Mućkalica, Eberbach Model E6000,
- Mikrocentrifuga, Eppendorf Centrifuge 5410,
- Plastični špricevi, 5 mL,
- pH-metar, TESTO 206 PH1,
- Špric filteri, PTFE, 0.45 µm i 0.22 µm, Phenomenix,
- Sistem za prečišćavanje vode, ELGA Pure Lab Prima DV 35,Classic UV,
- Vorteks, Velp Scientifica Classic,
- Sistem za tečno-čvrstu ekstrakciju,
- Vodeno kupatilo, Digital Thermostatic Water Bath,
- Ultrazvučno kupatilo, Ultrasonic cleaner PS-20,
- Sistem za filtraciju mobilne faze, Phenomenex,
- Magnetna mešalica,
- Staklene pipete, epruvete, erlenmajeri.

### 3.3. Priprema osnovnih rastvora, radnih rastvora i opterećenih seruma

Osnovni rastvori (OR<sub>s</sub>, s-I, II, III) ambroksol hidrohlorida i verapamil hidrohlorida (interni standard, IS) pripremljeni su sledećim postupkom: 10 mg praškaste supstance, iz originalnog pakovanja, odmereno je u normalnom sudu od 10 mL na analitičkoj vagi sa tačnošću na četvrtoj decimali i dopunjeno do crte metanolom. Od dobijenog osnovnog (štok) rastvora (I) 1 mg/mL, daljim razblaživanjem u metanolu dobijeni su OR (II) 100

$\mu\text{g/mL}$  i OR (III)  $10 \mu\text{g/mL}$ . Isti postupak primenjen je i za dobijanje OR ambroksola u čistom serumu.

Radni rastvori (RR) ambroksola dobijeni su daljim razblaživanjem OR (II) i OR (III) u metanolu ili serumu. RR u metanolu su korišćeni za izradu kalibracionih krivih standarda, dok RR u serumu (kalibratori i kontrole) korišćeni za izradu kalibracionih krivih opterećenih seruma i kontrolna merenja. Radni rastvor IS dobijen je razblaživanjem OR verapamila u metanolu do koncentracije od  $200 \text{ ng/mL}$ . Svi OR ambroksola i IS u metanolu ili serumu čuvani su na  $-20^\circ\text{C}$  tri nedelje, dok su RR sveže pravljene po potrebi u toku radnog dana.

Za pripremu kalibratora (CCs) i kontrolnih uzoraka (QCs) primenjen je isti postupak: u staklene epruvete od  $10 \text{ mL}$  odmereno je po  $250 \mu\text{L}$  čistog seruma,  $25 \mu\text{L}$  IS ( $200 \text{ ng/mL}$ ) i  $25 \mu\text{L}$  RR ambroksola odgovarajuće koncentracije. Nakon vorteksiranja od  $30 \text{ sec}$ , dobijeni opterećeni serumi (OS) su čuvani na  $4^\circ\text{C}$  u toku radnog dana do faze ekstrakcije. Kalibraconi opterećeni serumi pripremljeni su na devet koncentracionih nivoa:  $0.5-2-5-10-20-50-100-150-200 \text{ ng/mL}$ , a kontrolni na četiri: donja granica kvantifikacije (LLOQ):  $0.5 \text{ ng/mL}$ , donji kontrolni nivo (Low Quality Control, LQC):  $20 \text{ ng/mL}$ , srednji kontrolni nivo (Medium Quality Control, MQC):  $100 \text{ ng/mL}$  i gornji kontrolni nivo (High Quality Control, HQC):  $200 \text{ ng/mL}$ . Svi uzorci su injektovani po šest puta na temperaturi autosemplera od  $15^\circ\text{C}$ .

U toku radnog dana redosled puštanja uzoraka na UHPLC-MS/MS sistemu, u jednoj sekvenci bio je: blank serum (ekstrakt seruma bez IS) → nulti serum (ekstrakt seruma sa IS) → kalibracioni uzorci → kontrolni uzorci → realni uzorci → blank serum → nulti serum.

### 3.4. Metode za pripremu bioloških uzoraka

U cilju dobijanja optimalnog postupka za pripremu uzoraka koji bi se primenjivao daljem procesu validacije analitičke metode, ispitana su tri postupka. Kriterijumi za prihvatanje optimalnog ekstrakcionog postupka bili su visoka čistoća uzoraka i visoki ekstrakcioni prinos.

### 3.4.1. Precipitacija proteina

Procedura: U devet šlifovanih epruveta odmereno je po 250  $\mu$ L seruma opterećenih ambroksolom na tri koncentraciona nivoa (3x1 mg/L, 3x5 mg/L i 3x10 mg/L), podešena je pH vrednost, a zatim je dodat 1 mL metanola. Za postizanje alkalne sredine (pH 9) na svim koncentracionim nivoima dodato je po 250  $\mu$ L boratnog pufera, 20  $\mu$ L 0.1 M HCl za kiselu sredinu (pH 3), i 250  $\mu$ L fosfatnog pufera za neutralnu sredinu (pH 7). Epruvete su zatvorene i mućkane 20 min na horizontalnoj mućkalici. Nakon toga izvršeno je centrifugiranje i odvajanje supernatanta u čiste epruvete. Supernatanti su upareni do suva u struji azota na 40°C i rekonstituisani u 250  $\mu$ L mobilne faze. Dobijeni uzorci su profiltrirani kroz 0.22  $\mu$ m špic-filter i po tri puta uzastopno injektovani u HPLC/PDA sistem. Merenje je vršeno u opsegu talasnih dužina od 200 – 600 nm, a kvantifikacija na 210 nm.

### 3.4.2. Tečno - tečna ekstrakcija

Procedura: U devet šlifovanih epruveta odmereno je po 250  $\mu$ L seruma opterećenih ambroksolom na tri koncentraciona nivoa (1 mg/L, 5 mg/L i 10 mg/L) i 250  $\mu$ L boratnog pufera (pH 9), a zatim dopunjene do 5 ml organskom smešom n-heksan/etar (1:1). Epruvete su mućkane na horizontalnoj mućkalici 20 min, a nakon toga centrifugirane. Gornji organski slojevi odvojeni su automatskom pipetom i propušteni kroz bezvodni natrijum sulfat u čiste epruvete, a zatim uparene do suva u struji azota na 40°C. Rekonstitucija je izvršena u 250  $\mu$ L mobilne faze. Uzorci su profiltrirani kroz 0.22  $\mu$ m špic-filter i po tri puta uzastopno injektovani u HPLC/PDA sistem. Merenje je vršeno u opsegu talasnih dužina od 200 – 600 nm, a kvantifikacija na 210 nm.

### 3.4.3. Tečno - čvrsta ekstrakcija

U eksperimentalnom radu ispitani su katjonski, anjonski i neutralni SPE kertridži različitih proizvođača (Waters® i Phenomenex®) na tri koncentraciona nivoa 1 mg/L, 5 mg/L i 10 mg/L. SPE kertridži su prvo postavljeni na stalak vakuum sistema kada-pumpa, jačine vakuuma od 5 – 10 mmHg. Variranjem jačine vakuuma određivana je brzina protoka rastvarača preko stacionarne faze i brzina eluiranja analita. Blagi vakuum

primenjen je u fazi nanošenja uzorka, ispiranja i eluiranja analita, srednji u fazi kondicioniranja i ekvibracije kertridža, a jači u fazi sušenja adsorbensa SPE kertridža. Sve SPE ekstrakcije izvršene su pet osnovnih faza:

- 1) kondicioniranje,
- 2) ekvibracija,
- 3) nanošenje uzorka,
- 4) uklanjanje nečistoća i
- 5) eluiranje željenih analita.

Dobijeni eluati upareni su do suva u struji azota na 40°C i rekonstituisan u 250 µL mobilne faze. Svi uzorci su pre injektovanja u aparat filtrirani kroz 0.22 µm špric-filtre.

**a) Neutralni reverzno-fazni SP kertridži**

Strata™-X Polymeric Reversed Phase solid phase extraction cartridges (30 mg, 1 mL), Phenomenex, USA

Procedura:

Pred-tretman uzorka: 250 µL seruma, 1:1 fosfatni pufer, pH 7

Kondicioniranje: 1 mL MeOH

Ekvibracija: 1 mL dejon. H<sub>2</sub>O, sušenje pod punim vakuumom 5 min

Nanošenje uzorka: 500 µL razblaženog seruma

Uklanjanje nečistoća: 1 ml 5% MeOH

Eluiranje analita: 2 x 500 µL 2% mravlja kiselina u MeOH

Oasis HLB cartridges , strongly hydrophilic, hydrophilic-lipophilic balance polymer, (30 mg, 1 mL), Waters, USA

Procedura:

Pred-tretman uzorka: 250 µL seruma, 1:1 boratni pufer, pH 9

Kondicioniranje: 1 mL MeOH

Ekvibracija: 1 mL dejon. H<sub>2</sub>O, sušenje pod punim vakuumom 5 min

---

Nanošenje uzorka: 500 µL razblaženog seruma

Uklanjanje nečistoća: 1 mL 5% MeOH

Eluiranje analita: 2 x 500 µL MeOH

#### **b) Katjonski jonoizmenjivački SP kertridži**

Strata™-X-C Polymeric Strong Cation Exchange solid phase extraction cartridges (30 mg, 1 mL), Phenomenex, USA

Procedura:

Pred-tretman uzorka: 250 µL seruma, 1:1 fosfatni pufer, pH 6.7

Kondicioniranje: 1 mL MeOH

Ekvilibracija: 1 mL 0.1N HCl, sušenje pod punim vakuumom 5 min

Nanošenje uzorka: 500 µL razblaženog seruma

Uklanjanje nečistoća: 1 mL 0.1N HCl

Eluiranje analita (I): 1 mL 0.1N HCl u MeOH

Eluiranje analita (II): 2 x 500 µL 5% NH<sub>4</sub>OH u 90:10 MeOH/ACN

Oasis MCX cartridges, mixed-mode, reversed-phase/strong cation-exchange cartridges, (30 mg, 1 mL), Waters, USA

Procedura:

Pred-tretman uzorka: 250 µL seruma, 1:1 fosfatni pufer, pH 6.7

Kondicioniranje: 1 mL MeOH

Ekvilibracija: 1 mL dejon. H<sub>2</sub>O, sušenje pod punim vakuumom 5 min

Nanošenje uzorka: 500 µL razblaženog seruma

Uklanjanje nečistoća: 1 mL 2% mravlja kiselina

Eluiranje analita (I): 2 x 500 µL MeOH

Eluiranje analita (II): 2 x 500 µL 5% NH<sub>4</sub>OH u MeOH



**c) Anjonski jonoizmenjivački SP kertridži**

Strata™-X-A Polymeric Strong Anion Exchange solid phase extraction cartridges (30 mg, 1 mL), Phenomenex, USA

Procedura:

Pred-tretman uzorka: 250 µL seruma, 1:1 fosfatni pufer, pH 7

Kondicioniranje: 1 mL MeOH

Ekvilibracija: 1 mL fosfatnog pufera, pH 7, sušenje pod punim vakuumom 5 min

Nanošenje uzorka: 500 µL razblaženog seruma

Uklanjanje nečistoća: 1 mL fosfatnog pufera, pH 7.0

Eluiranje analita (I): 2 x 500 µL MeOH

Eluiranje analita (II): 2 x 500 µL mravlja kiselina u MeOH

Oasis MAX, mixed-mode, reversed-phase/strong anion-exchange cartridges , (30 mg, 1 mL), Waters, USA

Procedura:

Pred-tretman uzorka: 250 µL seruma, 1:1 boratni pufer, pH 9

Kondicioniranje: 1 mL MeOH

Ekvilibracija: 1 ml dejon. H<sub>2</sub>O, sušenje pod punim vakuumom 5 min

Nanošenje uzorka: 500 µL razblaženog seruma

Uklanjanje nečistoća: 1 mL 5% NH<sub>4</sub>OH

Eluiranje analita (I): 2 x 500 µL MeOH

Eluiranje analita (II): 2 x 500 µL mravlja kiselina u MeOH

U svim ispitanim procedurama pripreme za kvantifikaciju ambroksola primenjena je metoda internog standarda. Ekstrakcioni (EP) prinosi izraženi su u procentima kao odnos srednje vrednosti površina pikova opterećenog seruma/IS i standarda /IS ambroksola na odovarajućim koncentracionim nivoima:

$$EP (\%) = Fos / Fstd \times 100$$

gde je  $F_{std} = P_{std} / P_{is}$ ,  $F_{os} = P_{os} / P_{is}$ ,  $P_{std}$  - površina pika standarda ambroksola,  $P_{os}$  - površina pika opterećenog seruma ambroksolom,  $P_{is}$  - površina pika internog standarda verapamila (IS).

### 3.5. Metode hromatografskog i spektrofotometrijskog određivanja

#### 3.5.1. HPLC/PDA

##### Tečna hromatografija visokih performansi sa *diode array* detektorom

Aparat: Tečni hromatograf visokih performansi sa *diode array* detektorom, HPLC/PDA, Alliance, Waters, USA,

Detector: 2998 Photodiode Array Detector, Waters, opseg merenja: 200-350 nm, rezolucija: 1.2 nm,

Pumpa: 2695 Separations Module, Waters

Kolona: Symmetry C<sub>8</sub> 4.6 mm x 250 mm, 5 μm, Waters,

Predkolona: Sentry Guard Symmetry C<sub>18</sub> Cartridge, Waters,

Temperature pećnice: 30°C,

Talaska dužina ( $\lambda$ ): 210 nm,

Zapremina injektovanja: 50 μL,

Softverski program: Empower Pro,

Mobilna faza: - rastvor A: H<sub>2</sub>O/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM, pH = 3.6 podešena 20% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>,

- rastvor B: Acetonitril, HPLC čistoće

Gradijent protoka mobilne faze:

Vreme (min)	Protok (mL/min)	% A	% B
0.0	1.0	85.0	15.0
6.0	1.0	65.0	35.0
25.0	1.5	20.0	80.0
28.0	1.5	20.0	80.0
28.5	1.5	85.0	15.0
50.0	0.2	85.0	15.0

HPLC/PDA tehnika upotrebljen je za ispitivanje ekstrakcionih prinosa različitih ekstrakcionih tehnika i izbor optimalne. Za ove potrebe konstruisana je pomoćna kalibraciona kriva sa tri kalibracione tačke (1-5-10 mg/L). Eksperimentalnim putem,

katjonska SP ekstrakcija je izabrana kao najopogodnija i korišćena je u daljoj UHPLC-MS/MS validacionoj proceduri i kvantifikaciji ambroksola u *in vivo* i *in vitro* ispitivanjima. Svi uzorci su u zapremini od 50 µL po tri puta je injektovan u HPLC/PDA sistem.

### 3.5.2. UHPLC- MS/MS

#### Ultra brza tečna hromatografija sa tandem masenim detektorom

Aparat: Ultra brzi tečni hromatograf sa tandem masenim detektorom, UHPLC- MS/MS, LCMS-8030, Shimadzu, Japan,

Binarna pumpa: LC-30AD Nexera, Liquid Chromatograph, Shimadzu, maks. radni pritisak: 1300 Bar

Pećnica: CTO-30A Nexera, Column Oven, Shimadzu, maks. temp. grejanja: 150°C, maks. dužina kolone 150 mm,

Degaser: DGU-20A Prominence, Degaser, Shimadzu

Komunikacioni interfejs: CBM-20A Prominence, Communications Bus Module UFLC, Shimadzu

Autosampler: SIL-30AC Nexera, Auto Sampler, Shimadzu, temp. opseg: 4 - 40°C

Maksimalni protok mobilne faze: 5 mL/min

Zapremina injekcione petlje: 50 µL

Zapremina miksera za mešanja rastvora i rastvarača: 20 µL

Opseg jonskih masa:  $m/z$  10 - 20 000

Maksimalna brzina *scan*-a: 15 000 u/min

Minimalno *Dwell/Pause* vreme: 1 msec

Temperaturani opseg grejnog bloka (HB): 50 - 500°C

Temperaturani opseg desolvacione kapilare (DL): 50 - 300°C, voltaže ± 100 V

Voltaža kapilarne cevi: ± 3-5 kV

Voltaža korona igle: ± 3-5 kV

Detektor: -1.6 do 2.0 kV

Nebulizer gas (N<sub>2</sub>): 0.5 - 3.0 L/min

Dry gas (N<sub>2</sub>): 3 - 20 L/min

CID gas (Ar): 17 - 230 kPa

Softverski program: Lab Solution,

Pred-kolona: Security Guard Ultra Cartridge UHPLC C<sub>8</sub> 2.1 x 4 mm, Phenomenex, USA,

Analitičke kolone:

Kinetex C<sub>18</sub> 2.1 mm x 50 mm, 1.3 μm, Phenomenex, USA,

Kinetex C<sub>18</sub> 2.1 mm x 50 mm, 1.7 μm, Phenomenex, USA,

Kinetex C<sub>18</sub> 2.1 mm x 50 mm, 2.6 μm, Phenomenex, USA

Kompletna validacija UHPLC-MS/MS metode za identifikaciju i kvantifikaciju ambroksola u serumu izvršena je na Shimadzu LCMS-8030 tandem-kvadropnom masenom spektrometru. Ovaj aparat opremljen je sa tri jonizaciona moda: hemijska jonizacija pod atmosferskim pritiskom (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI), elektrosprej jonizacija (Electrospray Ionization, ESI) i dualni mod jonizacije (Dual Ion Source, DUIS). U postupku razvijanja metode sva MS/MS merenja izvršena su u pozitivnom (+) ESI modu sa multi reakcionim monitoringom (MRM) i odgovarajućim jonskim tranzicijama za svaku komponentu. Selektovane MRM tranzicije u određenim vremenskim sekvencama bile su:  $m/z$  378.9→263.4 (0.4 - 1.2 min) za ambroksol i  $m/z$  455.2 →164.90 za IS (0.5 - 1.5 min).

Optimalno hromatografsko razdvajanje postignuto je na reverzno-faznoj Kinetex C<sub>18</sub>-koloni (2.1 mm x 50 mm, 1.3μm, Phenomenex, USA) u izokratskom modu sa mobilnom fazom metanol - 0.01% vodeni rastvor mravlje kiseline (90:10 v/v) i protoku mobilne faze od 0.3 mL/min. Mobilne faze su sveže pripremane svakog dana i pre upotrebe degazirane i filtrirane kroz 0.22 μm membranski filter papir. Operativna temperatura kolone bila je 40°C, a autosamplera 15°C.

Detektovani signal praćen je i procesuiran u Lab Solution računarskom programu. Identifikacija analita vršena je poređenjem retencionih vremena i selektovanih jonskih masa sa izmerenim vrednostima standarda, dok je metoda internog standarda primenjena za kvantifikaciju ambrksola u svim uzorcima.

### 3.6. Validacioni parametri

Validacioni parametri UHPLC-MS/MS metode za određivanje ambroksola u serumu određeni su u skladu sa međunarodnim ICH Q2A/Q2B priručnikom za validaciju bioanalitičkih metoda. Određeni su sledeći parametri: senzitivnost, linearnost, tačnost i preciznost, specifičnost, stabilnost uzoraka, carry-over efekat, matriks efekat, otpornost i izdržljivost metode. U sklopu validacije određeni su i apsolutni ekstrakcioni prinosi

ambroksola iz seruma nakon SPE ekstrakcije. Ekstrakcioni prinosi utvrđeni su na tri QCs koncentracina nivoa (20-100-200 ng/mL). Nakon dodavanja poznate koncentracije analita u *blank* serum, izvršena je SPE ekstrakcija uzoraka. Prinosi su izračunati poređenjem srednje površena pikova opterećenih seruma sa standardnim uzorcima odgovarajućih koncentracija. Svi QCs uzorci i referentni standardi injektovani su po šest puta u UHPLC-MS/MS sistem.

### 3.7. Eksperiment na animalnom modelu kunića - *in vivo* eksperiment

Ispitivanja *in vivo* sprovedena su na tri muška *Oryctolagus cuniculus* kunića težine od 3 – 3.5 kg, koji su čuvani i gajeni u vivarijumu Instituta Galenika a.d. Beograd. Eksperimenti su vršeni u skladu sa smernicama Dobre Laboratorijske Prakse ("Sl.glasnik RS" br. 84/04 i 85/05) [151] i Pravilnikom o upotrebi eksperimentalnih životinja koji važi od 11.6.2010. god., a po evropskim Etičkim principima rada na laboratorijskim životinjama (*European Community Guidelines, EEC Directive of 1986; 86/609/EEC*). Životinje su čuvane na kontrolisanoj sobnoj temperaturi od  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$  sa ciklusom svetlost-tama od 12 h i slobodnim pristupom hrani i vodi. Pre doziranja leka životinjama je preko noći uklonjena hrana, a ostavljen slobodan pristup vodi. Nakon jedne oralne doze od 30 mg ambroksola, uzorkovano je po 1 ml krvi iz ušne vene u vremenskim razmacima od 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6 i 24 h. Serumi su odvojeni centrifugiranjem na 7000 obrtaja, 10 min na sobnoj temperaturi i čuvani na  $-70^{\circ}\text{C}$  do početka analize. Nakon odmrzavanja uzoraka na sobnoj temperaturi, zapremine seruma od 0.25 mL su ekstrahovane utvrđenom SPE procedurom i kvantifikovane validiranom UHPLC-MS/MS metodom. Iz dobijenih koncentracija konstruisana je srednja FK kriva koncentracija-vreme i izračunati osnovni farmakokinetički parametri ambroksola kod kunića.

### 3.8. Disolucioni test ambroksola iz tablete - *in vitro* eksperiment

Testiranje brzine rastvarljivosti ambroksola iz tableta određena je u leku *Flavamed*<sup>®</sup>, Berlin-Chemie AG (Menarini Group), 20 tbl. x 30 mg ambroksol-hidrohlorida. Ostale pomoćne supstance u leku: laktoza, monohidrat, kukuruzni skrob, celuloza u prahu, kroskarmeloza- natrijum, Polividon K30, magnezijum-stearat.

Prema smernicama evropske farmakopeje oslobađanje ambroksola iz tablete u *in vitro* uslovima ispitano je u tri medijuma (sink uslovi - oponašanje uslova u gastrointestinalnom traktu) sa po 2 tablete. Količine ekvivalentene 60 mg leka postavljene su u tri laboratorijske čaše sa 1000 mL fosfatnog pufera na pH 6.8, acetatnog pufera na pH 4.5 i 0.1 M HCl na pH 1.2. Čaše su zatim postavljene na magnetnu mešalicu sa brzinom 50 obrtaja/min i inkubirane na temperaturi  $37 \pm 5$  °C narednih 6 h. U određenim vremenskim intervalima 1-3-5-10-15-30-60-120-240-360 min uzorkovano je po 0.5 mL rastvora, razblaženo (1 000 puta) i profiltrirano kroz 0.22  $\mu\text{m}$  špic-filter, a zatim analizirano na UHPLC-MS/MS u zapremini od 2  $\mu\text{L}$ . Nakon uzorkovanja, zapremine su nadoknađene svežim rastvorom.

### 3.9. Farmakokinetička i statistička analiza podataka

Statistička analiza validacionih parametara je urađena u programu Microsoft Office Excell 2010. Pearson-ova korelacija je korišćena za evaluaciju odnosa površina pikova ambroksol/IS i koncentracije ambroksola. Verovatnoća  $p < 0.001$  je smatrana statistički značajnom. Sve vrednosti su izražene kao srednja vrednost  $\pm$  SD i RSD (%). Za kalibracione krive potvrđena je homosedastičnost primenom Hartlijevog testa, a nezavisnost varijansi Durbin-Vatsonovim autokorelacionim testom. Normalna raspodela reziduala proverena je Šapiro-Vilk testom normalnosti. Za kalibracione krive kalibratora odradjen je i test poredjenja dobijene i empirijske krive odnosno eng. *Lack of Fit Test*.

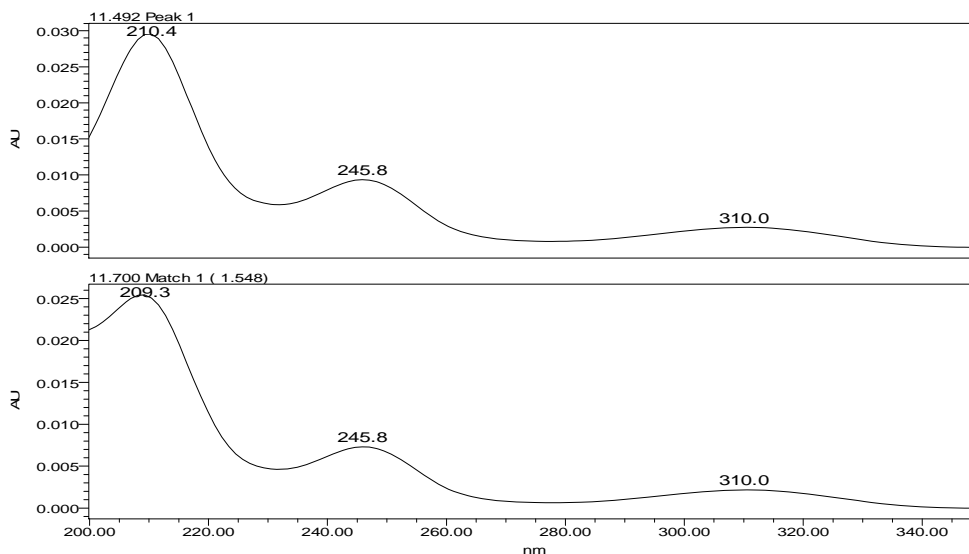
Farmakokinetički parametri ambroksola u serumu kunića određeni su računarskim programom Thermo Scientific™ Kinetica Software for PK/PD Data Analysis (version 5.0 Thermo Electron Corporation, USA).

## 4. REZULTATI

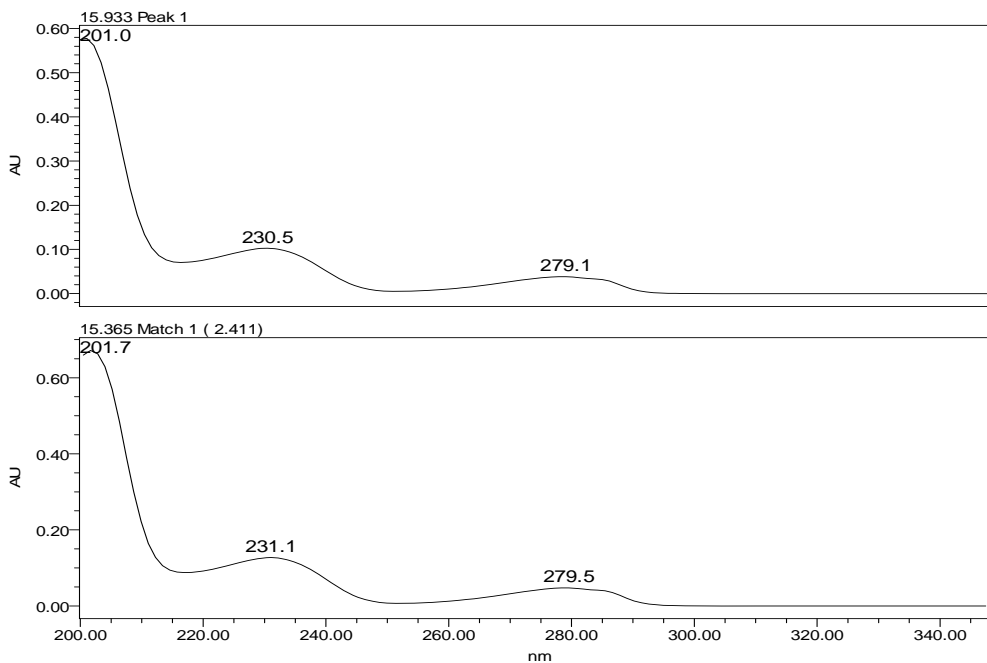
### 4.1. REZULTATI HROMATOGRAFSKIH I SPEKTROFOTOMETRIJSKIH PARAMETARA

#### 4.1.1. HPLC/PDA

HPLC/PDA metoda je u eksperimentalnom delu ovog rada primenjena kao pomoćna analitička metoda. Primenjena je za ispitivanje najpogodnijeg načina za pripremu uzoraka koji bi se kasnije primenio u postupku validacije UHPLC - MS/MS metode. Za tu namenu konstruisana je posebna kalibraciona kriva standarda ambroksola na tri koncentraciona nivoa 1-5-10 mg/L sa 10 mg/L verapamila kao internog standarda (IS). Uzorci su po tri puta mereni po već postojećoj, standardizovanoj HPLC metodi i C-8 hromatografskoj koloni. Uslovi metode su detaljno opisani u eksperimentalnom delu teze. Identifikacija analita vršena je pomoću retencionih vremena (Rt) i snimljenih UV spektara koji su poređeni sa spektrima korisničke UV/VIS biblioteke. UV apsorpcioni spektri standarda 10 mg/L u metanolu prikazani su na slici 4.1.1.1. za ambroksol i slici 4.1.1.2. za IS (verepamil) u odnosu na biblioteku.

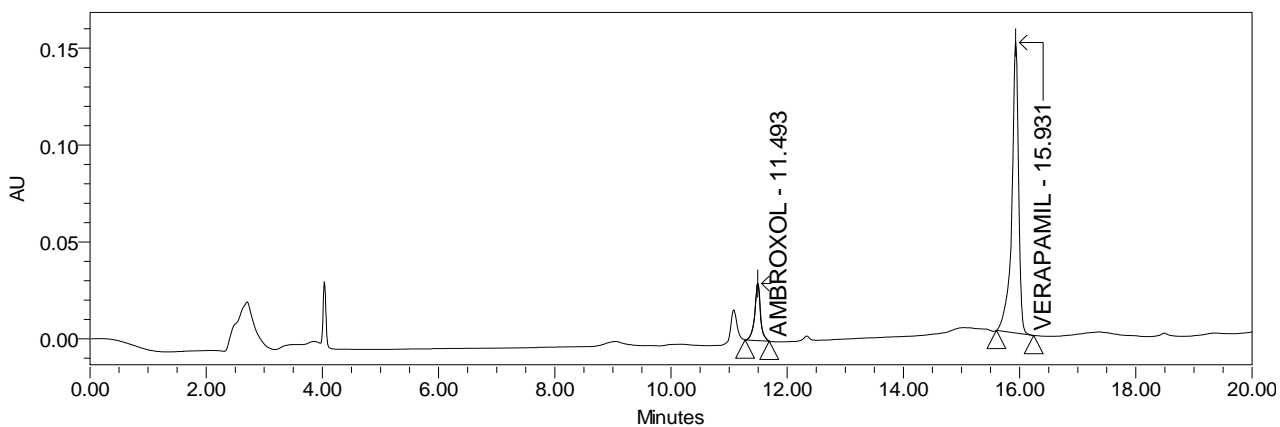


Slika 4.1.1.1. UV apsorpcioni spektar standarda ambroksol hidrohlorida, 10 mg/L u metanolu u odnosu na biblioteku UV/VIS spektara



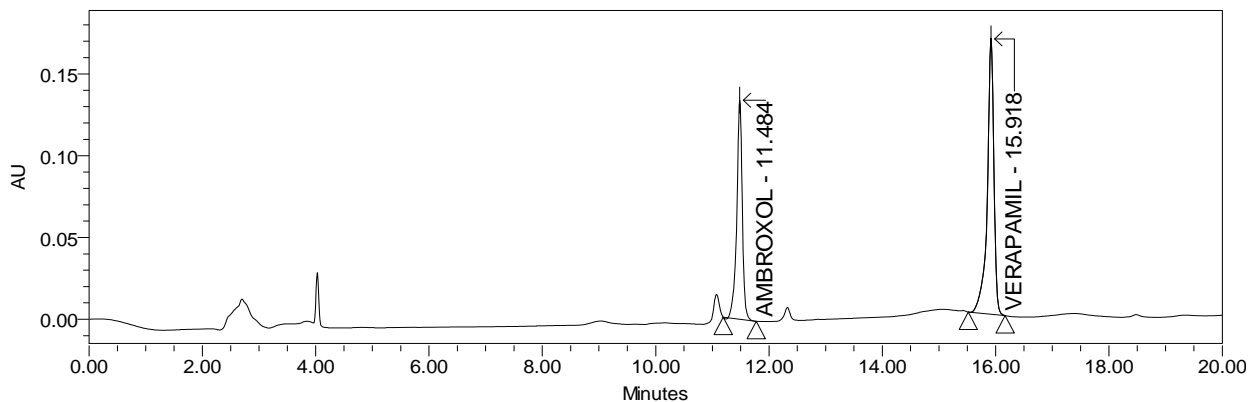
Slika 4.1.1.2. UV apsorpcioni spektar standarda verapamil hidrohlorida, 10 mg/L u metanolu u odnosu na biblioteku UV/VIS spektara

Odgovarajući HPLC hromatogrami standarda ambroksola na koncentracijama 1-5-10 mg/L ( $R_t = 11.48$  min) i IS, verapamila 10 mg/L ( $R_t = 15.93$  min) na talasnoj dužini,  $\lambda = 210$  nm, prikazani su redom na slikama 4.1.1.3., 4.1.1.4. i 4.1.1.5.

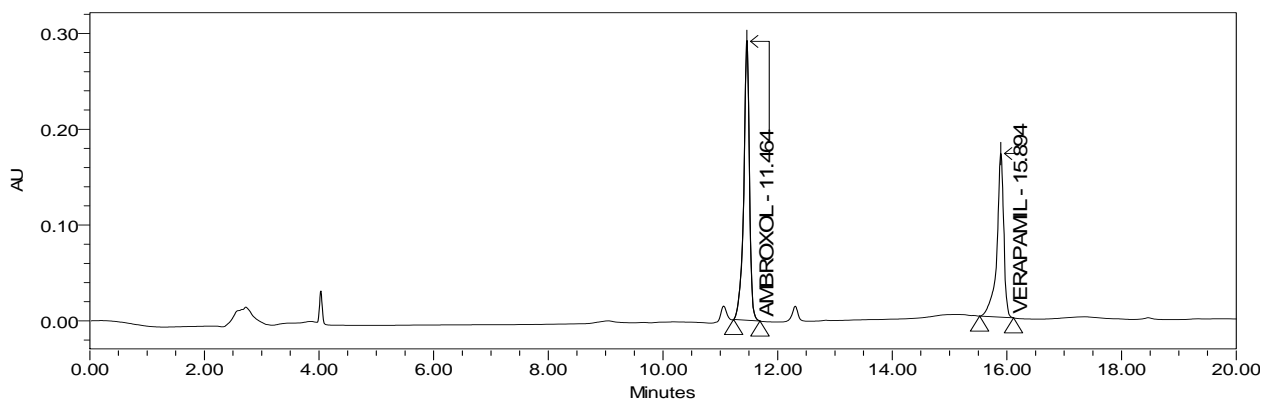


Slika 4.1.1.3. Hromatogram standarda ambroksola (1 mg/L) i verapamila (IS, 10 mg/L) na 210 nm; HPLC/PDA



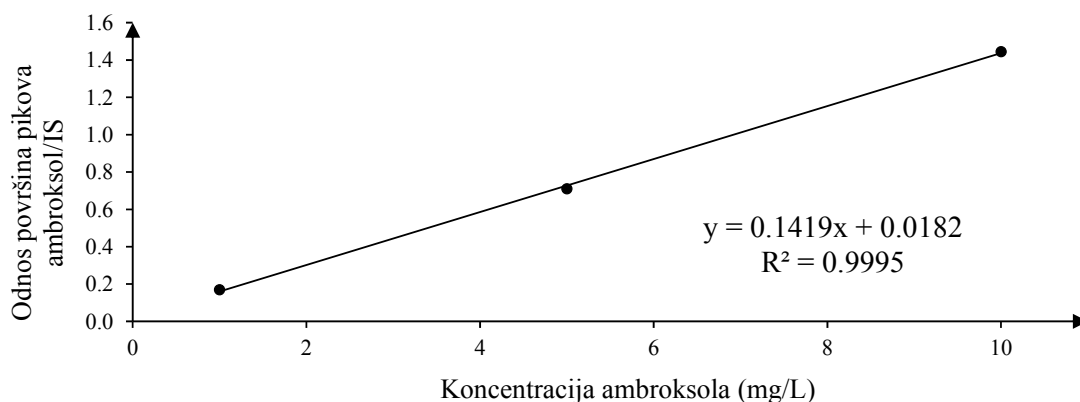


Slika 4.1.1.4. Hromatogram standarda ambroksola (5 mg/L) i verapamila (IS, 10 mg/L) na 210 nm; HPLC/PDA



Slika 4.1.1.5. Hromatogram standarda ambroksola (10 mg/L) i verapamila (IS, 10 mg/L) na 210 nm; HPLC/PDA

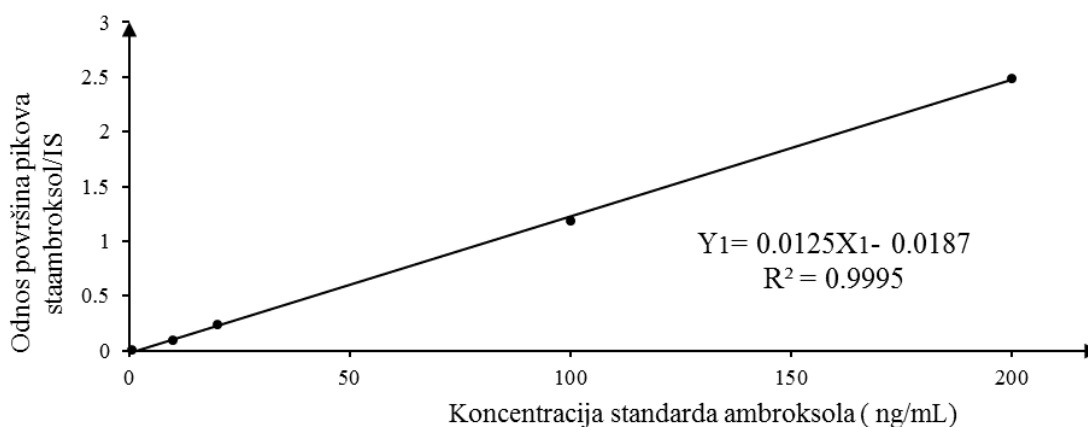
Na osnovu dobijenih srednjih vrednosti površina pikova analita konstruisana je kalibraciona kriva  $F = f(C)$ , gde je F odnos površina pikova ambroksola i IS, a C koncentracija ambroksola, slika 4.1.1.6. Dobijena kalibraciona kriva može se predstaviti jednačinom  $y = 0.1419x + 0.0182$  sa visokim stepenom korelacije  $r = 0.9995$ . Kvantifikacija ambroksola u ispitivanim ekstraktima vršena je pomoću kalibracione krive i primenom metode internog standarda.



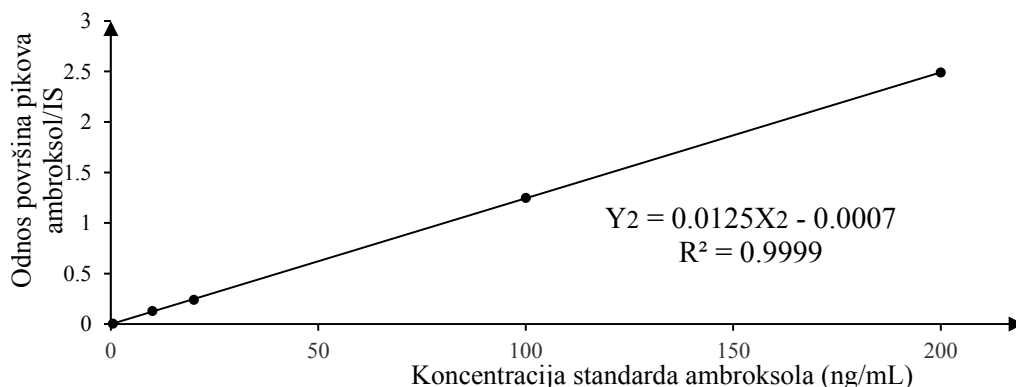
Slika 4.1.1.6. Kalibraciona kriva za određivanje ambroksola metodom internog standarda; HPLC/PDA

#### 4.1.2. UHPLC

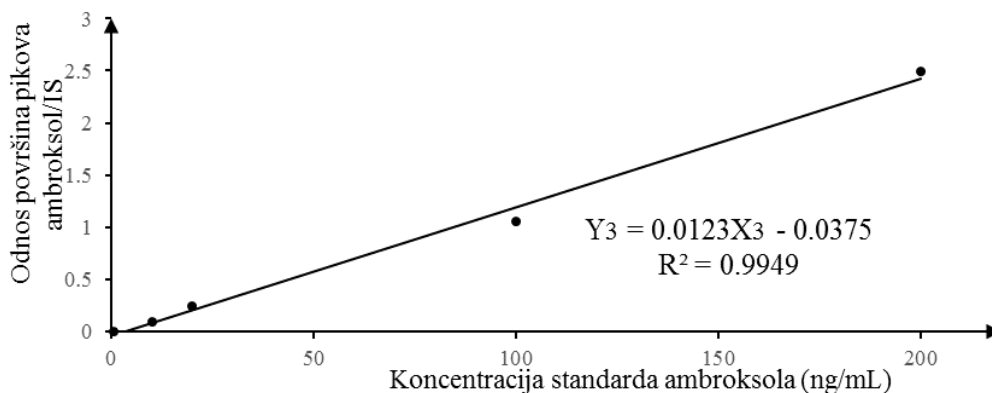
Nakon optimizacije parametara ultra-brzog tečnog hromatografa sa tandem masenim detektorom konstruisane su tri kalibracione krive standarda ambroksola na pet koncentracionih nivoa 0.5-10-20-100-200 ng/mL i 20 ng/mL IS (verapamil), koje su prikazane na slici 4.1.2.1. za 1STD, slici 4.1.2.2. za 2STD i slici 4.1.2.3. za 3STD kalibracionu krivu.



Slika 4.1.2.1. Kalibraciona kriva 1STD standarda ambroksola (0.5-10-20-100-200 ng/mL) u odnosu na IS (20 ng/mL verapamila); UHPLC-MS/MS



Slika 4.1.2.2. Kalibraciona kriva 2STD standarda ambroksola (0.5-10-20-100-200 ng/mL) u odnosu na IS (20 ng/mL verapamila); UHPLC-MS/MS



Slika 4.1.2.3. Kalibraciona kriva 3STD standarda ambroksola (0.5-10-20-100-200 ng/mL) u odnosu na IS (20 ng/mL verapamila); UHPLC-MS/MS

Linearna korelacija dobijenih kalibracionih krivih izražena je odgovarajućim koeficijentima korelacije ( $r$ ) i opisana pripadajućim jednačinama prave  $y = f(x)$ , gde je  $y$  - odnos površina pikova ambroksola i IS ( $F$ ) a  $x$  - koncentracija ambroksola ( $C$ ). U tabeli 4.1.2.1. su prikazane pojedinačne i srednje vrednosti  $\pm$  SD nagiba prave prema  $x$ -osi ( $A$ ), odsečka na  $y$ -osi ( $B$ ) i korelacionog koeficijenta ( $r$ ) za kalibracione krive 1STD, 2STD, 3STD i STD<sub>Sr</sub>.

**Tabela 4.1.2.1.** Rezultati regresione analize kalibracionih krivih 1, 2 i 3 STD standarda ambroksola na pet koncentracionih nivoa 0.5-10-20-100-200 ng/mL, UHPLC-MS/MS

Kalibraciona kriva	Nagib (A)	Odsečak (B)	Korelacioni koeficijent (r)
1STD	0.0125	-0.0187	0.9995
2STD	0.0125	-0.0007	0.9999
3STD	0.0123	-0.0375	0.9949
STD <sub>Sr</sub>	0.0124	-0.0190	0.9981
SD	0.0001	0.0184	0.0028

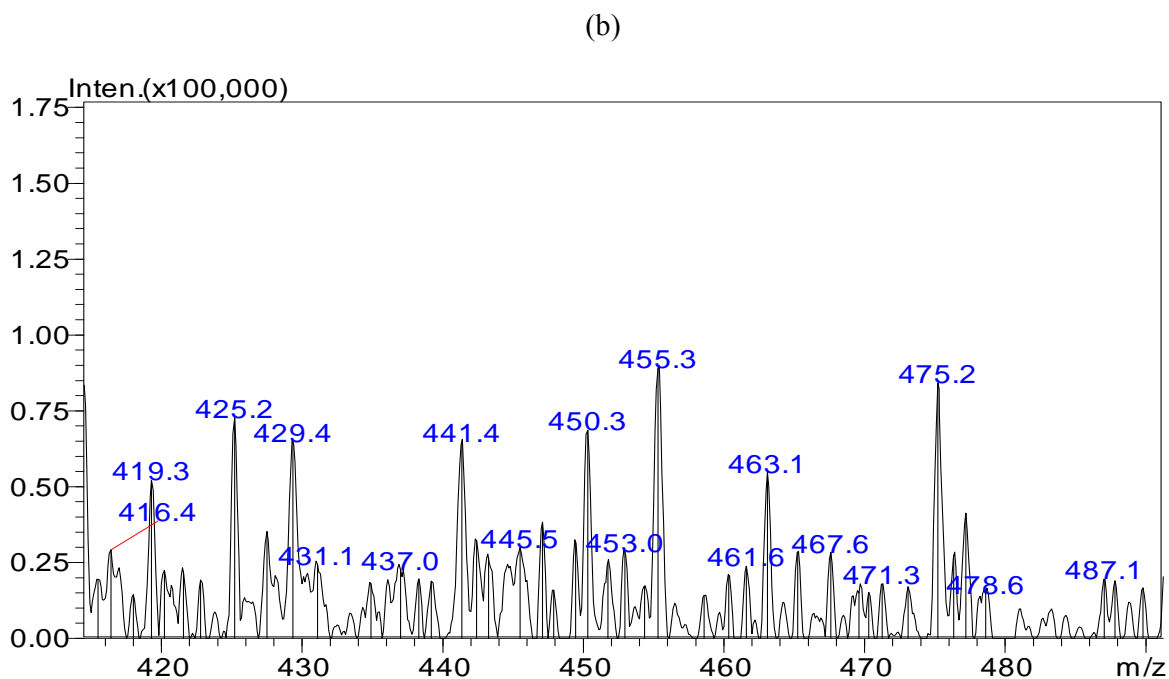
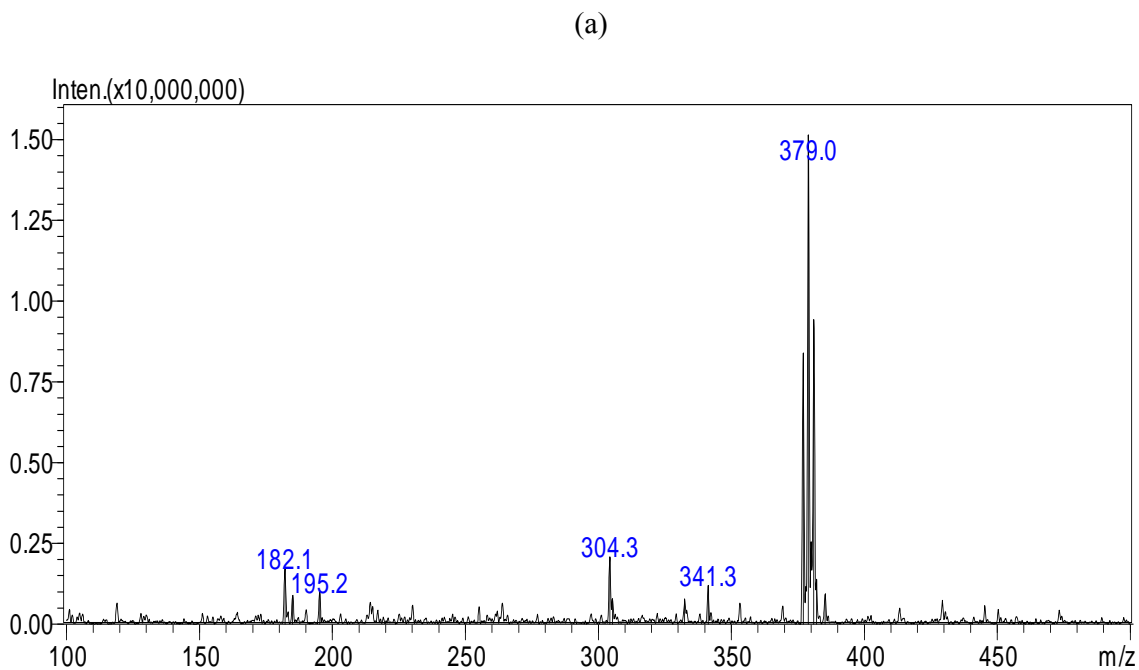
*SD, standardna devijacija; STD<sub>Sr</sub>, srednja kalibraciona kriva standarda*

#### 4.1.3. MS/MS spektrometrija

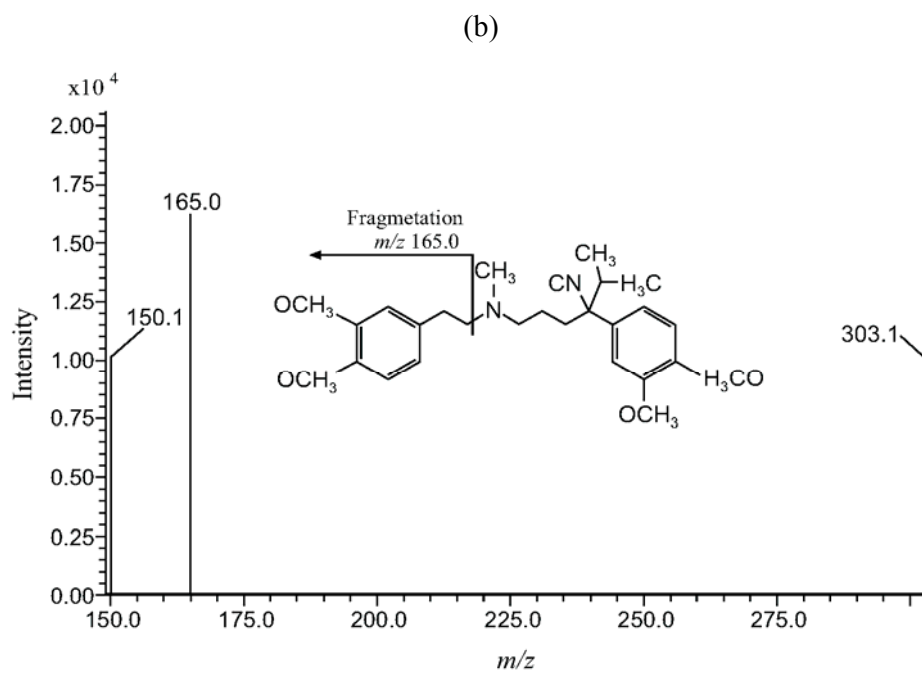
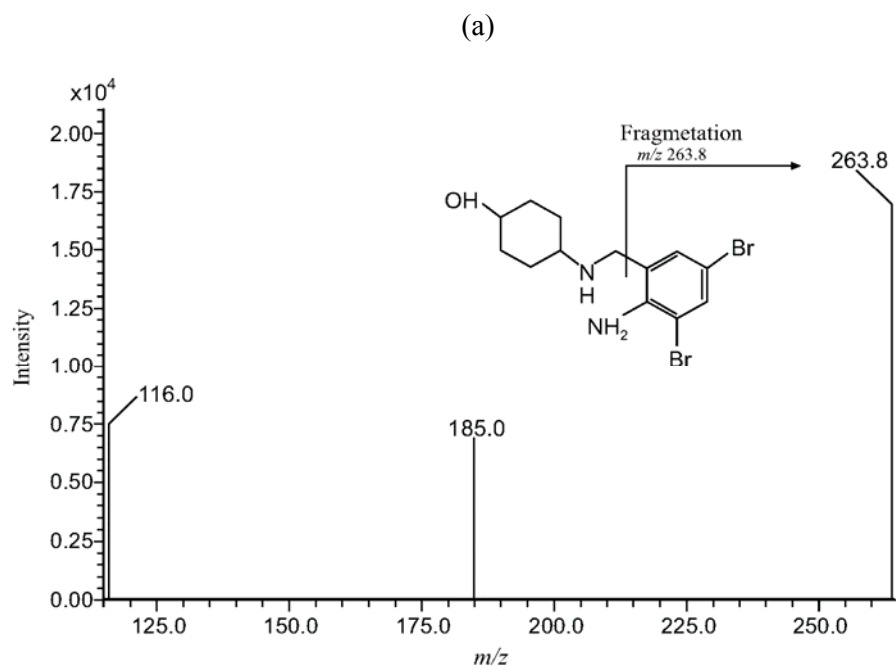
Optimizacija tandem-masenog spektrometra izvršena je u dve faze, opšta i specifična kalibracija aparata. Opšta kalibracija izvršena je komercijalnim rastvorom poletilen glikola, a specifična referentnim standardima analita visoke čistoće. Izabrani su najpodesniji tip i vrsta jonskog izvora, protoci nosećeg i pomoćnog gasa, teperature i naponi detektora, kao i MRM tranzicije analita (tabela 4.1.3.1.). Snimljeni su totalni jonski hromatogrami (TIC) standarda u širem opsegu jonskih masa  $m/z$  100 – 600 u *full scan* modu i prikazani na slici 4.1.3.1 (a) za ambroksol i (b) za IS. Totalni jonski hromatogrami služili su za određivanje protonizovanog  $[M+H]^+$  joni analita koji su dalje praćeni u MRM modu kao prekursor joni. U multi-reakcionom modu utvrđene su odgovarajuće masene tranzicije  $m/z$  378.9→263.8 za ambroksol i  $m/z$  455.3→165.0 za IS (Slika 4.1.3.2.). Optimizovana MS/MS detekcija je najpre primenjena u postupku validacije analitičke metode, a zatim u farmakokinetičkim i disolucionim ispitivanjima. Tipični MRM jonski hromatogrami analita prikazani su na slici 4.1.3.3.

**Tabela 4.1.3.1.** Vrednosti *Pause Time* i *Dwell Time*, napona Q1 i Q3 kvadrupola i kolizionih energija (CE) za jonske tranzicije ambroksola,  $m/z$  378.9→263.8 i verapamila (IS),  $m/z$  455.3 →164.90

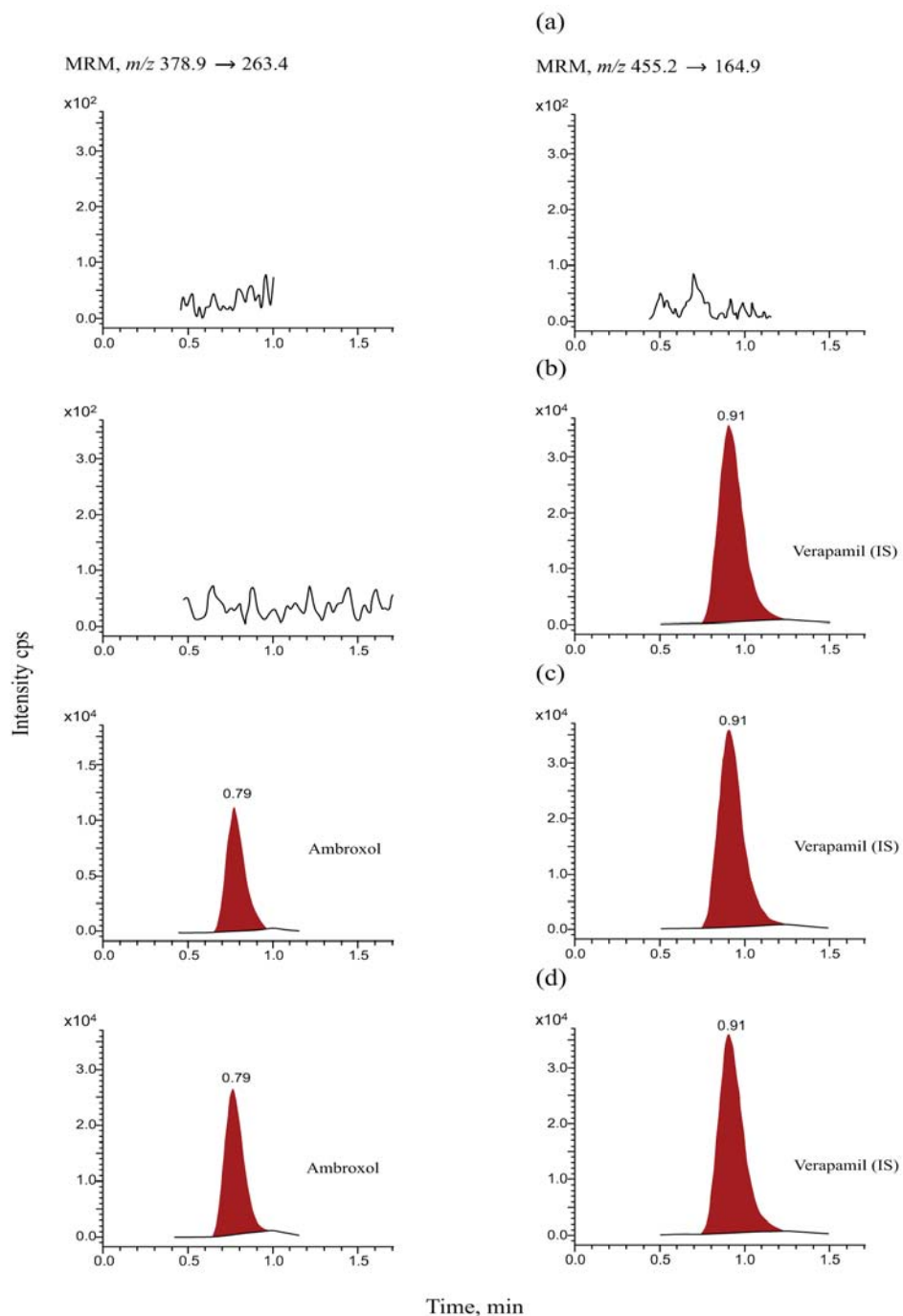
Jonske tranzicije	Pause Time (msec)	Dwell Time (msec)	Q3 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
Ambroksol $m/z$ 378.9→263.4	1	200	-28	- 20	- 18
Interni standard $m/z$ 455.2 →164.90	2	200	-11	- 25	- 10



Slika 4.1.3.1. TIC jonski hromatogrami sa najintezivnijim jonima (a)  $m/z$  378.9 za ambroksol i (b)  $m/z$  455.3 za IS (verapamil) pri koncentraciji 100 mg/L



Slika 4.1.3.2. Tipični MS produkt-jon maseni spektri protonizovanog molekuskog jona (a) ambroksola,  $m/z$  378.9 $\rightarrow$ 263.8 i (b) IS, verapamila,  $m/z$  455.3 $\rightarrow$ 165.0 u MRM modu sa naznačenim fragmentacijama.



Slika 4.1.3.3. MRM jonski hromatogram a) ekstrakta seruma bez internog standarda (blank), b) ekstrakta seruma sa internim standardom (nula, zero), c) ekstrakta opterećenog seruma, 20 ng/mL ambroksol ( $m/z$  378.9 $\rightarrow$ 263.8) i 20 ng/mL IS ( $m/z$  455.3 $\rightarrow$ 164.9) i d) ekstrakta seruma kunića 4h nakon primene jedne oralne doze ambroksola od 30 mg.



## 4.2. REZULTATI PRIPREME UZORAKA SERUMA

Izolovanje ambroksola iz seruma ispitano je na tri različita načina sa ciljem utvrđivanja optimalnog načina koji be se primenjivao u daljem postupku validacije UHPLC-MS/MS metode. Ispitane su precipitacija proteina (PP), tečno - tečna ekstrakcija (TTE) i tečno - čvrsta ekstrakciji (SPE) na tri koncentraciona nivoa ambroksola 1-5-10 mg/L. Testirana je ekstrakciona efikasnost različitih organskih rastvarača na različitim pH vrednostima u skladu sa fizičko – hemijskim osobinama analita. Koncentracije ambroksola određene su primenom već postavljene HPLC metode na talasnoj dužini,  $\lambda=210$  nm (uslovi metode opisani su u eksperimentalnom delu teze). Rezultati srednjih ekstrakcionih prinosa na tri koncentraciona nivoa 1-5-10 mg/L (n=3) redom su prikazani u tabelama 4.2.1, 4.2.2 i 4.2.3. Ekstrakcioni prinosi izraženi su procentualno (%) kao maseni udeo izmerene u odnosu na tačnu vrednost.

**Tabela 4.2.1.** Srednje vrednosti ekstrakcionih prinosa seruma opterećenih ambroksolom 1 mg/L ( $\lambda=210$  nm, n=3) primenom metode precipitacije, tečno – tečne ekstrakcije i tečno – čvrste ekstrakcije, HPLC/PDA

Način pripreme uzorka		Izmerena koncentracija u opterećenom seruma (1 mg/L)	Ekstrakcioni prinos (%)
PP	A	0.59	59
	N	0.91	91
	K	<0.2	<20
TTE	A	0.70	70
	N	0.49	49
	K	<0.2	<20
SPE	Strata, Phenomenex	XC*	89
		XA**	<20
		X***	40
	Oasis, Waters	MCX*	85
		MAX**	<0.2
		HLB***	52

\*katjon-jonoizmenjivački SPE kertridži; \*\*anjon-jonoizmenjivački SPE kertridži; \*\*\*neutralni SPE kertridži; PP, precipitacija proteina; TTE, tečno-tečna ekstrakcija; SPE (solid phase extraction), tečno-čvrsta ekstrakcija; A, alkalna sredina; N, neutralna sredina; K, kisela sredina

**Tabela 4.2.2.** Srednje vrednosti ekstrakcionih prinosa seruma opterećenih ambroksolom 5 mg/L ( $\lambda=210$  nm, n=3) primenom metode precipitacije, tečno – tečne ekstrakcije i tečno – čvrste ekstrakcije, HPLC/PDA

Način pripreme uzorka		Izmerena koncentracija u opterećenom serumu (5 mg/L)	Ekstrakcioni prinos %	
PP	A	3.05	61	
	N	4.75	95	
	K	<1.0	<20	
TTE	A	3.75	75	
	N	2.65	53	
	K	<1.0	<20	
SPE	Strata, Phenomenex	XC*	4.64	93
		XA**	<1.0	<20
		X***	2.25	45
	Oasis, Waters	MCX*	4.25	85
		MAX**	<1.0	<20
		HLB***	2.75	55

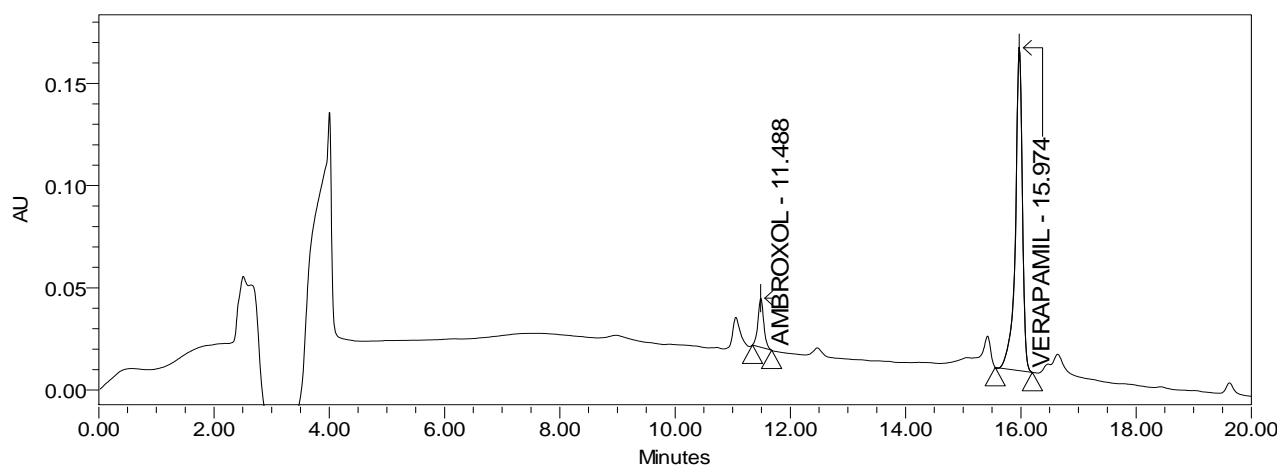
\*katjon-jonoizmenjivački SPE kertridži; \*\*anjon-jonoizmenjivački SPE kertridži; \*\*\*neutralni SPE kertridži; PP, precipitacija proteina; TTE, tečno-tečna ekstrakcija; SPE (solid phase extraction), tečno-čvrsta ekstrakcija; A, alkalna sredina; N, neutralna sredina; K, kisela sredina

**Tabela 4.2.3.** Srednje vrednosti ekstrakcionih prinosa seruma opterećenih ambroksolom 10 mg/L ( $\lambda=210$  nm, n=3) primenom metode precipitacije, tečno – tečne ekstrakcije i tečno – čvrste ekstrakcije, HPLC/PDA

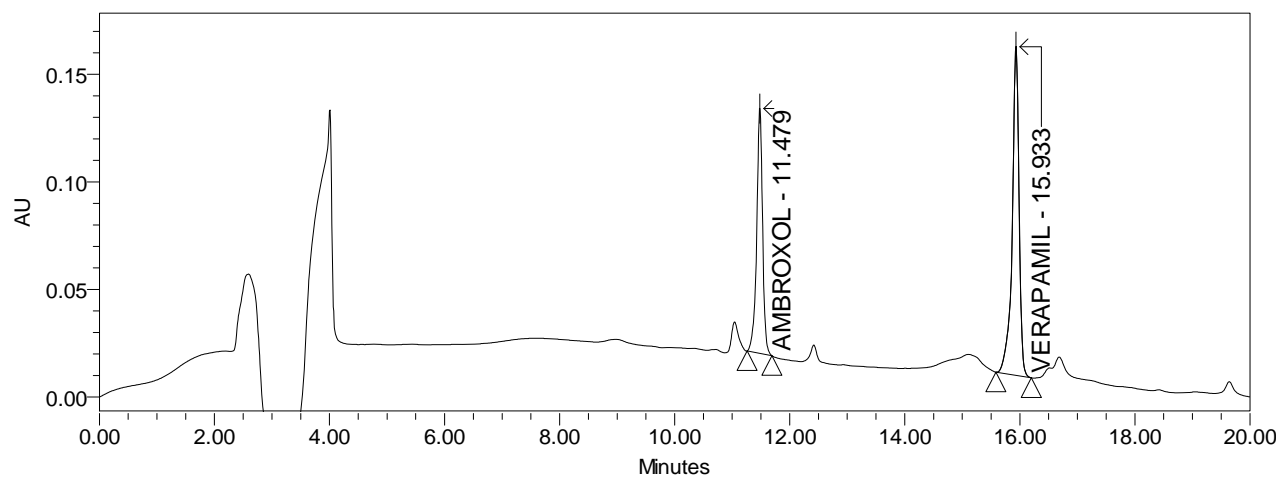
Način pripreme uzorka		Izmerena koncentracija u opterećenom serumu (10 mg/L)	Ekstrakcioni prinos %	
PP	A	6.5	65	
	N	9.6	96	
	K	<2.0	<20	
TTE	A	7.5	75	
	N	6.0	60	
	K	<2.0	<20	
SPE	Strata, Phenomenex	XC*	9.2	92
		XA**	<2.0	<20
		X***	5.5	50
	Oasis, Waters	MCX*	8.6	86
		MAX**	<2.0	<20
		HLB***	5.5	55

\*katjon-jonoizmenjivački SPE kertridži; \*\*anjon-jonoizmenjivački SPE kertridži; \*\*\*neutralni SPE kertridži; PP, precipitacija proteina; TTE, tečno-tečna ekstrakcija; SPE (solid phase extraction), tečno-čvrsta ekstrakcija; A, alkalna sredina; N, neutralna sredina; K, kisela sredina

Reprezentativni HPLC hromatogrami seruma opterećenih ambroksolom prikazani su na slici 4.2.1. nakon PP (1 mg/L, 10 mg/L IS) i slici 4.2.21 nakon katjon-jonoizmenjivačke SPE ekstrakcije (5 mg/L, 10 mg/L IS).



Slika 4.2.1. Hromatogram seruma opterećenog ambroksolom (1 mg/L) i IS (10mg/L) nakon precipitacije proteina na 210 nm; HPLC/PDA



Slika 4.2.2. Hromatogram seruma opterećenog ambroksolom (5 mg/L) i IS (10mg/L) nakon tečno-čvrste ekstrakcije (Strata-XC) na 210 nm; HPLC/PDA

### 4.3. REZULTATI ODREĐIVANJA VALIDACIONIH PARAMETARA

#### 4.3.1. Kalibracione krive

Kalibracione krive su konstruisane pomoću standardnih rastvora (STDs,  $S=1-5$ ) i opterećenih seruma– kalibratora ( $CC_{S,S=1-9}$ ). Rastvori opterećenih seruma napravljeni su na devet koncentracionih nivoa 0.5-2-5-10-20-50-100-150-200 ng/mL (ne uključujući nulu), a standarda na pet 0.5-10-20-100-200 ng/mL mbroksola. U tri različita dana izvršena su merenja sa po šest ponavljanja po koncentraciji ( $n=6$ ) u sekvenci blank uzorak - nulti - standardi - kalibratori - blank uzorak.

Na svakom koncentracionom nivou kalibratora utvrđena je tačnost i preciznost merenja i prikazana u tabelama 4.3.1.1. za 1CC, 4.3.1.2. za 2CC i 4.3.1.3. za 3CC kalibracionu krivu.

**Tabela 4.3.1.1.** Tačnost i preciznost merenja kalibratora kalibracione krive ICC za devet koncentracionih nivoa ambroksola 0.5-2-5-10-20-50-100-150-200 ng/mL, n=6

Aktuelna konc. (ng/mL)	P <sub>amb</sub>	P <sub>IS</sub>	F	Izmerena konc. ** (ng/mL)	Tačnost (%)
0.5	1805	378227	0.0048	0.53	105.16
	1811	379589	0.0048	0.53	105.14
	1908	379995	0.0050	0.55	109.14
	2014	373914	0.0054	0.57	114.98
	2564	371203	0.0069	0.70	139.32
	2695	370144	0.0073	0.73	145.30
Mean* (n=6)	2132	375512	0.0057	0.60	119.84
SD			0.0011	0.09	17.87
RSD %			19.633	14.91	14.91
2	9817	389908	0.0252	2.16	107.91
	9025	389642	0.0232	2.00	99.85
	11038	380321	0.0290	2.47	123.29
	10984	389651	0.0282	2.40	119.96
	9600	359964	0.0267	2.28	113.88
	9791	340847	0.0287	2.44	122.10
Mean* (n=6)	10535	385705	0.0268	2.29	114.50
SD			0.0023	0.18	9.20
RSD %			8.5754	8.04	8.04
5	25958	400251	0.0649	5.33	106.65
	25730	409671	0.0628	5.17	103.37
	24869	400172	0.0621	5.12	102.31
	24061	414489	0.0580	4.79	95.76
	24001	419173	0.0573	4.72	94.49
	25998	403582	0.0644	5.30	105.95
Mean* (n=6)	25102	407889	0.0616	5.07	101.42
SD			0.0032	0.26	5.15
RSD %			5.2232	5.07	5.07
10	44945	369351	0.1217	9.88	98.79
	46121	371889	0.1240	10.07	100.65
	46200	353247	0.1308	10.61	106.07
	46228	367744	0.1257	10.20	102.01
	45947	363711	0.1263	10.25	102.50
	47708	371278	0.1285	10.42	104.24
Mean* (n=6)	46191	366203	0.1262	10.24	102.38
SD			0.0032	0.26	2.57
RSD %			2.5486	2.51	2.51
20	101773	397002	0.2564	20.65	103.26
	104446	403383	0.2589	20.86	104.29
	98295	396711	0.2478	19.97	99.83
	98198	390920	0.2512	20.24	101.20
	98938	390633	0.2533	20.41	102.03
	100050	393305	0.2544	20.49	102.47
Mean* (n=6)	100283	395325	0.2537	20.44	102.18
SD			0.0039	0.31	1.56
RSD %			1.5406	1.53	1.53

**Nastavak Tabele 4.3.1.1.**

Aktuelna konc. (ng/mL)	$P_{amb}$	$P_{IS}$	F	Izmerena konc.** (ng/mL)	Tačnost (%)
50	251435	422474	0.5951	47.76	95.51
	253952	422461	0.6011	48.23	96.47
	256564	428705	0.5985	48.02	96.04
	259785	423035	0.6141	49.27	98.54
	255499	429942	0.5943	47.69	95.37
	259925	433976	0.5989	48.06	96.12
Mean* (n=6)	256193	426765	0.6003	48.17	96.34
SD			0.0072	0.58	1.15
RSD %			1.1994	1.20	1.20
100	482913	380903	1.2678	101.57	101.57
	489802	386289	1.2680	101.58	101.58
	470199	367374	1.2799	102.54	102.54
	472589	371301	1.2728	101.97	101.97
	481018	379924	1.2661	101.43	101.43
	450256	355489	1.2666	101.47	101.47
Mean* (n=6)	474462	373546	1.2702	101.76	101.76
SD			0.0053	0.43	0.43
RSD %			0.4186	0.42	0.42
150	729352	394807	1.8474	147.93	98.62
	721568	394804	1.8277	146.36	97.57
	725914	394214	1.8414	147.46	98.31
	726006	394226	1.8416	147.47	98.31
	725591	393832	1.8424	147.53	98.36
	727840	396577	1.8353	146.97	97.98
Mean* (n=6)	726045	394743	1.8393	147.29	98.19
SD			0.0069	0.55	0.37
RSD %			0.3733	0.37	0.37
200	837357	331453	2.5263	202.25	101.12
	847459	337971	2.5075	200.74	100.37
	841928	333958	2.5211	201.83	100.91
	846517	337130	2.5110	201.02	100.51
	840973	334475	2.5143	201.29	100.64
	853384	340398	2.5070	200.71	100.35
Mean* (n=6)	844603	335897	2.5145	201.31	100.65
SD			0.0078	0.62	0.31
RSD %			0.3083	0.31	0.31

\*srednja vrednost; \*\*koncentracija ambroksola izračunata prema  $Y_1=0.0125X_1-0.0018$ ;  $P_{amb}$  - površina pika ambroksola;  $P_{IS}$  - površina pika internog standarda;  $F=P_{amb}/P_{IS}$

**Tabela 4.3.1.2.** Tačnost i preciznost merenja kalibratora kalibracione krive 2CC za devet koncentracionih nivoa ambroksola 0.5-2-5-10-20-50-100-150-200 ng/mL, n=6

Aktuelna konc. (ng/mL)	P <sub>amb</sub>	P <sub>IS</sub>	F	Izmerena konc.** (ng/mL)	Tačnost (%)
0.5	1901	369946	0.0051	0.43	86.54
	2003	369695	0.0054	0.45	90.91
	1827	357761	0.0051	0.43	86.04
	1910	369997	0.0052	0.43	86.91
	2496	340210	0.0073	0.60	120.89
	2498	340104	0.0073	0.61	121.01
Mean* (n=6)	2105	357952	0.0059	0.49	98.72
SD			0.0011	0.09	17.31
RSD %			18.718	17.53	17.53
2	8864	369698	0.0240	1.90	95.22
	8889	369059	0.0241	1.91	95.65
	8746	372622	0.0235	1.86	93.25
	9254	366154	0.0253	2.01	100.29
	9112	361236	0.0252	2.00	100.10
	8232	369596	0.0223	1.77	88.57
Mean* (n=6)	8849.5	368060	0.0241	1.91	95.51
SD			0.0011	0.09	4.41
RSD %			4.6951	4.62	4.62
5	25358	357889	0.0709	5.57	111.33
	24392	351447	0.0694	5.45	109.07
	25431	357169	0.0712	5.59	111.88
	24677	347961	0.0709	5.57	111.44
	24582	342333	0.0718	5.64	112.82
	24370	351963	0.0692	5.44	108.81
Mean* (n=6)	24801.66667	351460	0.0706	5.54	110.89
SD			0.0010	0.08	1.60
RSD %			1.4532	1.45	1.45
10	50271	364957	0.1377	10.79	107.93
	50476	362033	0.1394	10.92	109.24
	51061	367703	0.1389	10.88	108.80
	49197	356182	0.1381	10.82	108.22
	51004	355933	0.1433	11.23	112.26
	51097	360177	0.1419	11.11	111.15
Mean* (n=6)	50517	361164	0.1399	10.96	109.60
SD			0.0022	0.17	1.73
RSD %			1.5800	1.58	1.58
20	109370	362921	0.3014	23.58	117.88
	98940	341465	0.2898	22.67	113.34
	96260	335154	0.2872	22.47	112.35
	96610	345888	0.2793	21.85	109.26
	104695	362445	0.2889	22.60	112.99
	100819	350087	0.2880	22.53	112.65
Mean* (n=6)	101115	349660	0.2891	22.62	113.08
SD			0.0071	0.55	2.77
RSD %			2.4532	2.45	2.45

Nastavak Tabele 4.3.1.2.

Aktuelna konc. (ng/mL)	$P_{amb}$	$P_{IS}$	F	Izmerena konc.** (ng/mL)	Tačnost (%)
50	211168	339637	0.6217	48.61	97.21
	215660	346402	0.6226	48.67	97.34
	210036	341481	0.6151	48.08	96.17
	213616	353468	0.6043	47.25	94.49
	215687	346283	0.6229	48.69	97.38
	219845	356017	0.6175	48.27	96.55
Mean* (n=6)	214335.3	347214.7	0.6174	48.26	96.52
SD			0.0071	0.55	1.11
RSD %			1.1485	1.15	1.15
100	425820	350449	1.2151	94.96	94.96
	420612	347069	1.2119	94.71	94.71
	419329	345049	1.2153	94.97	94.97
	423073	343595	1.2313	96.23	96.23
	418713	344185	1.2165	95.07	95.07
	415912	342023	1.2160	95.03	95.03
Mean* (n=6)	420576	345395	1.2177	95.16	95.16
SD			0.0069	0.54	0.54
RSD %			0.5641	0.56	0.56
150	670533	350230	1.9146	149.61	99.74
	669560	352109	1.9016	148.59	99.06
	673301	353065	1.9070	149.02	99.34
	678680	355761	1.9077	149.07	98.38
	664577	350259	1.8974	148.26	99.84
	653012	340790	1.9162	149.73	98.82
Mean* (n=6)	668277	350369	1.9074	149.05	99.36
SD			0.0072	0.57	0.38
RSD %			0.3799	0.38	0.38
200	947705	365816	2.5907	202.43	101.21
	944661	364705	2.5902	202.39	101.20
	947230	364940	2.5956	202.81	101.41
	934047	360395	2.5917	202.51	101.26
	942813	362899	2.5980	203.00	101.50
	943952	363611	2.5960	202.85	101.42
Mean* (n=6)	943401	363727	2.5937	202.66	101.33
SD			0.0033	0.25	0.13
RSD %			0.1254	0.13	0.13

\*srednja vrednost; \*\*koncentracija ambroksola izračunata prema  $Y_2=0.0128X_2-0.0004$ ;  $P_{amb}$  - površina pika ambroksola;  $P_{IS}$  - površina pika internog standarda;  $F=P_{amb}/P_{IS}$



**Tabela 4.3.1.3.** Tačnost i preciznost merenja kalibratora kalibracione krive 3CC za devet koncentracionih nivoa ambroksola 0.5-2-5-10-20-50-100-150-200 ng/mL, n=6

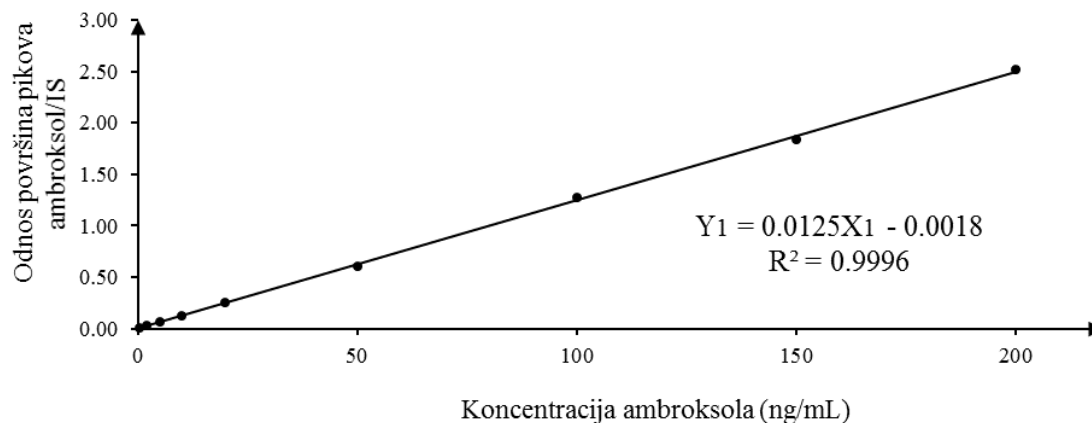
Aktuelna konc. (ng/mL)	P <sub>amb</sub>	P <sub>IS</sub>	F	Izmerena konc.** (ng/mL)	Tačnost (%)
0.5	1908	430009	0.0044	0.50	99.79
	1912	438287	0.0044	0.49	98.55
	2057	425542	0.0048	0.53	106.34
	2554	420081	0.0061	0.63	126.94
	1856	439565	0.0042	0.48	96.24
	2794	420052	0.0067	0.68	136.39
	Mean* (n=6)	2180	428922	0.0051	0.55
SD			0.0010	0.08	16.84
RSD %			19.988	15.21	15.21
2	9106	399542	0.0228	2.02	100.79
	9997	381746	0.0262	2.30	114.82
	9420	398345	0.0236	2.09	104.33
	9461	385139	0.0246	2.16	108.12
	9034	380300	0.0238	2.10	104.77
	9426	384337	0.0245	2.16	107.96
	Mean* (n=6)	10535	385705	0.0242	2.14
SD			0.0012	0.10	4.77
RSD %			4.7621	4.47	4.47
5	29592	430042	0.0688	5.82	116.38
	28006	439788	0.0637	5.40	107.90
	28437	437589	0.0650	5.50	110.06
	28287	434684	0.0651	5.51	110.21
	31373	438970	0.0715	6.04	120.78
	31740	432738	0.0733	6.19	123.88
	Mean* (n=6)	29572	435635	0.0679	5.74
SD			0.0039	0.33	6.51
RSD %			5.7994	5.67	5.67
10	45195	397637	0.1137	9.53	95.26
	45627	393873	0.1158	9.71	97.06
	45259	393703	0.1150	9.63	96.33
	46163	402026	0.1148	9.62	96.22
	45849	393488	0.1165	9.76	97.62
	45270	396248	0.1142	9.57	95.74
	Mean* (n=6)	45560	396162	0.1150	9.64
SD			0.0010	0.09	0.86
RSD %			0.9049	0.89	0.89
20	76627	342758	0.2236	18.61	93.04
	78057	343138	0.2275	18.93	94.66
	77432	342832	0.2259	18.80	93.99
	76895	340984	0.2255	18.77	93.85
	75022	346139	0.2167	18.04	90.22
	76115	329603	0.2309	19.22	96.09
	Mean* (n=6)	76691	340909	0.2250	18.73
SD			0.0047	0.39	1.96
RSD %			2.1091	2.09	2.09

**Nastavak Tabele 4.3.1.3.**

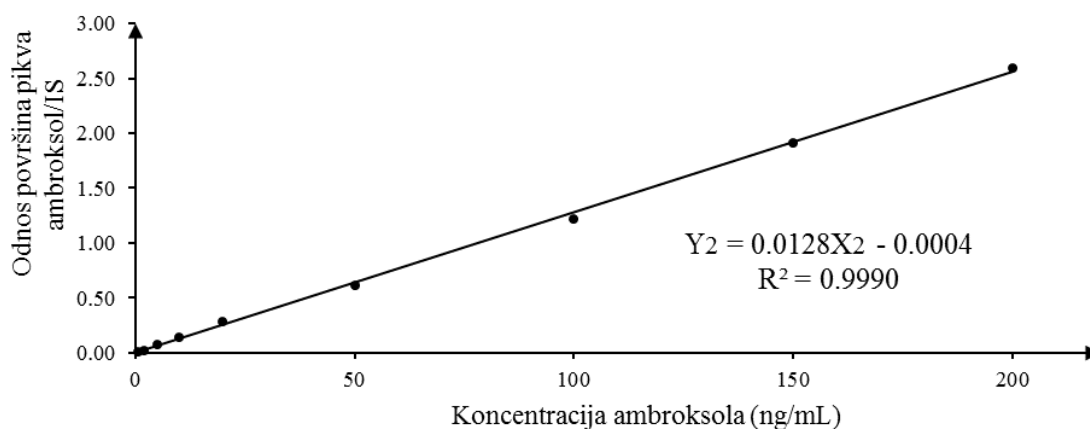
Aktuelna konc. (ng/mL)	$P_{amb}$	$P_{IS}$	F	Izmerena konc. ** (ng/mL)	Tačnost (%)
50	256064	425301	0.6021	49.89	99.78
	258904	432554	0.5985	49.60	99.20
	259621	436288	0.5951	49.31	98.62
	260796	431005	0.6051	50.14	100.28
	261318	430303	0.6073	50.32	100.64
	259116	429681	0.6030	49.97	99.94
Mean* (n=6)	259303	430855	0.6019	49.87	99.74
SD			0.0044	0.37	0.73
RSD %			0.7372	0.74	0.74
100	482605	400144	1.2061	99.81	99.81
	478767	394804	1.2127	100.35	100.35
	485992	400012	1.2149	100.54	100.54
	482548	396362	1.2174	100.75	100.75
	472931	386270	1.2244	101.32	101.32
	480737	395680	1.2150	100.54	100.54
Mean* (n=6)	480596	395545	1.2151	100.55	100.55
SD			0.0060	0.49	0.49
RSD %			0.4917	0.49	0.49
150	739989	410306	1.8035	149.18	99.45
	747391	410292	1.8216	150.68	100.45
	748317	414084	1.8072	149.48	99.66
	747995	412870	1.8117	149.86	99.91
	746804	410799	1.8179	150.37	100.25
	744470	410122	1.8152	150.15	100.10
Mean* (n=6)	745827	411412	1.8129	149.96	97.97
SD			0.0068	0.56	0.37
RSD %			0.3735	0.37	0.37
200	955705	396783	2.4086	199.19	99.60
	949442	395053	2.4033	198.75	99.38
	955713	396158	2.4125	199.51	99.75
	944673	394309	2.3958	198.13	99.06
	958202	398310	2.4057	198.95	99.47
	959152	398561	2.4065	199.02	99.51
Mean* (n=6)	953814	396529	2.4054	198.93	99.46
SD			0.0056	0.47	0.23
RSD %			0.2342	0.23	0.23

\*srednja vrednost; \*\*koncentracija ambroksola izračunata prema  $Y_3=0.0121X_3-0.0016$ ;  $P_{amb}$  - površina pika ambroksola;  $P_{IS}$  - površina pika internog standarda;  $F=P_{amb}/P_{IS}$ ;

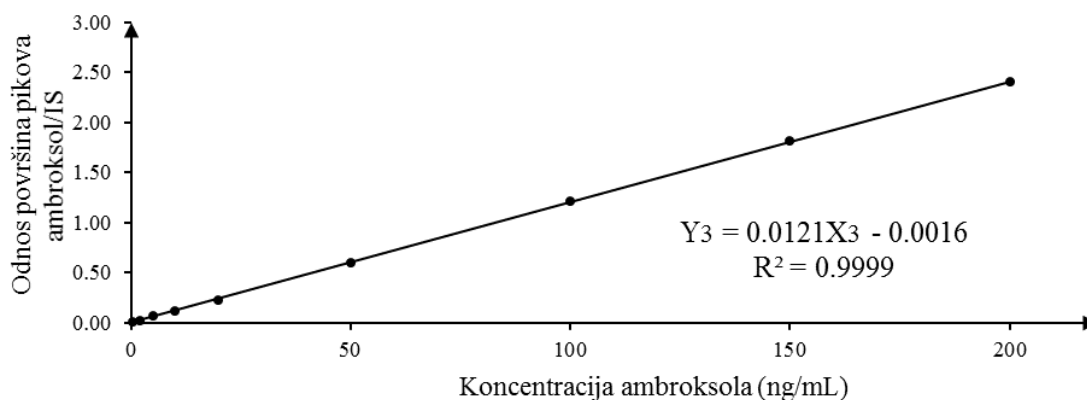
Na osnovu srednjih vrednosti odnosa površina pikova ambroksola i IS (F) konstruisane su tri CC kalibracione krive kao  $F = f(C)$ , što je prikazano na slikama 4.3.1.5. za 1CC, 4.3.1.6. za 2CC i 4.3.1.7. za 3CC.



Slika 4.3.1.5. Kalibraciona kriva kalibratora ambroksola ICC  
(0.5-2-5-10-20-50-100-150-200 ng/mL)



Slika 4.3.1.6. Kalibraciona kriva kalibratora ambroksola 2CC  
(0.5-2-5-10-20-50-100-150-200 ng/mL)



Slika 4.3.1.7. Kalibraciona kriva kalibratora ambroksola 3CC  
(0.5-2-5-10-20-50-100-150-200 ng/mL)

Korelacioni odnosi kalibracionih krivih opisani su jednačinama prave i odgovarajućim koeficijentima korelacije ( $r$ ). Određene su standardne greške (SG), standardne devijacije odsečaka kao i preciznost i tačnost (Tabela 4.3.1.4.)

**Tabela 4.3.1.4.** Rezultati regresione analize kalibracionih krivih kalibratora (opterećeni serum) ambroksola 1, 2 i 3 CC, UHPLC-MS/MS

Kalibr. kriva	Nagib (A)	Odsečak (B)	Korelacioni koeficijent ( $r$ )	Standardna greška (SG)	Preciznost RSD (%)	Tačnost (%)	SD odsečka
1CC	0.0125	-0.0018	0.9996	0.0083	3.80	104.14	0.025
2CC	0.0128	-0.0004	0.9990	0.0138	3.32	102.24	0.041
3CC	0.0121	-0.0016	0.9999	0.0040	3.35	102.46	0.019
<b>CC<sub>Sr</sub></b>	<b>0.0125</b>	<b>-0.0013</b>	<b>0.9995</b>	<b>0.0086</b>	<b>3.49</b>	<b>102.95</b>	<b>0.028</b>
SD	0.0003	0.0008	0.0004	0.0051	-	1.0393	0.011

*SD* - standardna devijacija; *RSD* - relativna standardna devijacija; *CC<sub>Sr</sub>* - srednja kalibraciona kriva

Procena tačnosti i preciznosti kalibracionih krivih izvršena je pomoću srednjih vrednosti  $F$  za opseg koncentracija 0.5 – 200 ng/mL. Srednje izmerene koncentracije, tačnost i preciznost prikazani su u tabelama 4.3.1.5. za 1CC, 4.3.1.6. za 2CC i 4.3.1.7. za 3CC.

**Tabela 4.3.1.5.** Tačnost i preciznost kalibracione krive 1CC ambroksola (0.5-2-5-10-20-50-100-150-200 ng/mL,  $n=6$ )

Aktuelna konc. (ng/mL)	$F$	Izmerena konc. (ng/mL)	Tačnost (%)	RSD (%)
0.5	0.0057	0.60	119.84	14.91
2	0.0268	2.29	114.50	8.04
5	0.0616	5.07	101.42	5.07
10	0.1262	10.24	102.38	2.51
20	0.2537	20.44	102.18	1.53
50	0.6003	48.17	96.34	1.20
100	1.2702	101.76	101.76	0.42
150	1.8393	147.29	98.19	0.21
200	2.5145	201.31	100.65	0.31
Mean*			<b>104.14</b>	<b>3.80</b>
SD			<b>7.76</b>	

\*srednja vrednost; *SD* - standardna devijacija; *RSD* - relativna standardna devijacija

**Tabela 4.3.1.6.** Tačnost i preciznost kalibracione krive 2CC ambroksola (0.5-2-5-10-20-50-100-150-200 ng/mL, n=6)

Aktuelna konc. (ng/mL)	F	Izmerena konc. (ng/mL)	Tačnost (%)	RSD (%)
0.5	0.0059	0.49	98.72	17.53
2	0.0241	1.91	95.51	4.62
5	0.0706	5.54	110.89	1.45
10	0.1399	10.96	109.60	1.58
20	0.2891	22.62	113.08	2.45
50	0.6174	48.26	96.52	1.15
100	1.2177	95.16	95.16	0.56
150	1.9074	149.05	99.36	0.35
200	2.5937	202.66	101.33	0.13
Mean*			<b>102.24</b>	<b>3.32</b>
SD			<b>7.04</b>	

\*srednja vrednost;SD- standardna devijacija; RSD- relativna standardna devijacija

**Tabela 4.3.1.7.** Tačnost i preciznost kalibracione krive 3CC ambroksola (0.5-2-5-10-20-50-100-150-200 ng/mL, n=6)

Aktuelna konc. (ng/mL)	F	Izmerena konc. (ng/mL)	Tačnost (%)	RSD (%)
0.5	0.0051	0.55	110.71	15.21
2	0.0242	2.14	106.80	4.47
5	0.0679	5.74	114.87	5.67
10	0.1150	9.64	96.37	0.89
20	0.2250	18.73	93.64	2.09
50	0.6019	49.87	99.74	0.74
100	1.2151	100.55	100.55	0.49
150	1.8129	149.96	99.97	0.37
200	2.4054	198.93	99.46	0.23
Mean*			<b>102.46</b>	<b>3.35</b>
SD			<b>6.91</b>	

\*srednja vrednost;SD- standardna devijacija; RSD- relativna standardna devijacija

Na osnovu izmerenih i preračunatih rezultata priloženi su i tabelarni validacioni izveštaji za kalibracione krive 1, 2 i 3 u mernom opsegu 0.5 – 200 ng/mL i to redom tabela 4.3.1.8. za 1CC, 4.3.1.9. za 2CC i 4.3.1.10. za 2CC kalibracionu krivu.

**Tabela 4.3.1.8.** Validacioni izveštaj kalibracione krive 1CC

Parametar	Vrednost
Tačnost (%)	104.14 ± 7.76
Nagib (A)	0.0125
Odsečak (B)	-0.0018
Opseg linearnosti	0.5-200 ng/ml
Korelacioni koeficijent (r)	0.9996
SE odsečka	0.0083
SD odsečka	0.0248

*SD - standardna devijacija; SE- standardna greška*

**Tabela 4.3.1.9.** Validacioni izveštaj kalibracione krive 2CC

Parametar	Vrednost
Tačnost (%)	102.24 ± 7.04
Nagib (A)	0.0128
Odsečak (B)	-0.0004
Opseg linearnosti	0.5-200 ng/ml
Korelacioni koeficijent (r)	0.9990
SE odsečka	0.0138
SD odsečka	0.0339

*SD - standardna devijacija; SE- standardna greška*

**Tabela 4.3.1.10.** Validacioni izveštaj kalibracione krive 3CC

Parametar	Vrednost
Tačnost (%)	102.46 ± 6.91
Nagib (A)	0.0121
Odsečak (B)	-0.0016
Opseg linearnosti	0.5-200 ng/ml
Korelacioni koeficijent (r)	0.9999
SE odsečka	0.0036
SD odsečka	0.0109

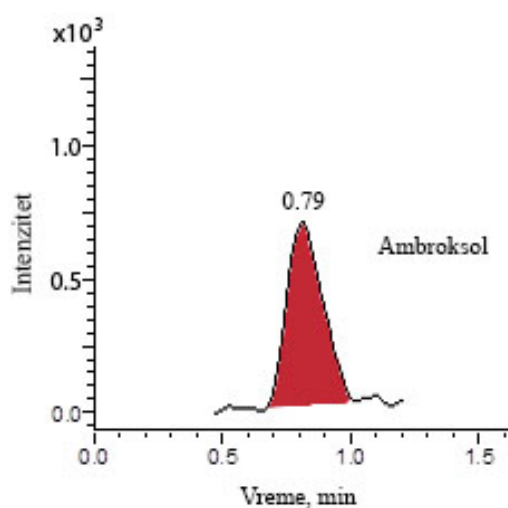
*SD - standardna devijacija; SE- standardna greška*

#### 4.3.2. Opseg linearnosti

Opseg koncentracija u kome je metoda linearna, precizna i tačna je 0.5 - 200 ng/mL.

### 4.3.3. Limit detekcije

Limit detekcije (LOD) ambroksola utvrđen je na 0,25 ng/mL pri odnosu S/N = 3,4 – 4,8 i prikazan je na slici 4.3.3.1. Uzorci seruma opterećenog na LOD su po šest puta u tri dana injektovani u aparat (n=3x6), a zatim je izvršeno poređenje intenziteta pikova sa baznom linijom (intenzitet B.L. 150-200). Statistička evaluacija tačnosti i preciznosti merenja prikazana je u tabeli 4.3.3.1. za LOD. Sva merenja su bila u skladu sa ICH kriterijumom  $RSD \leq 20\%$ .



Slika 4.3.3.1. MRM jonski hromatogram ambroksola na LOD; 0,25 ng/mL

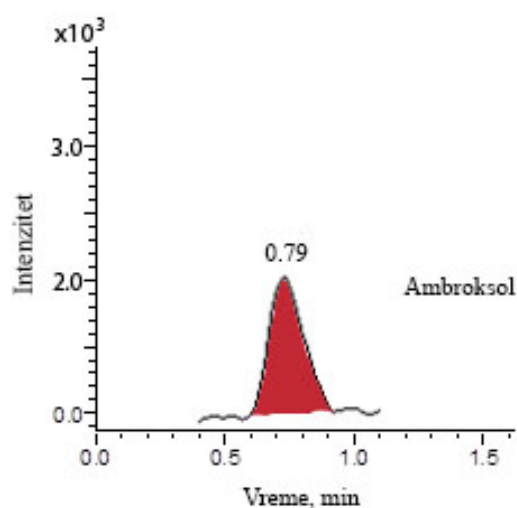
Tabela 4.3.3.1. Statistička evaluacija LOD

Koncentracija (ng/mL)	Površina pika			Srednja vrednost
	I	II	III	
0.25	878	691	806	
	857	658	868	
	894	661	914	
	836	631	914	
	855	718	996	
	700	700	988	
Mean* (n=6)	837	677	914	809
SD	69.89	32.05	72.08	116.83
RSD (%)	8.35	4.74	7.88	<b>14.44</b>
Tačnost (%)	96.71	119.61	88.50	<b>101.61</b>

\*srednja vrednost; SD -standardna devijacija; RSD- relativna standardna devijacija

#### 4.3.4. Limit kvantifikacije

Donji limit detekcije (LLOQ) ambroksola utvrđen je na 0,5 ng/mL pri odnosu S/N = 10,5 – 10,9 i prikazan na slici 4.3.4.1. Uzorci seruma opterećenog na LLOQ su po šest puta u tri dana injektovani u aparat (n=3x6), a zatim je izvršeno poređenje intenziteta pikova sa baznom linijom (intenzitet B.L. 150-200). Statistička evaluacija tačnosti i preciznosti merenja LLOQ prikazana je u tabeli 4.3.4.1. Sva merenja su bila u skladu sa ICH kriterijumom  $RSD \leq 20\%$ .



Slika 4.3.4.1. MRM jonski hromatogram ambroksola na LLOQ; 0,5 ng/mL

Tabela 4.3.4.1. Statistička evaluacija LLOQ

Koncentracija (ng/mL)	Površina pikova			Srednja vrednost
	I	II	III	
0.5	1805	1901	1908	
	1811	2003	1912	
	1908	1827	2057	
	2014	1910	2554	
	2564	2496	1856	
	2695	2498	2794	
	Mean*(n=6)	2133	2106	2180
SD	394.38	308.11	395.67	347.43
RSD (%)	18.49	14.63	18.15	<b>16.24</b>
Tačnost (%)	100.32	101.60	98.14	<b>100.02</b>

\*srednja vrednost; SD -standardna devijacija; RSD- relativna standardna devijacija



#### 4.3.5. Tačnost i preciznost metode

Tačnost i preciznost merenja uvrđena je za kalibracione uzorke (kalibratori, CC) preko devet koncentracionih nivoa 0.5-2-5-10-20-50-100-150-200 ng/mL i test uzorke (kontrola, QC) preko četiri koncentraciona nivoa QC<sub>1</sub>- niskom (LLOQ), QC<sub>2</sub>/QC<sub>3</sub> –srednjem (M1QC/ M2QC) i QC<sub>4</sub> - visokom (HQC) redom 0.5-20-100-200 ng/mL. Svi uzorci su injektovani po šest puta u aparat (n=6). Tačnost kao slaganje između izmerenih i stvarnih vrednosti koncentracija predstavljena je procentualno (%), dok je preciznost kao slaganje u okviru jedne i tri serija merenja (n=6x3) izražena preko osnovnih statističkih parametara centralne tendencije standardne devijacije  $X_{SR} \pm SD$  i relativne standardne devijacije, RSD%. Tačnost i preciznost merenja kalibratora CC<sub>S</sub> na devet koncentracionih nivoa prikazani su u tabeli 4.3.1.1. za seriju 1, tabeli 4.3.1.2. za seriju 2 i tabeli 4.3.1.3. za seriju 3, a kontrola QC<sub>S</sub> na četiri koncentraciona nivoa u tabeli 4.3.5.1. za seriju 1, tabeli 4.3.5.2. za seriju 2 i tabeli 4.3.5.3. za seriju 3.

**Tabela 4.3.5.1.** Tačnost i preciznost merenja kontrola 1QC na četiri koncentraciona nivoa ambroksola: niskom (QC<sub>1</sub>, LLOQ, 0.5 ng/mL), srednjem 1 (QC<sub>2</sub>, M1QC, 20 ng/mL), srednjem 2 (QC<sub>3</sub>, M2QC, 100 ng/mL) i visokom (QC<sub>4</sub>, HQC, 200 ng/mL)

	Aktuelna konc. (ng/mL)	P <sub>amb</sub>	P <sub>IS</sub>	F	Izmerena konc.** (ng/mL)	Tačnost (%)
1QC <sub>1</sub>	0.5	2128	383405	0.0056	0.59	117.60
		2105	378320	0.0056	0.59	117.83
		2073	372339	0.0056	0.59	117.88
		1985	371449	0.0053	0.57	114.30
		2382	370446	0.0064	0.66	131.68
		2099	402450	0.0052	0.56	112.25
		Mean* (n=6)			0.01	0.59
SD			0.00	0.03	6.81	
RSD (%)			7.59	5.74	5.74	
1QC <sub>2</sub>	20	94785	395566	0.2396	19.31	96.57
		96671	396747	0.2437	19.64	98.18
		101445	384024	0.2642	21.28	106.39
		105553	391639	0.2695	21.71	108.53
		106094	386302	0.2746	22.12	110.58
		105922	397846	0.2662	21.44	107.22
		Mean* (n=6)			0.26	20.92
SD			0.01	1.16	5.78	
RSD (%)			5.56	5.52	5.52	
1QC <sub>3</sub>	100	497842	365447	1.3623	109.13	109.13
		501712	372112	1.3483	108.01	108.01
		498679	370731	1.3451	107.75	107.75
		482458	365010	1.3218	105.89	105.89
		477958	361864	1.3208	105.81	105.81
		474426	363300	1.3059	104.61	104.61
		Mean* (n=6)			1.33	106.87
SD			0.02	1.69	1.69	
RSD (%)			1.59	1.59	1.59	
1QC <sub>4</sub>	200	936931	372324	2.5164	201.46	100.73
		939551	371189	2.5312	202.64	101.32
		937244	374176	2.5048	200.53	100.26
		935637	377333	2.4796	198.51	99.26
		939727	376008	2.4992	200.08	100.04
		941581	375835	2.5053	200.57	100.28
		Mean* (n=6)			2.51	200.63
SD			0.02	1.38	0.69	
RSD (%)			0.69	0.69	0.69	

\*srednja vrednost; \*\*koncentracija ambroksola izračunata prema  $Y_1=0.0125X_1-0.0018$ ; S - standardna devijacija; RSD - relativna standardna devijacija

**Tabela 4.3.5.2.** Tačnost i preciznost merenja kontrola 2QC na četiri koncentraciona nivoa ambroksola: niskom (QC<sub>1</sub>, LLOQ, 0.5 ng/mL), srednjem 1 (QC<sub>2</sub>, M1QC, 20 ng/mL), srednjem 2 (QC<sub>3</sub>, M2QC, 100 ng/mL) i visokom (QC<sub>4</sub>, HQC, 200 ng/mL)

Aktuelna konc. (ng/mL)	P <sub>amb</sub>	P <sub>IS</sub>	F	Izmerena konc.** (ng/mL)	Tačnost (%)
2QC <sub>1</sub> 0.5	2655	383963	0.0069	0.57	114.29
	2469	399829	0.0062	0.51	102.74
	2506	383696	0.0065	0.54	108.30
	2273	390433	0.0058	0.49	97.21
	2213	379599	0.0058	0.49	97.34
	2208	383421	0.0058	0.48	96.23
	Mean* (n=6)		0.01	0.51	102.69
SD		0.00	0.04	7.30	
RSD (%)		7.57	7.11	7.11	
2QC <sub>2</sub> 20	107378	379503	0.2829	22.14	110.68
	106869	373609	0.2860	22.38	111.89
	104685	365223	0.2866	22.42	112.12
	105374	364667	0.2890	22.61	113.03
	106476	366205	0.2908	22.75	113.73
	107977	370160	0.2917	22.82	114.10
	Mean* (n=6)		0.29	22.52	112.59
SD		0.00	0.26	1.28	
RSD (%)		1.13	1.13	1.13	
2QC <sub>3</sub> 100	610386	434254	1.4056	109.84	109.84
	622937	446682	1.3946	108.98	108.98
	634266	440809	1.4389	112.44	112.44
	630888	458117	1.3771	107.62	107.62
	632729	458390	1.3803	107.87	107.87
	620887	455343	1.3636	106.56	106.56
	Mean* (n=6)		1.39	108.89	108.89
SD		0.03	2.08	2.08	
RSD (%)		1.91	1.91	1.91	
2QC <sub>4</sub> 200	1071128	407740	2.6270	205.26	102.63
	1071229	402202	2.6634	208.11	104.06
	1080317	393009	2.7488	214.78	107.39
	1094377	399213	2.7413	214.20	107.10
	1095852	395435	2.7713	216.54	108.27
	1086429	392313	2.7693	216.38	108.19
	Mean* (n=6)		2.72	212.55	106.27
SD		0.06	4.71	2.36	
RSD (%)		2.22	2.22	2.22	

\*srednja vrednost; \*\*koncentracija ambroksola izračunata prema  $Y_2=0.0128X_2-0.0004$ ; SD - standardna devijacija; RSD - relativna standardna devijacija

**Tabela 4.3.5.3.** Tačnost i preciznost merenja kontrola 3QC na četiri koncentraciona nivoa ambroksola: niskom (QC<sub>1</sub>, LLOQ, 0.5 ng/mL), srednjem 1 (QC<sub>2</sub>, M1QC, 20 ng/mL), srednjem 2 (QC<sub>3</sub>, M2QC, 100 ng/mL) i visokom (QC<sub>4</sub>, HQC, 200 ng/mL)

Aktuelna konc. (ng/mL)	P <sub>amb</sub>	P <sub>IS</sub>	F	Izmerena konc.** (ng/mL)	Tačnost (%)	
2QC <sub>1</sub> 0.5		1991	390867	0.0051	0.55	110.64
		1923	378143	0.0051	0.55	110.50
		2010	391620	0.0051	0.56	111.28
		2044	395996	0.0052	0.56	111.76
		1986	393001	0.0051	0.55	109.97
		1962	384385	0.0051	0.55	110.81
	Mean* (n=6)			0.01	0.55	110.83
SD			0.00	0.00	0.62	
RSD (%)			0.74	0.56	0.56	
3QC <sub>2</sub> 20		112418	453566	0.2479	20.62	103.08
		115163	461933	0.2493	20.74	103.68
		114259	461138	0.2478	20.61	103.05
		115280	462785	0.2491	20.72	103.60
		113019	459676	0.2459	20.45	102.26
		116254	468025	0.2484	20.66	103.30
	Mean* (n=6)			0.25	20.63	103.16
SD			0.00	0.10	0.51	
RSD (%)			0.50	0.50	0.50	
3QC <sub>3</sub> 100		647058	471385	1.3727	113.58	113.58
		652536	478040	1.3650	112.94	112.94
		653012	463833	1.4079	116.48	116.48
		650986	478295	1.3611	112.62	112.62
		659602	478100	1.3796	114.15	114.15
		655693	474778	1.3811	114.27	114.27
	Mean* (n=6)			1.38	114.01	114.01
SD			0.02	1.38	1.38	
RSD (%)			1.21	1.21	1.21	
3QC <sub>4</sub> 200		959438	432809	2.2168	183.34	91.67
		990228	442492	2.2378	185.08	92.54
		1003399	445175	2.2539	186.41	93.20
		1007579	447179	2.2532	186.35	93.17
		1011222	448235	2.2560	186.58	93.29
		1014213	445952	2.2743	188.09	94.04
	Mean* (n=6)			2.25	185.97	92.99
SD			0.02	1.61	0.80	
RSD (%)			0.87	0.86	0.86	

\*srednja vrednost; \*\*koncentracija ambroksola izračunata prema  $Y_3=0.0121X_3-0.0016$ ; SD - standardna devijacija; RSD - relativna standardna devijacija

Validacioni izveštaji intra- i interdnevne preciznosti i tačnosti merenja kalibracionih uzoraka CCs,  $s=1-9$  na koncentracionim nivoima 0.5-2-5-10-20-50-100-150-200 ng/mL nakon 6 ponavljanja prikazani su u tabelama 4.3.5.4. a kontrolnih uzoraka QC<sub>s</sub>,  $s=1-4$  na koncentracionim nivoima 0.5-20-100-200 ng/mL nakon 6 ponavljanja u tabeli 4.3.5.5.

**Tabela 4.3.5.4.** Intra- i interdnevna preciznost i tačnost merenja kalibratora CC (0.5-2-5-10-20-50-100-150-200 ng/mL, n=6)

Serije merenja	Aktuelna konc. (ng/mL)	Preciznost		Tačnost (%)
		Mean*± SD	RSD (%)	
<i>Intradnevna</i>	0.5	0.59 ± 0.09	14.91	119.84
	2	2.29 ± 0.18	8.04	114.50
	5	5.07 ± 0.26	5.07	101.42
	10	10.24 ± 0.25	2.51	102.38
	20	20.44 ± 0.31	1.53	102.18
	50	48.17 ± 0.58	1.20	96.34
	100	101.76 ± 0.42	0.42	101.76
	150	147.28 ± 0.54	0.21	98.19
	200	201.31 ± 0.62	0.31	100.65
<i>Interdnevna (3 dana)</i>	0.5	0.55 ± 0.09	16.92	109.75
	2	2.11 ± 0.20	9.55	105.60
	5	5.45 ± 0.37	6.78	109.06
	10	10.28 ± 0.58	5.67	102.78
	20	20.59 ± 1.69	8.19	102.97
	50	48.76 ± 0.93	1.92	97.53
	100	99.16 ± 2.98	3.01	99.15
	150	148.76±1.25	1.25	99.17
	200	200.96 ±1.65	0.82	100.48

\*srednja vrednost merenja; SD - standardna devijacija; RSD - relativna standardna devijacija

**Tabela 4.3.5.5.** Intra- i interdnevna preciznost i tačnost merenja kontrola QC (0.5-20-100-200 ng/mL, n=6)

Serija merenja	Aktuelna konc. (ng/ml)	Preciznost		Tačnost (%)
		Mean*± SD	RSD (%)	
<i>Intradnevna</i>	0.5	0.59 ± 0.03	5.74	118.59
	20	20.92 ± 1.16	5.52	104.58
	100	106.87 ± 1.69	1.59	106.87
	200	200.63 ± 4.71	0.69	100.32
<i>Interdnevna (3 dana)</i>	0.5	0.55 ± 0.04	7.77	110.10
	20	21.35 ± 1.07	5.01	106.78
	100	109.92 ± 3.50	3.18	109.92
	200	199.72 ± 11.53	5.77	99.86

\*srednja vrednost merenja; SD - standardna devijacija; RSD - relativna standardna devijacija

#### 4.3.6. Specifičnost / selektivnost

Snimanjem MS/MS hromatograma blanko (bez IS) i nultih uzoraka seruma (sa IS) postavljenom UHPLC-MS/MS metodom pokazano je da na retencionim vremenima ambroksola i IS ne postoje interferirajuće jonske mase koje bi ometale kvatifikaciju ambroksola. MRM hromatogrami uzoraka seruma bez i sa IS nakon usvojene SPE ekstrakcije prikazani su na slikama 4.1.3.2 (a) i (b).

Za validaciju bioanaličke UHPLC-MS/MS metode ispitan je uticaj matriks efekta (eng. *matrix effect*) na jonizaciju ambroksola i IS koristeći 3 različita uzorka seruma. Serumi su pomešani, SPE ekstrahovani, a zatim opterećeni količinom od 2 ng/mL ambroksola i 20 ng/mL IS (B), i po tri puta injektovani u HPLC-MS/MS sistem. Matriks faktori za ambroksol i IS izračunati su kao odnos površina pikova u prisustvu (B) i odsustvu (A) matriksa seruma (analiti u MF). U tabeli 4.3.6.1. je prikazana procena uticaja matriks efekta na MS/MS jonizaciju ambroksola (2 ng/mL) i IS (20 ng/mL) .

**Tabela 4.3.6.1.** Evaluacija uticaja matriks efekta na MS/MS jonizaciju ambroksola (2 ng/mL) i interenog standarda (20 ng/mL), n=3

Aktuelna konc. (ng/mL)	P <sub>amb</sub> *	P <sub>amb</sub> **	ME <sub>amb</sub>	P <sub>IS</sub> *	P <sub>IS</sub> **	MF <sub>IS</sub>
	9910	10311	0.96	510992	545689	0.94
2	10084	10185	0.99	529117	539672	0.98
	9916	10002	0.99	535240	535166	1.00
Mean* (n=3)	9970	10166	<b>0.98</b>	525116	540176	<b>0.97</b>
SD	98.77	155.37	0.02	12609	5279.55	0.03

\*površine pikova uzoraka dobijenih dodavanjem standarda u ekstrahovani serum; \*\*površine pikova standarda u mobilnoj fazi; MF = P\*/P\*\*, matriks faktor

#### 4.3.7. Stabilnost bioloških uzoraka

Prema ICH stabilnost uzoraka ambroksola u serumu ispitana je u kratkoročnim (1 h) i dugoročnim (10 dana /-20°C) temperaturnim studijama i ciklusima zamrzavanja-odmrzavanja (3x). Ispitivanja su vršena na dva koncentraciona nivoa 20 ng/mL i 200 ng/mL sa po šest ponavljanja. Rezultati su dobijeni poređenjem koncentracija testiranih QC uzoraka sa koncentracijama kontrolnih sveže spremljenih rastvora. Izmerene površine pikova ambroksola i internog standarda, koncentracije ambroksola, preciznost i tačnost merenja testiranih uzoraka QC pri testu (a) kratkotrajne stabilnosti, (b) dugotrajne stabilnosti, (c) na autosempleru i (d1/d2) nakon 3 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja prikazani su u tabeli 4.3.7.1., a evaluacija stabilnosti testiranih uzoraka u odnosu na kontrolne vrednosti u tabeli 4.3.7.2.

**Tabela 4.3.7.1.** Površine pikova, izmerene koncentracije, preciznost i tačnost merenja na dva koncentraciona nivoa testiranih uzoraka QC ambroksola (20 i 200 ng/mL, n=6) pri testu (a) kratkotrajne stabilnosti, (b) dugotrajne stabilnosti, (c) na autosempleru i (d1/d2) zamrzavanja/odmrzavanja (3 ciklusa)

(a)

n	Aktuelna konc. (ng/mL)	P <sub>amb</sub>	P <sub>IS</sub>	F	Izmerena konc.** (ng/mL)	Tačnost (%)
1	20	107894	390543	0.2763	22.21	111.03
2		108316	391095	0.2770	22.26	111.30
3		107123	396452	0.2702	21.72	108.60
4		108245	395053	0.2740	22.02	110.12
5		111259	386976	0.2875	23.10	115.52
6		111348	391957	0.2841	22.83	114.15
Mean*						111.79
SD						2.58
RSD (%)						2.31
n	Aktuelna konc. (ng/mL)	P <sub>amb</sub>	P <sub>IS</sub>	F	Izmerena konc.** (ng/mL)	Tačnost (%)
1	200	1018081	392604	2.5931	207.56	103.78
2		1004985	384803	2.6117	209.04	104.52
3		1022433	396734	2.5771	206.27	103.14
4		1024106	388658	2.6350	210.90	105.45
5		1026965	390376	2.6307	210.56	105.28
6		1025974	383297	2.6767	214.24	107.12
Mean*						104.88
SD						1.41
RSD (%)						1.34



(b)

n	Dugotrajna stabilnost (-20°C/10 dana)	Aktuelna konc. (ng/mL)	P <sub>amb</sub>	P <sub>IS</sub>	F	Izmerena konc.** (ng/mL)	Tačnost (%)
1			110560	390639	0.2830	22.75	113.73
2			113677	392993	0.2893	23.24	116.22
3		20	108290	396433	0.2732	21.96	109.78
4			113364	399204	0.2840	22.82	114.11
5			120718	401960	0.3003	24.13	120.65
6			109061	403105	0.2706	21.75	108.74
	Mean*						113.87
	SD						4.35
	RSD (%)						3.82
n	Dugotrajna stabilnost (-20°C/10 dana)	Aktuelna konc. (ng/mL)	P <sub>amb</sub>	P <sub>IS</sub>	F	Izmerena konc.** (ng/mL)	Tačnost (%)
1			1097998	394080	2.7862	223.00	111.50
2			1095255	391899	2.7947	223.68	111.84
3		200	1112141	396949	2.8017	224.24	112.12
4			1139565	403904	2.8214	225.81	112.91
5			1176132	411661	2.8570	228.67	114.33
6			1176153	414221	2.8394	227.26	113.63
	Mean*						112.72
	SD						1.10
	RSD (%)						0.98

(c)

n	Autosempler (24h)	Aktuelna konc. (ng/mL)	P <sub>amb</sub>	P <sub>IS</sub>	F	Izmerena konc.** (ng/mL)	Tačnost (%)
1			90069	389542	0.2312	18.60	93.01
2			99974	391746	0.2552	20.52	102.60
3		20	94205	388345	0.2426	19.51	97.55
4			94617	387139	0.2444	19.66	98.28
5			90349	388300	0.2327	18.72	93.59
6			93264	388337	0.2402	19.32	96.59
	Mean*						96.94
	SD						3.49
	RSD (%)						0.04
n	Autosempler (24h)	Aktuelna konc. (ng/mL)	P <sub>amb</sub>	P <sub>IS</sub>	F	Izmerena konc.** (ng/mL)	Tačnost (%)
1			966112	401685	2.4051	192.52	96.26
2			976994	406406	2.4040	192.42	96.21
3		200	958973	400819	2.3925	191.51	95.75
4			952311	402485	2.3661	189.39	94.70
5			955052	397139	2.4048	192.49	96.25
6			959379	391063	2.4533	196.36	98.18
	Mean*						96.22
	SD						1.13
	RSD (%)						1.18

(d1)

n Zamrz./odmrz. (3 ciklusa)	Aktuelna konc. (ng/mL)	$P_{amb}$	$P_{IS}$	F	Izmerena konc.** (ng/mL)	Tačnost (%)
1	20	91981	418016	0.2200	17.71	88.54
2		94368	416662	0.2265	18.22	91.11
3		99183	417881	0.2373	19.09	95.46
4		94357	424853	0.2221	17.87	89.36
5		98470	423833	0.2323	18.69	93.45
6		99483	429064	0.2319	18.65	93.26
1	20	99179	383808	0.2584	20.78	103.88
2		99259	377642	0.2628	21.13	105.66
3		106382	379221	0.2805	22.55	112.73
4		105944	388451	0.2727	21.92	109.61
5		106386	396264	0.2685	21.58	107.91
6		105017	388847	0.2701	21.71	108.55
1	20	8790	39518	0.2224	17.90	89.49
2		10634	39518	0.2691	21.63	108.16
3		10012	39518	0.2534	20.37	101.86
4		9708	39518	0.2457	19.76	98.78
5		9142	39518	0.2313	18.61	93.06
6		10126	39518	0.2562	20.60	103.02
Mean*						99.66
SD						8.07
RSD (%)						0.08

(d2)

n Zamrz./odmrz. (3 ciklusa)	Aktuelna konc. (ng/mL)	$P_{amb}$	$P_{IS}$	F	Izmerena konc.** (ng/mL)	Tačnost (%)
1	200	1097998	394080	2.7862	223.00	111.50
2		1095255	391899	2.7947	223.68	111.84
3		1112141	396949	2.8017	224.24	112.12
4		1139565	403904	2.8214	225.81	112.91
5		1176132	411661	2.8570	228.67	114.33
6		1176153	414221	2.8394	227.26	113.63
1	200	989366	410128	2.4123	193.09	96.55
2		981736	409416	2.3979	191.94	95.97
3		967544	404384	2.3926	191.51	95.76
4		965386	404841	2.3846	190.87	95.44
5		963214	403783	2.3855	190.94	95.47
6		976244	401421	2.4320	194.66	97.33
1	200	782620	438700	1.7840	142.82	71.41
2		786795	435217	1.8078	144.73	72.36
3		787562	428920	1.8362	147.00	73.50
4		777396	430358	1.8064	144.62	72.31
5		779200	430754	1.8089	144.82	72.41
6		778949	433767	1.7958	143.77	71.88
Mean*						93.71
SD						17.08
RSD (%)						0.18

\*srednja vrednost; \*\*koncentracija izračunata prema  $Y_s=0.0125X_s-0.0013$ ;  $P_{amb}$  - površina pika ambroksola;  $P_{IS}$  - površina pika internog standarda;  $F = P_{amb}/P_{IS}$

**Tabela 4.3.7.2.** Evaluacija stabilnosti testiranih QC<sub>s</sub> uzoraka ambroksola u serumu (20 ng/mL i 200 ng/mL, n=6)

Uslovi merenja	Tačnost u odnosu na kontrolnu vrednost *(%)	
	20 ng/mL	200 ng/mL
Kratkotrajna stabilnost (1h)	111.79 ± 2.58	104.88 ± 1.41
Dugotrajna stabilnost (-20°C/10 dana)	113.42 ± 4.35	112.72 ± 1.10
Stabilnost na autosempleru (24h)	96.94 ± 3.49	96.22 ± 1.18
Stabilnost zamrzavanja/odmrzavanja (3 ciklusa)	99.66 ± 8.07	93.71 ± 17.08

\*srednje vrednosti merenja ± standardna devijacija

Ispitivanje stabilnosti osnovnog (štok) rastvora ambroksola u serumu (1 mg/mL) pri razblaženju od 10 ng/mL ispitana je stajanjem rastvora šest sati na sobnoj temperaturi. Koncentracije testiranih uzoraka poređene su sa vrednostima sveže spremljenih kontrolnih rastvora. Izmerene koncentracije testiranih i kontrolnih uzoraka, kao i evaluacija stabilnosti testiranog osnovnog rastvora ambroksola u serumu u odnosu na kontrolu (10 ng/mL, 6h/sobna temperatura, n=3) prikazani su u tabeli 4.3.7.3.

**Tabela 4.3.7.3.** Stabilnost osnovnog rastvora ambroksola u serumu (10 ng/mL, n=3)

n	Koncentracija razblaženog osnovnog rastvora (10 ng/mL)		Razlika (%)
	svež	nakon 6 h	
1	9.79	8.95	8.62
2	9.82	9.49	3.34
3	9.84	9.67	1.81
Mean* (n=3)	9.82	9.37	<b>4.59</b>
SD	0.03	0.38	3.57
RSD (%)	0.27	4.01	77.85

\*srednja vrednost

#### 4.3.8. Ekstrakcioni prinos

Prinosi ambroksola pri ekstrakciji iz seruma određeni su na tri koncentraciona nivoa 20 ng/mL, 100 ng/mL i 200 ng/mL. Uzorci seruma opterećenih određenom količinom ambroksola su nakon SPE ekstrakcije na katjon-jonizmenjivačkim kertridžima (Strata-XC, Phenomenix) filtrirani kroz 0.22  $\mu$ m špric i u zapremini od 2  $\mu$ l injektovani po šest puta u HPLC-MS/MS sistem. Srednje vrednosti ekstrakcionih prinosa za sva tri koncentraciona nivoa prikazani su u tabeli 4.3.8.1.

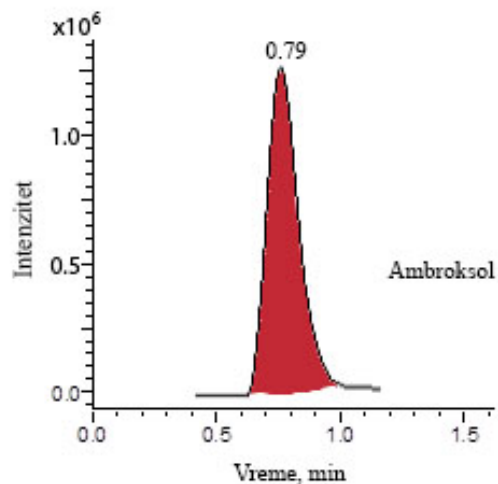
**Tabela 4.3.8.1.** Srednji ekstrakcioni prinosi ambroksola nakon tečno-čvrste ekstrakcije (20-100-200 ng/mL, n=6)

Aktuelna koncentracija (ng/mL)	Prinos SPE* (%)	RSD (%)
20	80.44	6.70
100	81.04	8.71
200	96.40	14.96

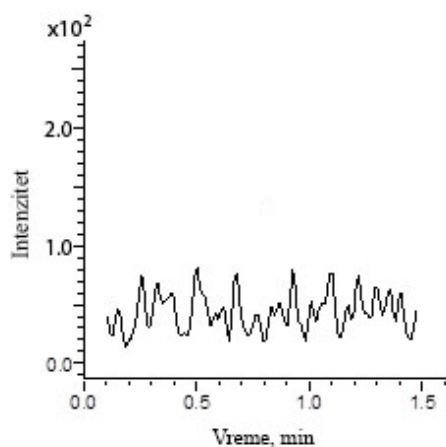
\* tečno-čvrsta ekstrakcija na katjon-jonoizmenjivačkim kertridžima Strata-XC, Phenomenix; RSD - relativna standardna devijacija

#### 4.3.9. Carry-over efekat

Da bi se ispitala mogućnost pojave analita iz prethodnog merenja u novom merenju (*carry-over* efekat) izvršeno je tri puta za redom (n=3) injektovanje visoke koncentracije standarda ambroksola od 300 ng/mL, a nakon toga injektovanje uzorka blanko seruma QC<sub>0</sub> (n=3). Na slici 4.3.10.1 prikazan je hromatogram standarda ambroksola od 300 ng/mL, a na slici 4.3.10.2 hromatogram uzorka blanko seruma QC<sub>0</sub> nakon injektovanja standarda ambroksola od 300 ng/mL.



Slika 4.3.9.1. Hromatogram standarda ambroksola 300 ng/mL



Slika 4.3.9.2. Hromatogram uzorka blank seruma QC<sub>0</sub> nakon injektovanja standarda ambroksola od 300 ng/mL

#### 4.3.10. Robustnost metode

Robustnost UHPLC-MS/MS metode ispitana je malim promenama temperature kolone ( $40 \pm 5^\circ\text{C}$ ), protoka MF ( $0.30 \pm 0.05$  mL/min) i udela organskog dela MF ( $90 \pm 5\%$  metanol). Izmerene su koncentracije standarda ambroksola na dva koncentraciona nivoa 20-200 ng/mL sa po tri ponavljanja ( $n=3$ ) na promenjenim i validiranim uslovima. Površine pikova, izmerene koncentracije, preciznost i tačnost merenja standarda ambroksola pri promeni (a) temperature kolone  $\pm 5^\circ\text{C}$ , (b) udela organskog dela mobilne faze  $\pm 5\%$  metanola, (c) protoka mobilne faze  $\pm 0.05$  mL/min

i (d) na uspostavljenim uslovima metode (40 °C, 0.30 ml/min, 90 % metanola), prikazani su u tabeli 4.3.10.1., a evaluacija robustnosti UHPLC-MS/MS metode na koncentracijama standarda ambroksola od 20 ng/mL i 200 ng/mL u tabeli 4.3.10.2

**Tabela 4.3.10.1.** Površine pikova, izmerene koncentracije, preciznost i tačnost merenja standarda ambroksola na dva koncentraciona nivoa (20 i 200 ng/mL, n=3) pri promeni (a) temperature kolone  $\pm 5^\circ\text{C}$ , (b) udela organskog dela mobilne faze  $\pm 5\%$  metanola, (c) protoka mobilne faze  $\pm 0.05$  mL/min i (d) na uspostavljenim uslovima metode.

(a)

Temperatura kolone 45 °C					Temperatura kolone 35 °C				
Aktuelna konc. (ng/ml)	P <sub>amb</sub>	P <sub>IS</sub>	F	Izmerena konc.** (ng/mL)	Aktuelna konc. (ng/ml)	P <sub>amb</sub>	P <sub>IS</sub>	F	Izmerena konc.** (ng/mL)
20	124710	552718	0.2256	19.73	20	125745	543586	0.2313	20.19
	126761	553605	0.2290	20.00		124274	539618	0.2303	20.10
	128251	547471	0.2343	20.42		125572	531781	0.2361	20.58
Mean*				20.05	Mean*				20.29
SD				0.35	SD				0.25
RSD (%)				1.75	RSD (%)				1.24
Tačnost (%)				100.25	Tačnost (%)				101.45
200	1317688	554722	2.3754	193.10	200	1302863	540397	2.4109	195.96
	1313125	555788	2.3626	192.07		1307462	537179	2.4339	197.82
	1318554	553683	2.3814	193.58		1328791	536999	2.4745	201.09
Mean*				192.92	Mean*				198.29
SD				0.77	SD				2.59
RSD (%)				0.40	RSD (%)				1.31
Tačnost (%)				96.46	Tačnost (%)				99.14

(b)

MeOH 85,5%					MeOH 94,5%				
Aktuelna konc. (ng/ml)	P <sub>amb</sub>	P <sub>IS</sub>	F	Izmerena konc.** (ng/mL)	Aktuelna konc. (ng/ml)	P <sub>amb</sub>	P <sub>IS</sub>	F	Izmerena konc.** (ng/mL)
20	118277	459948	0.2572	22.27	20	114834	510233	0.2251	19.68
	117928	459738	0.2565	22.22		113338	513716	0.2206	19.32
	118130	459616	0.2570	22.26		114435	508259	0.2252	19.69
Mean*				22.25	Mean*				19.57
SD				0.03	SD				0.21
RSD (%)				0.12	RSD (%)				1.07
Tačnost (%)				111.25	Tačnost (%)				97.83
200	1213532	458017	2.6495	215.20	200	1217287	519921	2.3413	190.35
	1207706	451616	2.6742	217.19		1209909	520985	2.3223	188.82
	1202642	454173	2.6480	215.08		1229131	525507	2.3389	190.16
Mean*				215.83	Mean*				189.77
SD				1.19	SD				0.83
RSD (%)				0.55	RSD (%)				0.44
Tačnost (%)				107.91	Tačnost (%)				94.89

(c)

Protok MF 3.5 mL/min					Protok MF 2.5 mLmin				
Aktuelna konc. (ng/ml)	$P_{amb}$	$P_{IS}$	F	Izmerena konc.** (ng/mL)	Aktuelna konc. (ng/mL)	$P_{amb}$	$P_{IS}$	F	Izmerena konc.** (ng/mL)
20	103595	463459	0.2235	19.56	20	136904	543500	0.2519	21.85
	104627	478233	0.2188	19.18		140760	544369	0.2586	22.39
	104571	465766	0.2245	19.64		140760	535836	0.2627	22.72
Mean*				19.46	Mean*				22.32
SD				0.25	SD				0.44
RSD (%)				1.27	RSD (%)				1.97
Ratio (%)				97.29	Ratio (%)				111.58
200	1082824	489147	2.2137	180.06	200	1424311	544890	2.6139	212.33
	1095120	496273	2.2067	179.49		1427111	538714	2.6491	215.17
	1093918	502662	2.1762	177.04		1427545	544902	2.6198	212.81
Mean*				178.86	Mean*				213.44
SD				1.61	SD				1.52
RSD (%)				0.90	RSD (%)				0.71
Ratio (%)				89.43	Ratio (%)				106.72

(d)

Protok MF 3.0 mL/min, 40 °C, 90.0 % MeOH				
Aktuelna konc. (ng/mL)	$P_{amb}$	$P_{IS}$	F	Izmerena konc.** (ng/mL)
20	85651	369460	0.2318	20.23
	82401	366542	0.2248	19.66
	88168	392572	0.2246	19.64
Mean*				19.84
SD				0.33
RSD (%)				1.67
Tačnost (%)				99.22
200	1097118	445251	2.4640	200.25
	1111567	450389	2.4680	200.57
	1142849	460616	2.4811	201.62
Mean*				200.81
SD				0.72
RSD (%)				0.36
Tačnost (%)				100.41

\*srednja vrednost; \*\*izmerena koncentracija prema  $Y=0.0124X-0.019$ ;  $P_{amb}$  - površina pika ambroksola;  $P_{IS}$  - površina pika internog standarda;  $F = P_{amb} / P_{IS}$ ; MeOH - metanol; MF - mobilna faza

**Tabela 4.3.10.2.** Evaluacija robustnosti UHPLC-MS/MS metode pri koncentracijama standarda ambroksola 20 ng/ml i 200 ng/ml (n=3)

Parametar	Vrednost	Tačnost	Preciznost	Tačnost	Preciznost
		(%)	(RSD %)	(%)	(RSD %)
		20 ng/mL		200 ng/mL	
Temperatura pećnice (40±5 °C)	35°C	101.45	1.24	99.14	1.31
	45°C	100.25	1.75	96.46	0.41
Udeo organskog dela mobilne faze (90±5% metanol)	85.5	111.25	0.12	107.91	0.55
	94.5	97.83	1.07	94.89	0.44
Protok MF (0.30±0.05mL/min)	0.25	111.58	1.96	106.72	0.71
	0.35	97.29	1.27	89.4	0.89

RSD - relativna standardna devijacija

#### 4.4. REZULTATI FARMAKOKINETIČKE STUDIJE NA KUNIĆIMA

*In vivo* primena usvojene UHPLC-MS/MS metode prikazana je određivanjem farmakokinetičkih (FK) parametara ambroksola na eksperimentalnom modelu kunića. Ispitivanje je sprovedeno na grupi od tri muška *Oryctolagus cuniculus* kunića u skladu sa regulativom Dobre Laboratorijske Prakse (GLP, 40 CFR Part 160: EPA) i Pravilnikom o upotrebi eksperimentalnih životinja, a po evropskim Etičkim principima rada na laboratorijskim životinjama (EEC 1986; 86/609/EEC). Nakon jednokratne oralne doze od 30 mg životinjama je iz ušne vene uzorkovano po 1 ml krvi u vremenskim razmacima od 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6 i 24 h. Odvojeni su serumi (0.25 mL), uzorci su ekstrahovani utvrđenom SPE procedurom, profiltrirani i injektovani po tri puta u UHPLC-MS/MS aparat. Nakon izvršene kvantifikacije konstruisana je srednja FK kriva koncentracija-vreme (Slika 4.4.2.) i izračunati osnovni FK parametri ambroksola kod kunića nakon jednokratne oralne doze od 30 mg. (Tabela 4.4.1.). Koncentracije ambroksola u serumu u funkciji vremena pojedinačno za kuniće 1, 2 i 3 prikazane su na slici 4.4.1. (a), (b), (c) kao i uporedni prikaz (d).



**Tabela 4.4.1.** Koncentracije ambroksola u serumu kunića 1, 2 i 3 u osam vremenskih tačaka (0-0.25-0.5-1-2-4-6-24 h)

Vreme (h)	Koncentracija ambroksola u serumu kunića (ng/mL)				
	Kunić 1	Kunić 2	Kunić 3	$\bar{X}$	SD
0	0.10	0.10	0.10	0.10	0.00
0.25	54.32	41.74	20.69	38.92	16.99
0.5	83.93	72.20	34.50	63.54	25.83
1	189.14	182.86	184.57	185.52	3.25
2	132.71	119.66	86.39	112.92	23.88
4	28.81	22.96	26.10	25.95	2.93
6	16.42	11.10	13.95	13.83	2.66
24	0.42	0.46	0.50	0.46	0.04

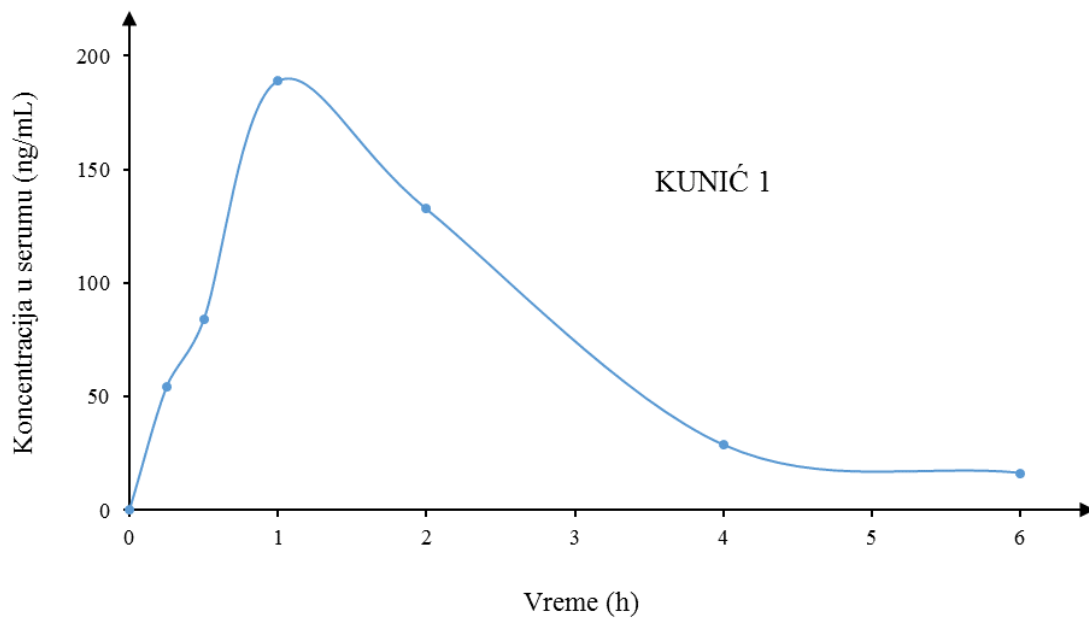
$\bar{X}$  - srednja vrednost merenja; SD - standardna devijacija

**Tabela 4.4.2.** Srednje vrednosti farmakokinetičkih parametara kod kunića nakon primene jedne oralne doze ambroksola od 30 mg (n=3)

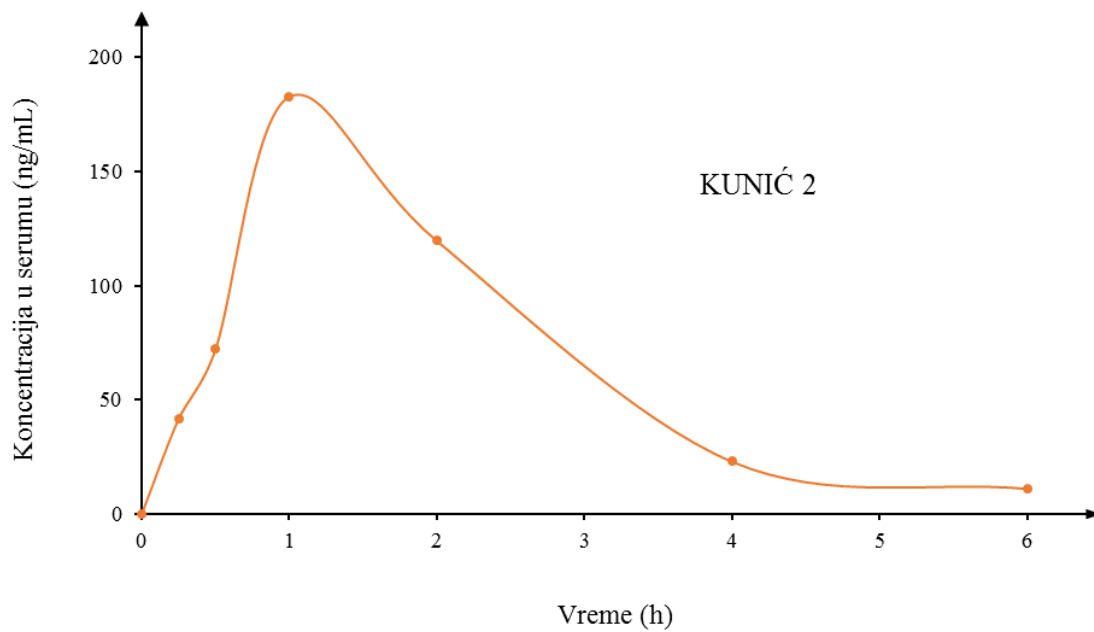
Parametar	Kunić 1	Kunić 2	Kunić 3	$\bar{X} \pm SD$
$C_{max}$ (ng/mL)	189.144	182.858	184.568	185.52 ± 3.25
$AUC_{0-24}$ (h ng/mL)	611.595	515.208	482.384	536.39±67.16
$AUC_{0-inf}$ (h ng/mL)	613.604	517.625	485.002	538.74±66.85
$T_{max}$ (h)	1.89299	1.73912	1.22050	1.61±0.35
MRT (h)	3.13430	2.95855	3.37419	3.15±0.21
$T_{1/2}$ (h)	3.32440	3.67521	3.60423	3.53±0.18
$K_{el}$ (1/h)	0.20850	0.1886	0.19231	0.19±0.01
Cl (mg h/(ng/mL))	0.04889	0.05795	0.06185	0.06±0.01
$V_d$ (mg/(ng/mL))	0.23448	0.3073	0.32163	0.29±0.05
$V_{ss}$ (mg/(ng/mL))	0.15324	0.17146	0.20871	0.18±0.03

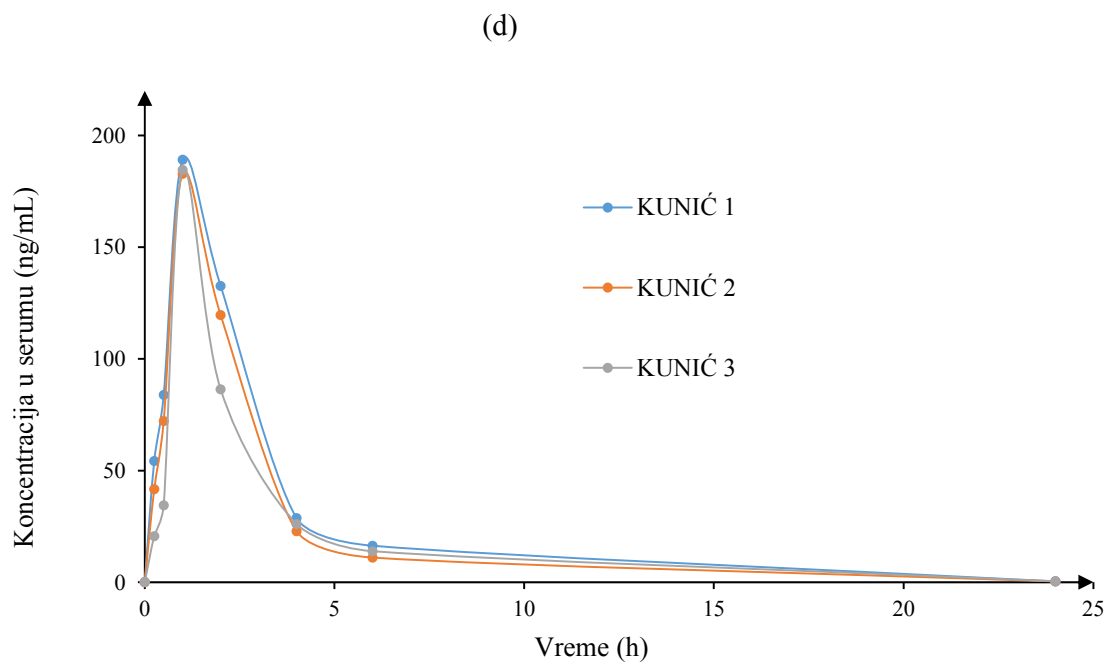
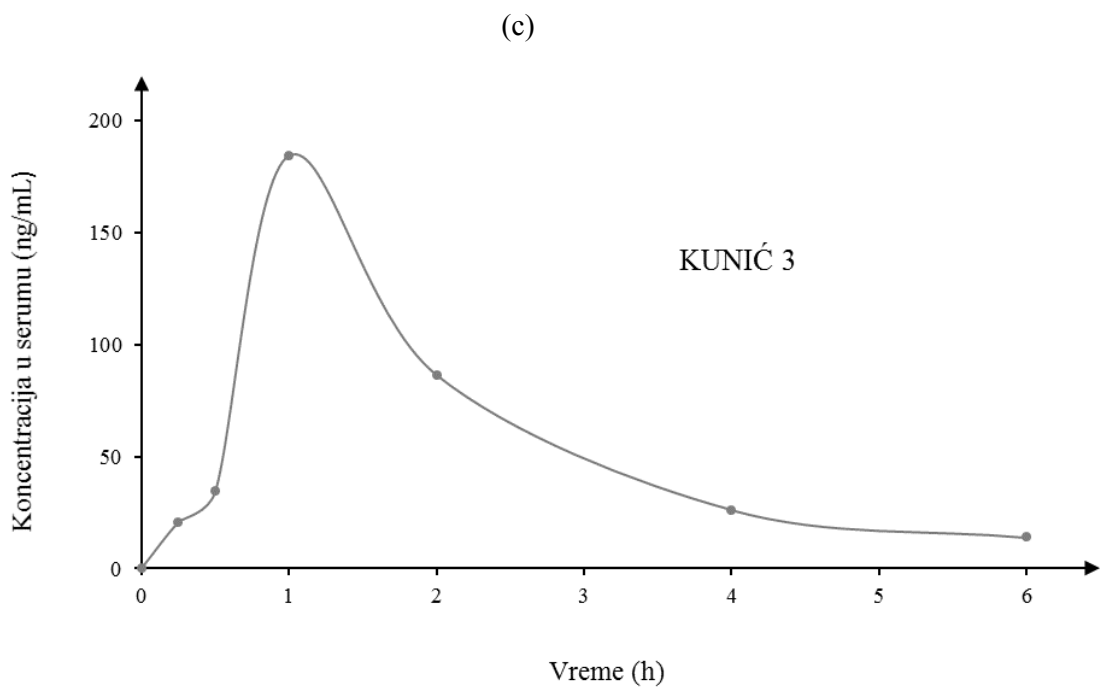
$\bar{X}$  - srednja vrednost; SD - standardna devijacija

(a)

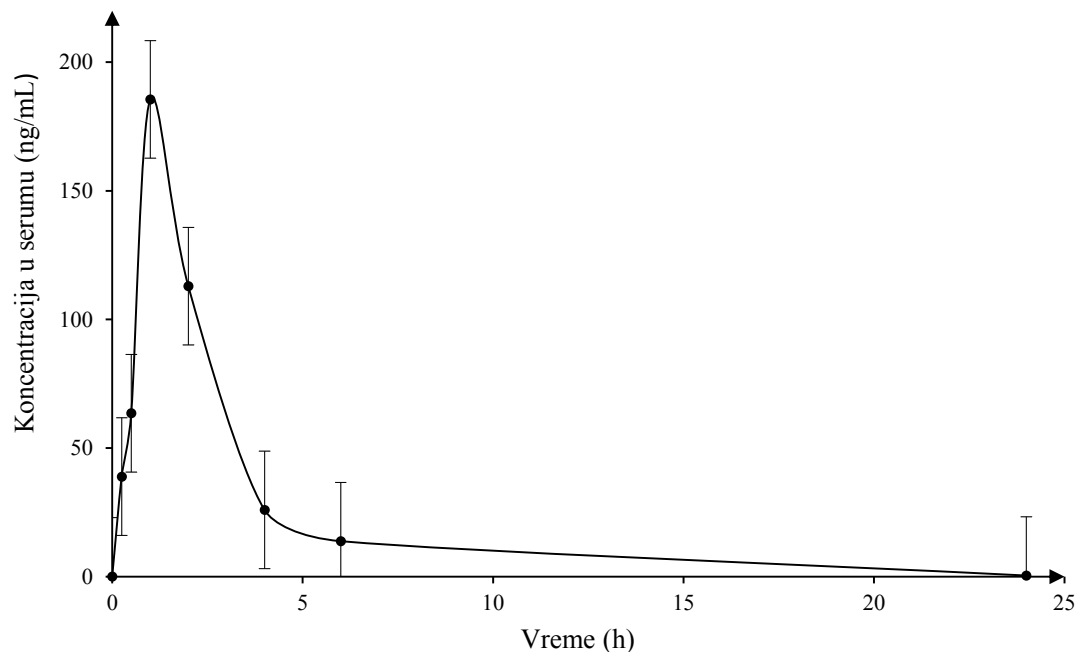


(b)





Slika 4.4.1. Krive zavisnosti koncentracije ambroksola u serumu kunića 1 (a), 2 (b), 3 (c) sa vremenom nakon primene jedne oralne doze ambroksola od 30 mg (0-0.25-0.5-1-2-4-6-24 h) i (d) uporedni prikaz kriva



Slika 4.4.2. Srednja kriva zavisnosti koncentracija - vreme u serumu kunića nakon primene jedne oralne doze ambroksola od 30 mg

#### 4.5. REZULTATI TESTA BRZINE RASTVARANJA AMBROKSOLA IZ TABLETA

Disolucioni test ambroksola iz tableta eksperimentalno je izveden kako bi se pokazala primenjivost postavljene i validirane UHPLC-MS/MS metode u *in vitro* uslovima. U tri medijuma različitih pH vrednosti (1.2, 4.5 i 6.8) koji su oponašali sink gastrointestinalne uslove, na  $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$  pri 50 rpm, rastvorene su po 2 tablete. Nakon određenih vremenskih intervala (1-3-5-10-15-30-60-120-240-360 min) vršeno je uzorkovanje po 0.5 mL rastvora, uzorci su razblaženi i merene su koncentracije ambroksola na aparatu po tri puta. Ispitivanim rastvorima nakon svakog uzorkovanja zapremina je nadoknađena dodavanjem 0.5 mL svežeg rastvora. U tabelama 4.5.1, 4.5.2 i 4.5.3 predstavljene su srednje površine pikova analita i IS, izmerene koncentracije ambroksola ( $C_1$ , ng/mL), faktor razblaženja i preračunate koncentracije ambroksola na jednu tabletu ( $C$ , mg/L), kao i % oslobođenog leka iz tablete sa vremenom.

**Tabela 4.5.1.** Srednje koncentracije i procenat rastvorenog ambroksola iz tableta sa vremenom na pH 1.2 i  $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , n=3

Vreme (min) pH 1.2	$P_{amb}$	$P_{IS}$	F	$C_1^*$ (ng/mL)	Faktor razbl.	$C^{**}$ (mg/L)	% rastvor. leka
1	63251	493592	0.13	11.87	1000/2	5.93	20
3	104917	493699	0.21	18.67	1000/2	9.34	31
5	141725	493610	0.29	24.69	1000/2	12.34	41
10	270077	529044	0.51	42.70	1000/2	21.35	71
15	278812	495775	0.56	46.89	1000/2	23.44	78
30	316762	515391	0.61	51.10	1000/2	25.55	85
60	310201	497859	0.62	51.78	1000/2	25.89	86
120	348110	495876	0.70	58.15	1000/2	29.07	97
240	373462	486212	0.77	63.48	1000/2	31.74	106
360	367623	477227	0.77	63.66	1000/2	31.83	106

\*koncentracija rastvora ambroksola (2x30 mg tablete / 1L) izračunata iz srednje kalibracione krive standarda ambroksola,  $Y = 0.0124X - 0.019$ ; \*\* koncentracija u odnosu na jednu tabletu (30 mg);  $P_{amb}$  - površina pika ambroksola;  $P_{IS}$  - površina pika internog;  $F = P_{amb}/P_{IS}$

**Tabela 4.5.2.** Srednje koncentracije i procenat rastvorenog ambroksola iz tableta sa vremenom na pH 4.5 i  $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , n=3

Vreme (min) pH 4.5	$P_{amb}$	$P_{IS}$	F*	$C_1^*$ (ng/mL)	Faktor razbl.	$C^{**}$ (mg/L)	% rastvor. leka
1	65024	502383	0.13	11.97	1000/2	5.99	20
3	142696	510598	0.28	24.07	1000/2	12.04	40
5	186274	508605	0.37	31.07	1000/2	15.53	52
10	250737	515434	0.49	40.76	1000/2	20.38	68
15	261792	508314	0.52	43.07	1000/2	21.53	72
30	295873	509518	0.58	48.36	1000/2	24.18	81
60	316922	499355	0.63	52.71	1000/2	26.36	88
120	397110	556857	0.71	59.04	1000/2	29.52	98
240	398149	545439	0.73	60.40	1000/2	30.20	101
360	387867	547882	0.71	58.62	1000/2	29.31	98

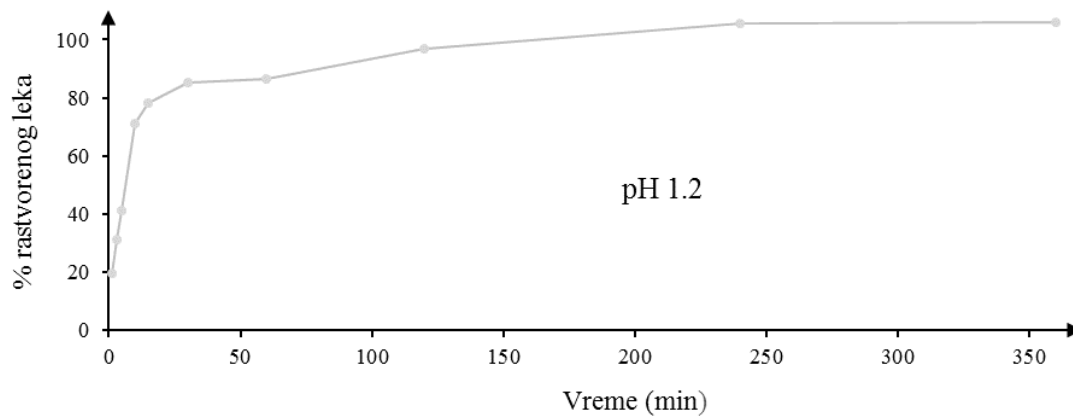
\*koncentracija rastvora ambroksola (2x30 mg tablete / 1L) izračunata iz srednje kalibracione krive standarda ambroksola,  $Y = 0.0124X - 0.019$ ; \*\* koncentracija u odnosu na jednu tabletu (30 mg);  $P_{amb}$  - površina pika ambroksola;  $P_{IS}$  - površina pika internog;  $F = P_{amb} / P_{IS}$

**Tabela 4.5.3.** Srednje koncentracije i procenat rastvorenog ambroksola iz tableta sa vremenom na pH 6.8 i  $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ,  $n=3$

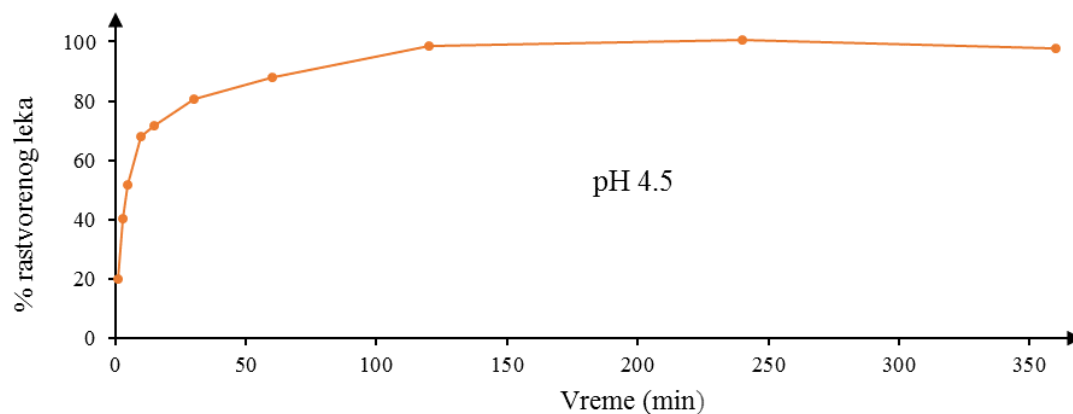
Vreme (min) pH 6.8	$P_{amb}$	$P_{IS}$	$F^*$	$C_1^*$ (ng/mL)	Faktor razbl.	$C^{**}$ (mg/L)	% rastvor. leka
1	84003	461728	0.18	16.20	1000/2	8.10	27
3	126484	474584	0.27	23.03	1000/2	11.51	38
5	174511	471652	0.37	31.37	1000/2	15.69	52
10	236262	466555	0.51	42.37	1000/2	21.19	71
15	260399	472314	0.55	45.99	1000/2	23.00	77
30	289488	476619	0.61	50.51	1000/2	25.26	84
60	299671	453006	0.66	54.88	1000/2	27.44	91
120	335185	452274	0.74	61.30	1000/2	30.65	102
240	341745	447619	0.76	63.10	1000/2	31.55	105
360	342674	433213	0.79	65.32	1000/2	32.66	109

\*koncentracija rastvora ambroksola (2x30 mg tablete / 1L) izračunata iz srednje kalibracione krive standarda ambroksola,  $Y = 0.0124X - 0.019$ ; \*\* koncentracija u odnosu na jednu tabletu (30 mg);  $P_{amb}$  - površina pika ambroksola;  $P_{IS}$  - površina pika internog;  $F = P_{amb} / P_{IS}$

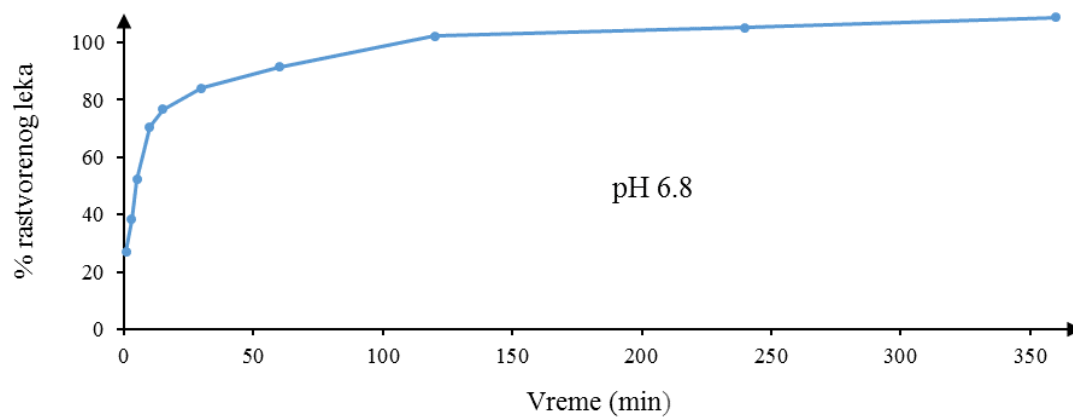
Nakon izvršenih merenja, određene koncentracije ambroksola i preračunatog procenta oslobođenog ambroksola sa vremenom, konstruisane su krive zavisnosti % rastvorenog leka iz tablete sa vremenom. Na slikama 4.5.1, 4.5.2, 4.5.3, predstavljeni su profili brzine rastvaranja ambroksola u deset vremenskih tačaka (1-3-5-10-15-30-60-120-240-360 min), na pH vrednostima 1.2, 4.5 i 6.8, na temperaturi od  $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$  pri 50 rpm. Uporedni prikaz profila brzine rastvaranja ambroksola sa vremenom iz tableta pri različitim pH vrednostima na  $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , prikazahn je na slici 4.5.4.



Slika 4.5.1. Profil brzine rastvaranja ambroksola sa vremenom iz tableta na pH 1.2 i  $37.0\pm 0.5^{\circ}\text{C}$

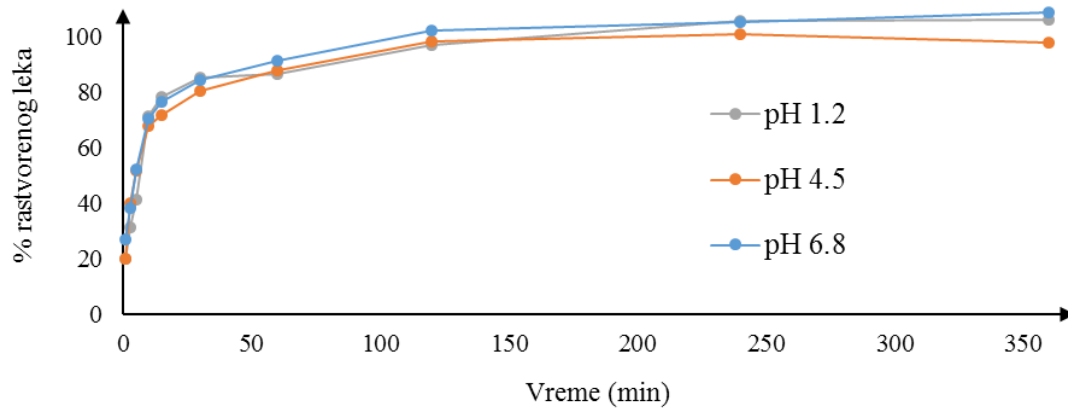


Slika 4.5.2. Profil brzine rastvaranja ambroksola sa vremenom iz tableta na pH 4.5 i  $37.0\pm 0.5^{\circ}\text{C}$



Slika 4.5.3. Profil brzine rastvaranja ambroksola sa vremenom iz tableta na pH 6.8 i  $37.0\pm 0.5^{\circ}\text{C}$





Slika 4.5.4. Uporedni prikaz profila brzine rastvaranja ambroksola sa vremenom iz tableta pri različitim pH vrednostima na  $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$

---

## 5. DISKUSIJA

### 5.1. PRIPREMA UZORAKA SERUMA

Priprema uzorka je veoma važan deo HPLC analize sa osnovnim ciljem dobijanja reprezentativnih, ponovljivih i homogenih uzoraka pogodnih za injektovanje u hromatografske kolone. Dobro pripremljeni uzorci su bez interferenci, ne oštećuju kolone i kompatibilni su sa primenjenom HPLC metodom. Uzorak mora biti rastvorljiv u mobilnoj fazi i bez uticaja na retenciju, rezoluciju i detekciju analita. Kako bi se postiglo bolje razdvajanje i detekcija analita uzorci se mogu ukoncentrisavati i/ili derivatizovati. Priprema podrazumeva širi proces koji otpočinje sakupljanjem uzoraka, a završava injektovanjem uzorka u aparat. To uključuje sakupljanje, transport, čuvanje, laboratorijsko uzorkovanje i pripremu sa razblaživanjem ili ukoncentrisanjem uzorka, zatim filtriranje, centrifugiranje, ekstrakciju i sve ostale postupke do analize uzorka.

Priprema uzoraka može biti automatizovana i manuelna. U većem broju uzorci se pripremaju manuelno i smatra se da priprema uzorka oduzima 60% ukupnog vremena trajanja analize. Postoje najrazličitije multifazne metode za pripremu uzoraka koje predstavljaju pravi izazov u analitici. Međutim, kako preciznost i tačnost analitičke metode uglavnom zavisi od pripreme uzorka ova faza se mora pažljivo isplanirati i razviti [103].

U ovom radu ispitane su tri različite metode izolovanja ambroksola iz seruma sa namerom izbora optimalne, koja bi se kasnije primenila u procesu validacije UHPLC-MS/MS metode. Ispitane su precipitacija proteina (PP), tečno - tečna ekstrakcija (TTE) i tečno - čvrsta ekstrakcija (SPE). PP, TTE i SPE su ispitane u kiseljoj, neutralnoj i alkalnoj sredini primenom HPLC/PDA metode na tri koncentraciona nivoa ambroksola 1-5-10 mg/L sa 10 mg/L verapamila kao internog standarda (IS). HPLC/PDA je primenjena kao pomoćna analitička metoda za ispitivanje ekstrakcionih prinosa različitih načina pripreme uzoraka. Merenja su vršena na koloni Symmetry C-8 (4.6 mm x 250 mm, 5 µm, Waters) i po standardizovanoj HPLC metodi (parametri su detaljno navedeni u odeljku 3.5.1). Za tu namenu konstruisana je posebna kalibraciona kriva preko tri koncentraciona nivoa

standarda ambroksola (1-5-10 mg/L i 10 mg/L IS) koja je prikazana na slici 4.1.1.6. Dobijena kalibraciona kriva opisana je jednačinom  $y = 0.1419x + 0.0182$  sa visokim stepenom korelacije,  $r = 0.9995$ . Kvantifikacija ambroksola u ispitivanim ekstraktima izvršena je metodom internog standarda poređenjem površina izmerenih pikova sa vrednostima za standarde. Identifikacija analita vršena je preko retencionih vremena ( $R_t$ ) i snimljenih UV spektara poređenjem sa spektrima iz korisničke UV/VIS biblioteke. UV apsorpcioni spektri standarda 10 mg/L u metanolu u poređenju sa spektrima iz biblioteke prikazani su na slici 4.1.1.1. za ambroksol i slici 4.1.1.2. za IS. Odgovarajući HPLC hromatogrami standarda ambroksola na koncentracijama 1-5-10 mg/L ( $R_t = 11.48$  min) i IS 10 mg/L ( $R_t = 15.93$  min) prikazani su redom na slikama 4.1.1.3., 4.1.1.4. i 4.1.1.5.

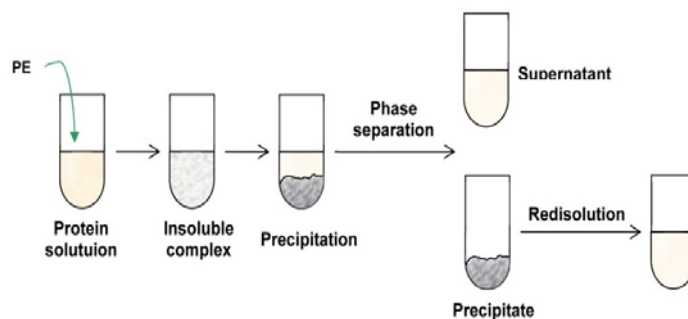
Kako se pri analitizi ultra-brzom tečnom hromatografijom sa visoko osetljivim tandem masenim detektorom koriste kolone sa izuzetno sitnim česticama ( $< 2 \mu\text{m}$ ) osnovni cilj pripreme bio je dobijanje uzoraka visoke čistoće i prinosa. Naročito je trebalo obratiti pažnju na prečišćavanje uzoraka od interferirajućih konstituenata koji bi mogli kontaminirati i zapušiti submikrometarske kolone. Izdvajanje ambroksola iz seruma u visokom procentu postignuto je izborom odgovarajućih rastvarača i podešavanjem pH vrednosti i uslova ekstrakcije u skladu sa fizičko-hemijskim osobinama analita. Na osnovu polarnosti, rastvorljivosti,  $pK_b$  vrednosti i dugih osobina ambroksola i IS razvijeni su svi postupci PP, TTE i SPE ekstrakcije.

Ambroksol je slaba baza ( $pK_a = 8.69$ ) dobro rastvorljiva u metanolu, a slabije u vodi ( $\sim 5$  mg/ml), etanolu ( $\sim 5$  mg/ml) i dimetil-sulfoksidu (DMSO 50 mM), a praktično nerastvoran u metilen-hloridu. Verapamil je izabran kao interni standard zbog sličnih svojstava,  $pK_a = 9.68$ , rastvorljiv je u metanolu, etanolu, izopropanolu, acetonu, etil acetatu [135, 142]. Zbog ograničene rastvorljivosti ambroksola ispitivanje ekstarkcione efiksnosti bilo je usmereno na svega nekoliko organskih rastvarača. Dobra rastvorljivost u metanolu primenjena je u PP i SPE ekstrakcijama, a smeša etra i n-hesana u TTE ekstrakciji u skladu sa literaturnim podacima [75, 100, 101].

### 5.1.1. Precipitacija proteina

Precipitacija ili taloženje proteina (PP) predstavlja jedan od najjednostavnijih načina za pripremu uzoraka sa visokim sadržajem proteina (plazma, serum). To je laka i brza metoda kojom se dobijaju ekstrakti visokih prinosa, ali delimične i nedovoljne čistoće. Na taloženje proteina utiču mnogi faktori kao što je promena temperature, prisustvo kiseline ili baze, UV i jonizujuće zračenje, ultrazvuk, enzimi, teški metali itd. U analitičke svrhe obično se taloženje izaziva dodatkom soli, organskih rastvarača ili promenom pH vrednosti. Najčešći tip taloženja proteina se ostvaruje dodavanjem *soli*. Pri niskim koncentracijama soli rastvorljivost proteina lagano raste (soljenje), dok kod visokih koncentracija rastvorljivost naglo opada (isoljavanje) kada i dolazi do taloženja proteina. Drugi način taloženja je dodavanjem *organskog rastvarača*. Dodavanjem organskog rastvarača smanjuje se dielektrična konstanta sredine što utiče na smanjenje rastvorljivosti proteina i taloženje. Treći način je taloženje *promenom pH* rastvora. Ovaj efekat se javlja zbog prisustva različitih kiselih i baznih funkcionalnih grupa na proteinima. Na određenoj pH, poznatoj kao izoelektrična tačka (pI) ukupno naelektrisanje na proteina je nula. Na pH vrednostima ispod njihove pI proteini su pozitivno naelektrisani, a iznad pI su negativno naelektrisani. Usled toga, proteini se mogu taložiti podešavanjem pH na osnovu njihovih izoelektričnih tačaka (tj. ukupnog naelektrisanja). Izoelektrična tačka je različita za različite proteine.

Praktičan postupak uključuje dodavanje organskog rastvarača (npr. metanol, acetonitril ili aceton), amonijum sulfata ili trihloroacetne kiseline (TCA) u biološki uzorak kao što je krv, serum ili plazma. Nakon precipitacije što uključuje mućkanje/vorteksiranje, uzorak se centrifugira, odvaja proteiniski precipitat na dnu bočice od analita u gornjem vodenom sloju (supernatant), slika 5.1.1.1. Supernatant se pažljivo odvoji i nakon filtriranja može se direktno injektovati u aparat ili prethodno upariti do suva, rekonstituisati u željenoj zapremini i vrsti rastvarača prema potrebama hromatografske analize, a zatim injektuje u aparat [127, 128].



Slika 5.1.1.1. Precipitacija proteina

U ovom radu PP ispitana je dodavanjem metanola u uzorak seruma u kiseljoj, baznoj i neutralnoj sredini na tri koncentraciona nivoa ambroksola 1-5-10 mg/L, 10 mg/L IS (detaljan postupak opisan je u Eksperimentalnom delu, 3.4.1.). Nakon taloženja proteina uzorci su centrifugirani, a zatim filtrirani kroz 0.22  $\mu\text{m}$  špric-filter i u zapremini od 50  $\mu\text{l}$  tri puta injektovani u HPLC aparat. Srednji estrakcioni prinosi iznosili su 59 - 65 % u alkalnoj sredini, 91 – 96 % u neutralnoj i kiseljoj <20 %.

### 5.1.2. Tečno - tečna ekstrakcija

Tečno-tečna ekstrakcija (TTE) je metoda odvajanja analita iz uzorka koja se zasniva na različitoj rastvorljivosti analita u različitim rastvaračima. Kada se rastvor analita u jednom rastvaraču dovede u kontakt sa drugim rastvaračem koji se ne meša sa prvim, rastvoreni analiti se zbog različite rastvorljivosti u ova dva rastvarača raspodeljuju između njih. U biohemijskim analizama najčešće se koriste ekstrakcije iz vodenih rastvora (plazma, urin) pomoću organskih rastvarača koji se ne mešaju sa vodom. Ako se uzorak (vodena faza) koji se sastoji od analita A i B, meša sa nekim organskim rastvaračem u kome se analit A bolje rastvara nego u vodi, a analit B se praktično ne rastvara, dolazi do razdvajanja analita između dve faze tako što najveći deo analita A prelazi u organsku fazu (ekstarhuje se), dok analit B ostaje u uzorku. Tečno - tečna ekstrakcija se najčešće praktično izvodi u levku za odvajanje, pri čemu ako je zapremina organskog rastvarača manja od zapremine vodene faze dolazi istovremeno i do ukoncentrisavanja analita A.

Tečno - tečna ekstrakcija je efikasna, brza i jednostavna tehnika izdvajanja i koncentrovanja analita iz uzorka. Primenuje se za razdvajanje analita u mikro i makro količinama. Razdvajanja su čista, stepen povratne ekstrakcije nizak, a dobijeni ekstrakti se često mogu i direktno injektovati u hromatografske aparate [118]. Tradicionalno prečišćavanje lipofilnih analita kao što su mnogi CNS delujući lekovi izvodi se ekstrakcijom iz bioloških uzoraka sa inertnim, hidrofobnim organskim rastvaračima na odgovarajućoj pH vrednosti. Za efikasno razdvajanje analita najbolje rezultate daju manje polarni rastvarači dok rastvarači sa velikom "ekstrakcionom snagom" smanjuju selektivnost metode tako što podstiču ekstrakciju interferirajućih supstanci. Sa druge strane, upotreba rastvarača kao što su butil-acetat i metil *terc*-butil etar (MTBE) u ekstrakciji lekova i otrova u npr. *screenig* ili opštim HPLC analizama ima prednosti, jer se analiti različitih polarnosti mogu detektovati sličnom metodologijom.

Osobine dobrog ekstrakcionog rastvarača za TTE su: dobra "ekstrakciona moć" - visok stepen rastvaranja analita u njemu, niska mešljivost sa vodom, manja gustina od vode, umerena isparljivost kako bi se olakšalo njegovo uklanjanje isparavanjem, ali ne tolika da ispari tokom pripreme uzorka, zatim stabilnost/inertnost (da ne sadrži stabilizatore), niska zapaljivost, niska inhalaciona i dermalna toksičnost, ekonomičnost i brza nabavka u odgovarajućoj čistoći, odsustvo UV apsorpcije ili elektrohemijske aktivnosti, i transparentnost na NPD/ECD/MS detektorima. Neki od najčeće primenjivanih organski rastvarača u TTE prikazani su u tabeli 5.1.2.1. [108].

**Tabela 5.1.2.1.** Najčešće korišćeni organski rastvarači za TTE

Rastvarač	Gustina (g/cm <sup>3</sup> )	TK (°C)	Limit UV det. (nm)	Zapaljivost	DC	Polarnost <sup>a</sup>	Rastvorlj. u vodi (g /L)
Butil acetat <sup>b</sup>	0.88	125	255	Da	5.01	-	7.0
Hloroform <sup>c</sup>	1.49	61	245	Ne	4.81	4.4	8.0
Cikloheksan	0.78	81	210	Da	2.03	0.0	0.0
1,2-Dihloretan	1.25	83	230	Da	10.65	3.7	8.7
Dihlormetan	1.32	40	235	Da	8.93	3.4	13
Etil acetat <sup>b</sup>	0.90	77	255	Da	6.02	4.3	83
Heptan	0.68	98	210	Da	7.92	0.0	0.5
MTBE	0.74	55	220	Da	4.50	-	48
Petrol etar	0.65	40-60	210	Da	oko 2	-	0.0
Toluen	0.87	111	285	Da	2.38	2.3	0.5

*a* - prema Snyder-u (1974); *b* - akceptor vodonika; *c* - donor vodonika; DC - Dielektrična konstanta; TK - Tačka ključanja

Pri optimizaciji TTE vrši se ispitivanje nekoliko faktora koji utiču na TTE: pH uzorka, vrsta i zapremina ekstrakcionog rastvarača ili smeše rastvarača, dužina, vreme i način ekstrakcije, prisustvo neorganskih soli i drugih rastvarača [140]. Podešavanje pH vrednosti je neophodno za povećanje stepena rastvorljivosti analita u organskim rastvaračima. Rastvorljivost analita u organskom rastvaraču zavisi od stepena jonizacije (disocijacije); npr. neutralni, nepolarni analiti se lakše rastvaraju u organskim rastvaračima u odnosu na potpuno disosovane polarne analite. Podešavanjem pH vrednosti favorizuje se disocijacija ili neutralizacija analita i usmerava kretanje analita iz jedne tečne fazu u drugu. Npr. snižavanjem pH vrednosti rastvora slabo kiselih anjona (dve jedinice ispod pK<sub>a</sub>), dodavanjem kiseline, favorizuje se neutralizacija anjona u vodenoj sredini i olakšava rastvaranje u organskoj fazi [127, 128].

U skladu sa već prikazanim u literaturi metodama za izolovanje ambroksola iz biološkog materijala, kao i njegove ograničene rastvorljivosti u svega nekoliko organskih rastvarača, u ovom radu je ekstrakciona efikasnost kod TTE ambroksola ispitana sa etil acetatom, etrom, n-heksanom, cikloheksanom i hloroformom na različitim pH vrednostim. Značajniji ekstrakcioni prinosi postignuti su smešom n-

heksan - etar (1:1) . Srednji ekstrakcioni prinosi iznosili su 70- 75 % u alkalnoj sredini, 49 – 60 % u neutralnoj i <20 % u kiseloj sredini.

### 5.1.3. Tečno - čvrsta ekstrakcija

Tečno - čvrsta ekstrakcija (SPE, eng. *Solid Phase Extraction*), je ekstrakcija koja se odvija na čvrstom nosaču. Nosač je nerastvoran materijal - adsorbent velike aktivne površine koji fizičkim silama čvrsto vezuje analite. Analiti se zatim primenom odgovarajućeg rastvarača ili smeše rastvarača u vakuum sistemu selektivno eluiraju sa adsorbensa pri čemu se ostvaruje njihovo prečišćavanje i razdvajanje od matriksa.

SPE predstavlja noviji način pripreme bioloških i drugih uzoraka koji je u laboratorijsku praksu uveden 1979. godine. Tradicionalne tehnike pripreme, kao što su PP i TTE nisu više mogle da prate potrebe novijih i osetljivijih analitičkih tehnika (LC-MS, UHPLC-MS/MS) u pogledu čistoće uzoraka, što je dovelo do razvijanja SPE metodologije. Usavršavanje načina pripreme uzoraka bilo je neophodno kako bi se dobili uzorci sa što manje interferirajućeg matriksa koji može znatno uticati na tačnost rezultata merenja u masenoj spektrometriji. SPE se naročito pokazala korisnom kod lekova i otrova koji se teško izoluju TTE ekstrakcijom kao što su kvatenarne amonijumove soli (npr. parakvat, piridostigmin, (+) - tubokurarin) i drugih hidrofilnih analita (npr. glukuronidi). Za razliku od TTE ekstrakcije SPE može vršiti izolovanje i jonizovanih oblika molekula kao i analita koji nisu stabilni na visokim pH vrednostima primenom metoda srednjih pH vrednosti (6-8) [108]. SPE predstavlja jednu od najrasprostranjenijih tehnika za pripremu uzoraka koja se koristi u eksperimentalnim, farmaceutskim, biohemijskim, organskim, sanitarnim i drugim analizama.

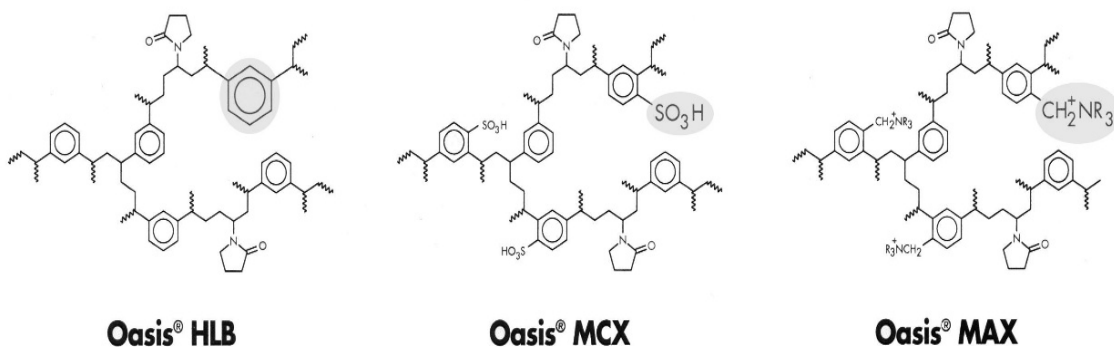
#### Osnovne karakteristike SPE ekstrakcije su:

- visoka osetljivost, specifičnost i selektivnost,
- brzina i ekonomičnost (ne zahteva primenu višekomponentnih pufera, skupih rastvarača i reagenasa),
- primena malih količina uzorka i rastvarača,
- veliki izbor nosač/rastvarač kombinacija,



- minimalan transfer uzorka - visoki prinosi (>95%),
- visoka čistoća ekstrakta,
- minimalna predpriprema uzorka,
- ne javlja se problem emulzije,
- jednostavna upotreba, postupak se može svesti na nekoliko koraka,
- nije neophodno uparavanje ekstrakta što je pogodno za termolabilne analite,
- mogućnost ukoncentrisanja analita,
- minimalan kontakt sa štetnim materijama i lakoisparljivim rastvaračima,
- jednostavno uklanjanje otpada i
- mogućnost uključivanja u proces automatizacije.

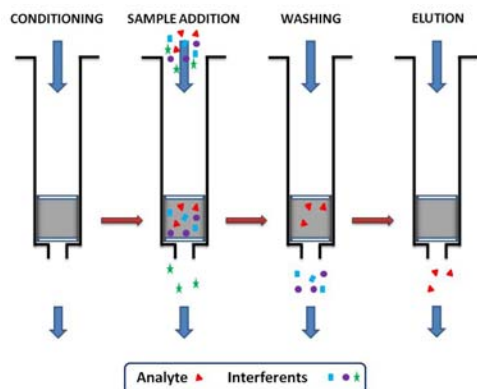
*Tipovi SPE kertridža.* Za ovu namenu proizvode se posebno dizajnirane plastične ili staklene kolonice - kertridži napunjeni odgovarajućim adsorbentom. Adsorbent može biti nemodifikovana silika (C-8, C-18), hemijski modifikovan silikagel (normalne faze, reverzne faze i jonoizmenjivači) ili polimeri (*mix-mode*). Normalno fazni adsorbensi se koriste za izolovanje polarnih analita, a jonoizmenjivački za razdvajanje naelektrisanih ili potencijalno naelektrisanih analita iz nepolarnog matriksa. Mehanizmi interakcija matriksa, analita i adsorbenta su slični onima u tečnoj hromatografiji. Polarne stacionarne faze prvenstveno zadržavaju polarne analite (normalna faza) koji se eluiraju organskim rastvaračima, a nepolarne stacionarne faze zadržavaju nepolarne analite (reverzna faza) i eluiraju se vodenim rastvorima. U jono-izmenjivačkoj ekstrakciji površina adsorbenta je modifikovana tako da se na njoj nalaze jonizovane funkcionalne grupe. Analiti suprotnog naelektrisanja se zadržavaju na adsorbentu, a rastvarač sa kontra-jonom veće snage se upotrebljava za eluiranje analita od interesa [108]. Na slici 5.1.3.1. su prikazane strukture nekih tipova polimernih adsorbenata (HLB, MCX i MAX, *Oasis*, *Waters*), koji su naročito pogodni za reverzno fazne SPE ekstrakcije. Adsorbent HLB kertridža je kopolimer, [poli (divinilbenzen-ko-vinilpirolidin)] koji obezbeđuje hidrofilno - lipofilni balans i primenu u opsegu pH od 0 do 14. MCX i MAX su kopolimerni jonoizmenjivački kertridži sa katjonskim ili anjonskim funkcionalnim grupama koji su pogodni za razdvajanje analita u jonskom obliku [143].



Slika 5.1.3.1. Vrste kopolimerizovanih adsorbenasa (Oasis®, Waters); HLB - neutralni; MCX - katjonski jonoizmenjivač; MAX - anjonski jonoizmenjivač

Princip SPE razdvajanja. Priprema uzorka SPE tehnikom može biti jako specifična ako se uzmu u obzir sve moguće interakcije analita sa adsorbentom. Svaka metoda može biti optimizovana i podešena prema analiziranom uzorku. Dok je razdvajanje TTE ekstrakcijom ograničeno samo koeficijentom raspodele analita između dve faze, u SPE odabirom različitih adsorbenata razdvajanje se može ostvariti polarnim, nepolarnim i/ili jonskim interakcijama. Propuštanjem analiziranog uzorka kroz SP kertridž ostvaruje se više efekata od uklanjanja interferirajućeg matriksa, ukoncentrisanja uzorka do promene matriksa analita u skladu sa primenjenom analitičkom metodom. U većini slučajeva sva tri efekta javljaju se istovremeno.

Kada se uzorak nanese na kertridž mogu se ostvariti dva separaciona moda. U prvom se analiti vezuju za adsorbent, a u drugom propuštaju kroz kertridž. Na slici 5.1.3.2. prikazane su osnovne faze SPE ekstrakcije u slučaju zadržavanja analita na adsorbentu. Nakon kondicioniranja adsorbenta (eng. *conditioning*), uzorak se nanosi na kertridž (eng. *sample addition*) pri čemu dolazi do vezivanja analita za adsorbent a interferirajuće supstance i rastvarač prolaze slobodno. Primenom pogodnog rastvarača uklanjaju se neželjene komponente (eng. *washing*), a na adsorbensu preostaje čist analit. U sledećoj fazi analit se eluira pogodnim rastvaračem ili smešom rastvarača (eng. *solvent elution*).



*Slika 5.1.3.2. Osnovne faze SPE ekstrakcije; kondicioniranje (conditioning), nanošenje uzorka (sample addition), pranje (washing) i eluiranje analita (elution)*

U drugom separacionom modu dešava se suprotan proces, neželjene komponente se vezuju, a analit propušta. Ovaj tip SPE ekstrakcije se primenjuje za prečišćavanje uzorka od interferirajućeg matriksa nepoželjnog za detekciju [128, 143].

U ovom radu ispitani su katjonski, anjonski i neutralni SPE kertridži dva proizvođača (Waters i Phenomenex) na tri koncentraciona nivoa ambroksola 1 mg/L, 5 mg/L i 10 mg/L. Ispitivanje SPE je vršeno različitim rastvaračima i pH različitim vrednostima u skladu sa osobinama analita. Detaljan opis postavljenih SPE procedura dat je u Eksperimentalnom delu 3.4.3. Srednji ekstrakcioni prinosi iznosili su 85 - 93% za kajonske, 40 – 55 % za neutralne i <20 % za anjonske SPE kertridže.

Dobijeni srednji ekstrakcioni prinosi opterećenih seruma ambroksola 1-5-10 mg/L nakon PP, TTE i SPE primenom HPLC metode ( $\lambda=210$  nm,  $n=3$ ) prikazani su redom u tabelama 4.2.1., 4.2.2., 4.2.3. Dobijeni rezultati preko sva tri koncentraciona nivoa pokazuju najveći ekstrakcioni prinos nakon PP u neutralnoj sredini od 91 - 96 %, zatim SP katjon-jonoizmenjivačke ekstrakcije od 89 - 93 % i nešto manje TT ekstrakcije u alkalnoj sredini 70 – 75 %. Reprezentativni HPLC hromatogrami seruma opterećenih ambroksolom prikazani su na slici 4.2.1. nakon PP (1 mg/L, 10 mg/L IS) i slici 4.2.2 nakon katjon-jonoizmenjivačke SPE ekstrakcije (5 mg/L, 10 mg/L IS).

U literaturi je opisano nekoliko načina za izolovanje ambroksola iz biološkog materijala pri čemu je najzastupljenija precipitacija proteina [85, 96, 99-102]. PP je u većini radova ostvarena jednostavnim dodavanjem metanola ili acetonitrila u uzorke koji su zatim centrifugirani, odvojeni supernatanti filtrirani i injektovani u aparat. Najveći prinosi nakon PP od 99 % prikazan u radu *Hang sa sar.* [99]. Zabeležene su i TTE ekstrakcije u alkalnoj sredini primenom metilen hlorida, toluena, etra i heksana (ponegde je primenjena i derivatizacija), gde su postignuti prinosi od 80 - 93 %. Zapremine analiziranih uzoraka kretale su se u opsegu od 200  $\mu\text{L}$  – 1 mL i zapažena je upotreba relativno velikih količina organskih rastvarača do 6 mL [71-73, 84, 85, 97, 98]. U radu *Kiss i sar.* opisana je SPE metoda za izolovanje ambroksola iz plazme sa prinosom od 82 - 91 %. Predstavljena metoda je relativno složena i zahteva relativno veliku količinu uzorka za analizu (1 mL) [70].

U našim ispitivanjima PP u neutralnoj sredini je takođe pokazala najbolje ekstrakcione prinose (max 96 %) ali nije usvojena zbog nedovoljne čistoće uzoraka za MS/MS analizu. TTE je ispitana sa nekoliko organskih rastvarača na različitim pH vrednostima u skladu sa osobinama analita. Zadovoljavajući prinosi (max 75 % iz 250  $\mu\text{L}$  uzorka) postignuti su smešom etar-hesan (1:1) na pH 9 sa nešto nižim vrednosti u odnosu na publikovane prinose od (max 80 % iz 1 mL uzorka) pri istim ekstrakcionim uslovima [84]. Razvijena je i jednostavna SPE procedura za ekstrakciju ambroksola iz seruma. Najbolje rezultati dobijeni su primenom katjon-jonoizmenjivačkih SPE kertridža (*Strata-XC*, *Phenomenix*) iz 250  $\mu\text{L}$  seruma na vrednostima pH (6.7) dve jedinice nižim od pKb ambroksola. Izbor rastvarača za ispiranje nečistoća i eluiranje analita baziran je na osnovnim principima jonoizmenjivačke hromatografije i rastvorljivosti ambroksola i IS (verepamila). Usvojena SPE procedura podrazumevala je prvo razblaženje 250  $\mu\text{L}$  seruma sa fosfatnim puferom, 1:1 (pH 6.7, 50  $\mu\text{L}$  IS), a nakon toga SPE ekstrakciju u nekoliko faza: kondicioniranje - 1 mL MeOH, ekvibracija - 1 mL 0.1N HCl, sušenje pod punim vakuumom 5 min, nanošenje uzorka - 500  $\mu\text{L}$  razblaženog seruma, uklanjanje nečistoća - 1 mL 0.1N HCl, eluiranje analita (I) - 1 mL 0.1N HCl u MeOH, eluiranje analita (II) - 2 x 500  $\mu\text{L}$  5%  $\text{NH}_4\text{OH}$  u 90:10 MeOH / ACN. Razvijenom SPE metodom, dobijeni su zadovoljavajući ekstrakcioni prinosi od 89 do 93 %. Ovako pripremljeni uzorci seruma visoke čistoće

i prinosa bili su prihvatljivi za dalju analizu i učinili SPE ekstrakciju tehnikom izbora za pripremu uzoraka u daljem postupku validacije UHPLC-MS/MS metode.

## 5.2. OPTIMIZACIJA UHPLC SISTEMA

U UHPLC hromatografskim određivanjima za dobijanje najboljih rezultata neophodno je izvršiti podešavanje i optimizacija svih parametara aparata. Optimizacija aparata podrazumeva pravilan izbor analitičke kolone, sastava i protoka mobilne faze kao i temperature kolone. Da bi se podesili parametri neophodno je ispitati ponašanje analita u instrumentu pod uticajem različitih faktora od injektovanja do detekcije. Analiti do detektora prolaze kroz više-komponentni hromatografski sistem koji utiče na distorziju i razvlačenje zone koju zauzimaju molekuli analita prolaskom kroz UHPLC sistem. Ovaj fenomen razvlačenja pikova analita značajno utiče na osetljivost metode. Širenje zone kretanja analita direktno utiče na širenje i smanjenje visine hromatografskih pikova, a time i na osetljivost i rezoluciju hromatografskog razdvajanja. Suprotno, uže zone kretanja analita daju uže pikove i veću hromatografsku efikasnost. Uže pikove detektor lakše beleži usled veće koncentracije molekula analita u užoj zoni kretanja. Stoga je važno poznavati faktore koji utiču na širenje zone kretanja analita (širina pika), kako bi se njihov uticaj kontrolisao i smanjio i na taj način uticalo na poboljšanje performansi hromatografskog razdvajanja.

U hromatografskom sistemu na širinu pikova utiču pre svega kolona, ali i svi ostali delovi UHPLC aparata. U sve ostale delove spadaju zapremina injektovanja, kapilare koje povezuju injektor - kolonu i kolonu - detektor kao i svi njihovi spojevi. Faktori vezani za kolonu uključuju veličinu čestica stacionarne faze, način njihovog pakovanja i difuzione karakteristike vezane za brzinu protoka mobilne faze i veličinu i geometriju analita. Suma varijansi ( $\sigma^2$ ) svih faktora koji utiču na širinu pikova može se predstaviti jednačinom:

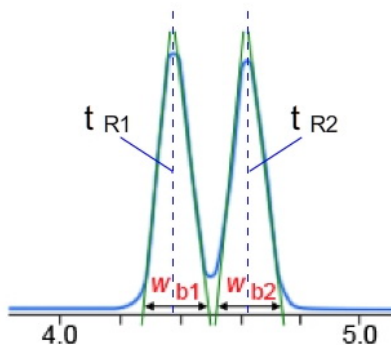
$$\sigma^2 = \sigma^2_{\text{instrument}} + \sigma^2_{\text{kolona}}$$

Ukupni uticaj svih faktora predstavljen je statistički, populacionom varijansom kao zbir varijansi instrumenta i kolone. Populaciona varijansa ( $\sigma^2$ ) je merilo širine Gaussovog pika ( $\sigma$ ) u odnosu na eluiranu zapreminu.

Za postizanje maksimalnih performansi tečnih hromatografa u razdvajanju analita neophodno je smanjiti uticaj oba faktora (instrument i kolona) na najmanju moguću meru. U tom smislu uložen je veliki napor u konstrukciji novih ultra-brzih tečnih hromatografa visokih performansi (UHPLC). Novi modeli trebali su da podrže visoke pritiske uslovljene primenom kraćih submikrometarskih kolona (sa sub-2  $\mu\text{m}$  česticama) i minimiziraju disperziju analita na putu kroz sistem čime bi se postigla teorijski predviđena razdvajanja. Osim toga, bilo je neophodno da UHPLC aparati zadrže i pouzdanost, preciznost i robustnost u rutinskoj laboratorijskoj primeni. Da bi se objasnila važnost uticaja konstrukcije aparata na hromatografsku efikasnost neophodno je razumeti kako disperzija analita u sistemu utiče na razdvajanje analita.

Merenje broja teorijskih podova ( $N$ ) ili efikasnost vezano je za disperziju pika što se može videti iz jednačine:  $N = (V_n / \sigma)^2 = a (V_n / W)^2$ , gde je  $V_n$  - eluirana zapremina određenog pika,  $W$  - širina pika,  $a$  - konstanta koja se određuje na osnovu visine pika na kojoj se meri širina pika. Ovaj metod merenja širine je primenjiv samo za simetrične pikove. Širina pika je u direktnoj vezi sa širinom zone kretanja analita kroz detektor gde vrh pika odgovara najvećoj koncentraciji molekula u zoni kretanja analita (izokratski uslovi). Veći broj teorijskih podova odgovara većoj efikasnosti razdvajanja, što je obrnuto proporcionalno širini hromatografskih pikova. Uži pikovi - veća efikasnosti razdvajanja analitičke kolone. Opšte je prihvaćeno da na broj teorijski podova utiču samo karakteristike kolone, međutim tu je veliki uticaj i ostalih delova aparata: dužina i prečnik spojeva kapilara, brzina snimanja detektora, itd.

Hromatografska rezolucija ( $R_s$ ) u bazičnom smislu predstavlja širinu ( $W$ ) dva pika u odnosu na njihovo rastojanje ( $t_{R,2} - t_{R,1}$ ). Uži i oštiji pikovi na većem rastojanju su merilo dobre hromatografske rezolucije što je prikazano na slici 5.2.1.



Slika 5.2.1. Dobro hromatografsko razdvajanje dva analita

Fundamentalna jednačina rezolucije hromatografskog razdvajanja može se predstaviti:  $R_s = t_{R,2} - t_{R,1} / (W_{b1} + W_{b2}) / 2 = \sqrt{N} / 4 (\alpha - 1/\alpha) (k/k + 1)$ , gde je  $N$  - broj teorijskih podova,  $\alpha$  - selektivnost,  $k$  - retencioni faktor,  $W_{b1}/W_{b2}$  - širina pikova 1 i 2 na retencionim vremenima  $t_{R,2}$  i  $t_{R,1}$ .

Jednačina rezolucije može se matematički raščlaniti na više relevantnih pojmova, kao skup fizičkih i hemijskih parametara koji utiču na hromatografsko razdvajanje; efikasnost ( $N$ ), selektivnost ( $\alpha$ ) i retencija ( $k$ ). Selektivnost i retencija su hemijski parametri koji na poboljšanje rezolucije utiču promenom radne temperature, izborom rastvarača i kolone, i sastavom mobilne faze. Efikasnost je fizički (mehanički) parametar kojim se teže manipuliše u cilju poboljšanja razdvajanja zbog uticaja kvadratnog korena na rezoluciju. Primenom submikorometarskih kolona (<2  $\mu\text{m}$ ) značajno se može uticati na efikasnost rezolucije što predstavlja glavni fokus UHPLC tehnologije. Retencija ( $k$ ) i selektivnost ( $\alpha$ ) su hemijski faktori i mera interakcije analita sa stacionarnom i mobilnom fazom. Rezolucija se može poboljšati povećanjem  $k$ , što podrazumeva duže retenciono vreme, ali i manju selektivnost i širenje hromatografskih pikova. Takođe, povećanje  $\alpha$  može uticati na bolju rezoluciju, u smislu eluiranja analita u sličnom vremenskom periodu i/ili promeni redosleda eluiranja. Pod pretpostavkom da se broj teorijskih podova ( $N$ ) povećava smanjenjem veličina čestica stacionarne faze to neće uticati na promenu rastojanja pikova već samo na širinu pikova. Smanjenje veličina čestica rezultira užim i bolje definisanim hromatografskim pikovima, te doprinosi poboljšanju rezolucije i osetljivosti. Primenom submikorometarskih kolona u UHPLC tehnologiji omogućeno je maksimalno povećavanje uticaja fizičkih parametara na rezoluciju minimizirajući širenje zone analita pod uticajem instrumenta i postizanje veće efikasnosti.

Kao što prikazuje osnovna jednačina rezolucije, rezolucija je direktno proporcionalna kvadratnom korenu efikasnosti ( $R_s$  ekv.  $\sqrt{N}$ ), a efikasnost je obrnuto proporcionalna veličini čestica kolone. Ako se veličina čestica smanji 3x (npr. od 5  $\mu\text{m}$  do 1.7  $\mu\text{m}$ ) teoretski i efikasnost se poveća 3x, rezultirajući povećanjem rezolucije 1.7x ( $\sqrt{3}$ ). Pri konstantnoj dužini kolone:  $N$  ekv.  $1/d_p$ ,  $d_p \downarrow 3x$ ,  $N \uparrow 3x$ ,  $R_s \uparrow 1.7x$ , gde je  $d_p$  - prečnik čestice.

Kako bi se postigla maksimalna efikasnost i rezolucija, brzina protoka mobilne faze mora biti usklađena sa veličinom čestica. Optimalna brzina protoka

( $F_{opt}$ ) je obrnuto proporcionalna veličini čestica. Pri smanjenju čestica 3x protok se povećava 3x rezultujući skraćanjem vremena analize 3x:  $F_{opt}$  ekviv.  $1 / d_p$ ,  $d_p \downarrow 3x$ ,  $R_s \uparrow 1.7x$ ,  $T \downarrow 3$ , gde je  $T$  - vreme trajanja analize (pri konstantoj dužini kolone). Pri povećanju brzine protoka vreme analize se skraćuje a pikovi postaju uži. Sužavanjem pikova proporcionalno se povećava njihova visina. Pikovi postaju viši i lakše se detektuju odnosno razlikuju od bazne linije (veće S/N) što rezultira boljom osetljivošću metode. Ako je  $N$  ekviv.  $1 / w^2$ , onda je  $d_p \downarrow 3x$ ,  $N \uparrow 3x$ ,  $R_s \uparrow 1.7x$ , gde je  $w$  - širina hromatografskog pika.

Teoretsku analizu uticaja parametara instrumenta na širinu zone kretanja analita kroz hromatografski sistem je neophodno poznavati kako bi se razumeo princip funkcionisanja UHPLC tehnologije i ostvarila maksimalna efikasnost i rezolucija u praktičnom radu [111].

### Van Deemter-ova kriva

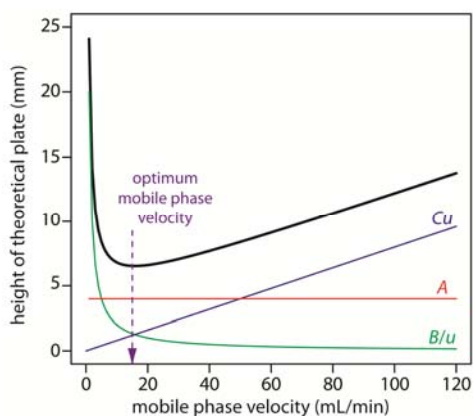
Kao što je ranije napomenuto, širina hromatografskog pika može se predstaviti kao statistička distribucija molekula analita (varijansa,  $\sigma^2$ ). Širina pika raste linearno, proporcionalno dužini zone kretanja analita kroz kolonu i aparat. Odnos širine pika i dužine zone kretanja analita predstavlja koncept visine ekvivalentne teoretskom podu (HETP ili  $H$ ). Prema teoriji destilacije  $H$  je mera karakteristike kolone koja uzima u obzir nekoliko srodnih procesa koji dovode do širenja zone analita. Pojednostavljena jednačina za određivanje visine ekvivalentne teorijskom podu može se predstaviti kao:  $HETP = L / N$ , gde je  $L$  - dužina kolone,  $N$  - broj teorijskih podova. Na molekularnom nivou procesi u hromatografskoj koloni mogu se predstaviti interakcijom molekula analita sa molekulima mobilne i stacionarne faze, a parametri koji utiču na hromatografske karakteristike posmatrati sa aspekta difuziono-zavisnih procesa. Prolaskom analita kroz hromatografsku kolonu u struji mobilne faze dešava se nekoliko difuziono-zavisnih procesa:

- Kretanje molekula analita preko površine čestica i oko čestica kolone (vrtložna difuzija). Obeležava je konstanta  $A$  i zavisi od krupnoće i oblika čestica, načina pakovanja i prečnika kolone.



- Difuzija molekula analita u i iz mobilne faze (longitudinalna, molekulska difuzija). Karakteriše je konstanta **B** i obrnuto je proporcionalna brzini kretanja mobilne faze (linearna brzina).
- Difuzija molekula analita u i iz pora stacionarne faze - otpor prenosu mase u tečnoj fazi (transfer mase). Obeležava je konstanta **C** i zavise od linearne brzine mobilne faze i kvadrata prečnika čestica.

Difuziono-zavisni procesi se matematički prikazuju van Deemter-ovom jednačinom:  $HETP = a (d_p) + b / \mu + c (d_p)^2 \mu$ , gde je  $\mu$  - brzina kretanja mobilne faze. Konstante A, B i C su grafički prikazane kao odnos HETP i brzine protoka mobilne faze na slici 5.2.2.



Slika 5.2.2. Grafički prikaz van Deemter-ove jednačine

Konstanta A je prikazana horizontalnom linijom. Zavisi od veličine čestica, načina pakovanja kolone i ne zavisi od linearne brzine protoka mobilne faze. Smanjivanjem dimenzija čestica u pakovanju kolona, smanjuje se vrednost H a povećava efikasnost hromatografskog razdvajanja.

Konstanta B je predstavljena silaznom krivom sa povećanjem protoka mobilne faze. Zavisi od veličine čestica i brzine protoka mobilne faze. Kriva pokazuje da sporije kretanje mobilne faze dovodi do dužeg zadržavanja analita u koloni i veće mogućnosti širenja zone kretanja (difuzije) analita duž kolone. Suprotno, pri bržim protocima manje je vremena za difuziju pa je i širenje zone kretanja analita manje.

Rastućim linearno zavisnim odnosom između  $H$  i  $\mu$  predstavljena je na grafiku konstanta  $C$ . Distribucijom neki molekuli analita ulaze u pore stacionarne faze dok drugi ostaju u mobilnoj dok ne dostignu druge čestice. Ovaj proces je reverzibilan jer se vezani molekuli ponovo rastvaraju u mobilnoj fazi i nastavljaju kretanje duž kolone. Za prelazak molekula iz pore u poru, odnosno za prenošenje molekula analita sa čestice na česticu stacionarne faze potrebno je određeno vreme. Što su dimenzije čestica manje, ovaj proces je brži i zona kretanja analita uža. Pri većim protocima mobilne faze razvija se velika udaljenost između vezanih i slobodnih molekula i poroširuje zona distribucije molekula analita. Kako bi se izbegao ovaj efekat, smanjila disperzija molekula i širenje zone kretanja analita na putu kroz kolonu, neophodno je primeniti manje protoke mobilne faze.

Van Deemter-ova kriva se dobija sabiranjem sva tri uticaja  $A$ ,  $B$  i  $C$ . Najniža tačka krive odgovara optimalnoj vrednosti protoka mobilne faze pri kojoj se postiže najveća efikasnost, odnosno najbolje hromatografsko razdvajanje. Kriva se eksperimentalno dobija merenjem  $N$  u zavisnosti od brzine protoka za neku od komponenti smeše. Pri niskim protocima efikasnost je mala zbog većeg učešća molekulske difuzije ( $B$ ), a nakon optimalnog protoka (minimum krive gde je  $B$  zanemarljiva) i sa porastom protoka najveći udeo u širenju pikova ima otpor prenosu mase u tečnoj fazi ( $C$ ). U tom delu kriva ima blaži nagib i zavisnost je skoro linearna. U rutinskim analizama najčešće se radi sa protocima iznad optimalnog (zbog blagog nagiba krive malo se gubi na efikasnosti), koji se podešava u zavisnosti od prečnika kolone [113].

Za poboljšanje performansi u UHPLC tehnologiji ne koristi se samo smanjenje širine pikova za bolje hromatografskog razdvajanja za kraće vreme, već i povećanje pritiska u aparatu. Pritisak se inherentno stvara prolaskom mobilne faze kroz aparat i to u spojevima kapilara na putu od pumpe do injektora, od injektora do kolone, u samoj koloni, u post kolonskom delu i detektoru. Ukupan sistemski pritisak predstavlja kumulativni efekat svih delova aparata (instrument + kolona). Povećanjem brzine protoka mobilne faze povećava se i pritisak u aparatu. Na pritisak značajno utiče prečnik i dužina spojeva kapilara. Razlike u pritiscima dve kolone mogu se odrediti teorijskim proračunom, oduzimanjem pritiska generisanog od strane samog aparata (merenje protoka bez kolone) i totalnog pritiska aparata (instrument + kolona).

Smanjenjem dimenzija čestica povratni pritisak u aparatu se povećava brzinom obrnuto proporcionalnom kvadratu prečnika čestica. Istovremeno protok mobilne faze raste sa smanjenjem prečnika čestice. Pritisak pri optimalnom protoku za dati prečnik čestica raste brzinom koja je obrnuto proporcionalna veličini čestica na kub:  $\Delta P_{opt} = 1 / d_p^3$ , gde je  $\Delta P_{opt}$  - optimalni pritisak,  $d_p$  - veličina čestica pri konstantnoj dužini kolone. Ako se smanji veličina čestice 3x, pri konstantnoj dužini kolone dolazi do povećanja povratnog pritiska 27x. Kod konvencionalnih HPLC zbog limita u radnim pritisacima (350 - 400bar; 5000 - 6000 psi) postoji veliko ograničenje u upotrebi efekta smanjenja veličina čestica kolone na poboljšanje hromatografske rezolucije. Upotreba kolona manjih čestica kod standardnih HPLC aparata, obično rezultira skraćivanjem dužine kolone ili radom na sub-optimalnim protocima.

Cilj dobrog hromatografskog razdvajanja je održanje rezolucije uz istovremeno smanjenje vremena trajanja analize (održavanje odnosa  $L/dp$  konstantnim), gde će se manji povratni pritisak ostvariti ako se sa smanjenjem veličine čestica smanjuje i dužina kolone. Pri proporcionalnom smanjenju veličine čestica i dužine kolone promena pritiska je obrnuto proporcionalna kvadratu veličine čestica (što je povoljnije nego kubna zavisnost):  $\Delta P_{opt} = 1 / d_p^2$ , P ekviv. L. Smanjivanjem dužine kolone i veličine čestica 3x, povratni pritisak se posledično povećava 9x. Pri optimalnim protocima pritisak stvoren submikrometarskim česticama prevazilazi limite standardnih HPLC aparata. Nova UHPLC tehnologija (gornja granica pritiska 1030 bar; 15000 psi) je dizajnirana tako da podržava visoke pritiske upotrebom sub-2  $\mu$ m kolona pri optimalnim protocima mobilne faze.

Jedan od načina kompenzacije pritiska generisanog upotrebom submikrometarskih kolona je i povećanje temperature kolone. Pri konstantnoj brzini protoka, povećanje temperature kolone smanjuje viskoznost mobilne faze i snižava pritisak u aparatu. Povećanjem temperature kolone takođe raste i brzina transfera molekula analita u i iz pora stacionarne faze (difuzija), što zahteva povećanje protoka kako bi se zadržale performanse dobrog hromatografskog razdvajanja [111].

Značajno povećanje hromatografske efikasnosti i rezolucije UHPLC sistema primenom submikrometarskih kolona i novih konstrukcija aparata pokazuje znatno poboljšanje performansi tečne hromatografije i mogućnost proširivanja njene primene. Zbog velike specifičnosti i osetljivosti, UHPLC metode se danas rutinski

primenjuju u laboratorijama različitih namena. Osim što omogućuju visok kvalitet hromatografskog razdvajanja i određivanje analita u tragovima, UHPLC znatno umanjuje i troškove analiza usled skraćivanja vremena analize i smanjenja utroška rastvarača.

U skladu sa navedenim teorojskim prikazom u ovom radu je izvršena optimizacija *Nexera* UHPLC (Shimadzu) hromatografskog sistema. Ispitan je uticaj različitih parametara, kao što su tip kolone, sastav mobile faze (MF), temperatura kolone i brzina protoka MF na hromatografsko razdvajanje analita i osetljivost UHPLC metode. Na raspolaganju su bile tri 1.3, 1.7 i 2.6  $\mu\text{m}$  submikrometerske C-18 kolone. Kako su sve kolone iste dužine, prečnika i vrste punjenja (oktadecil-modifikovani silika gel) na hromatografsko razdvajanje i intenzitet analiziranih pikova uticale su samo dimenzije čestica stacionarne faze. Smanjivanje veličina čestica rezultiralo je užim i bolje definisanim hromatografskim pikovima što je doprinelo boljoj rezoluciji kao i osetljivosti metode pri istim protocima i sastavu MF. Nakon dobijenih rezultata i u literaturi uočenog nedostaka primene 1.3  $\mu\text{m}$  kolona za određivanje ambroksola u biološkom materijalu, za dalji proces validacije izabrana je 1.3  $\mu\text{m}$  C-18 kolona dimenzija 2.1 mm x 50 mm.

U optimizaciji sastava MF vršeno je ispitivanje puferskih i nepuferskih vodeno-organskih mobilnih faza na različitim pH vrednostima. Puferske MF ispitane su u lako isparljivim kombinacijama amonijum acetat - sirćetna kiselina i amonijum formijat - mravlja kiselina u neutralnoj i kiseloj sredini. Puferi su pravljeni u koncentracijama soli 5, 20 i 30 mM na pH 3 – 7, prema metodama predloženim u literaturi [74, 75]. Primenom puferskih MF dobijeni su nešto uži i oštriji pikovi analita za manje retenciono vremena, ali sa zanemarljivom razlikom u odnosu na nepuferske MF na istoj pH vrednosti. Fosfatni puferi nisu testirani zbog slabe isparljivosti i mogućnosti kontaminiranja MS/MS detektora, kao i sposobnosti građenja adukt jona sa analitima. Od nepuferskih vodeno-organskih MF ispitane je kombinacija vode sa acetonitrilom ili metanolom pri kiselim uslovima gde vodeni deo MF sadrži od 0.01 – 0.1 % mravlje kiseline. Uočeno je da intenzitet pikova raste sa smanjenjem kiselosti i povećanjem procenta organskog dela MF. Na izgled hromatografskih pikova nije u značajnoj meri uticao izbor organskog rastvarača (metanol ili acetonitril). Upotreba acetonitrila uslovlila je nešto manji pozadinski pritisak kolone i kraće retenciono vreme

analita u odnosu na metanol, ali je za dalji rad izabran metanol zbog bolje rastvorljivosti ambroksola u njemu. Postignuta osetljivost od 0.5 ng/mL bila je u skladu sa literaturnim podacima [102]. Kako bi se pojednostavio analitički postupak i izbeglo dodatno ispiranje UHPLC-MS/MS sistema upotrebom puferskih MF i time produžilo vreme trajanja analize, konačan izbor bila je nepuferska MF metanol - 0.01% mravlja kiselina u vodi (90:10, v/v).

Ispitivanje uticaja protoka MF vršeno je blagim povećavanjem brzine protoka od 0.1 do 0.7 ml/min. Povećanje brzine MF uticalo je na sužavanje hromatografskih pikova i smanjenje vremena retencije ( $R_t$ ) analita kao i ukupnog vremena trajanja analize. Na protocima većim od 0.3 ml/min uočeno je preklapanje hromatografskih pikova i pojava nepoželjnog pozadinskog pritiska od preko 800 bara (max 1000 bara), a pri manjim vrednostima dolazilo je do razvlačenja pikova. Analizom dobijenih hromatograma zaključeno je da se zadovoljavajuća rezolucija i osetljivost metode može postići pri protoku MF od 0.3 ml/min sa vremenom trajanja analize od 1.5 min i  $R_t$  za ambroksol 0.79 min i 0.91 min za IS.

Uticaj temperature pećnice na hromatografsko razdvajanje ispitan je u opsegu od sobne temperature do 50°C. Povećanje temperature imalo je pozitivan efekat do 45°C u pogledu snižavanja pozadinskog pritiska kolone i bolje rezolucije analita. Najbolji rezultati postignuti su na 40°C.

Na osnovu izvršenih testiranja, usvojeni UHPLC hromatografski parametri bili su C-18 kolona dimenzija 2.1 mm x 50 mm x 1.3  $\mu\text{m}$ , mobilna faza metanol – 0.01 % mravlje kiseline u vodi (90:10, v/v) pri protoku 0.3 mL/min i temperaturi kolone od 40°C (zapremina injektovanog uzorka 2  $\mu\text{l}$ ). MRM jonski hromatogrami 20 ng/mL ambroksola ( $m/z$  378.9 $\rightarrow$ 263.8) i 20 ng/mL IS ( $m/z$  455.2 $\rightarrow$ 164.9) u multi reakcionom monitoring modu na usvojenim parametrima UHPLC-MS/MS metode prikazani su na slici 4.1.3.3 (c).

### 5.3. OPTIMIZACIJA MS/MS DETEKTORA

Za postizanje optimalnih uslova snimanja na tandem-masenom spektrometru izvršena je *opšta* i *specifična* kalibracija aparata. Po preporuci proizvođača opšta kalibracija vršena je na godišnjem nivou i nakon čišćenja i/ili servisiranja aparata komercijalnim rastvorom poletilen glikola, a specifična referentnim standardima visoke čistoće pri optimizaciji aparata prema željenim analitima. Izabrani su najpodesniji tip i vrsta jonskog izvora, protoci nosećeg i pomoćnog gasa, temperature i naponi detektora kao i MRM tranzicije analita.

Specifična kalibracija MS/MS aparata prema analitima ostvarena je u dve faze. U prvoj snimljeni su potpuni (totalni, TIC) jonski hromatogrami stadarda u širem opsegu jonskih masa  $m/z$  100 – 600 tzv. *full scan* modu pri koncentracijama od 100 mg/L i protoku MF od 0.2 mL/min. Totalni jonski hromatogrami služe za određivanje protonizovanog  $[M+H]^+$  ili deprotonizovanog  $[M-H]^-$  molekuskog jona analita koji bi se dalje pratio u MRM optimizaciji kao prekursor jon. Da bi se odredili tačni molekulski joni analita za MRM praćenje neophodno je izabrati adekvatan jonizacioni mod prema osobinama analita. Shimadzu LCMS 8030 aparat je opremljen sa tri jonizaciona moda API na atmosferskom pritisku: APCI (hemijski), ESI (elektrosprej) i DUIS (kombinovani). ESI i APCI su "meke" jonizacione tehnike koje daju oskudne masene spektre sa najintenzivnijim (+) ili (-) molekuskim jonom. Veliku primenu nalaze u kvantifikaciji i određivanju  $M_r$  nepoznatih jedinjenja, dok za strukturnou analizu zbog slabe fragmentacije nemaju veći značaj. ESI modul je pogodan za jonizaciju analita većih molekulskih masa do nekoliko hiljada atomskih jedinica mase (peptidi, proteini) i/ili visoke polarnosti kao što su kvatenarni amini, sulfatna jedinjenja, nukleotidi i fosfolipidi. Preduslov je samo da se analit nalaziti u rastvoru gde je moguća njegova jonizacija, pa se mobilnim fazama često dodaju male količine isparljive kiseline ili baze kako bi se pospešila jonizacija analita.

Kako su ispitivani analiti u ovom radu srednjih molekulskih masa (378 g/mol za ambroksol i 454 g/mol za verapamil) i polarnosti nije se očekivalo veće odstupanje od procedura optimizacije i izbora jonskog izvora predloženih u literaturi [75, 99, 100]. U skladu sa literaturnim podacima eksperimentalnim putem dobijeni su bolji rezultati ESI jonizacijom u odnosu na APCI. ESI maseni spektri u (+) pozitivnom modu

sadržali su intenzivne molekulske jone sa slabom fragmentacijom kao što je prikazano na slici 4.1.3.1. (a) za ambroksol i (b) za IS. Maseni spektri snimljeni u (-) negativnom jonskom modu nisu pokazali zadovoljavajuće rezultate. Na osnovu dobijenih spektara kao optimalna izabrana je ESI (+) jonizacija sa prekursor pozitivnim  $[M+H]^+$  molekulskim jonima  $m/z$  378.9 za ambroksol i  $m/z$  455.3 za IS (verapamil).

Kako bi se povećala osetljivosti i specifičnosti MS/MS analize u daljem radu primenjen je multi reakcioni monitoring mod (MRM). Osnovni princip MRM je dodatna fragmentacija  $[M+H]^+$  molekulskog jona analita sudaranjem sa molekulima pomoćnog gasa argona u CID komori. MS/MS detektor se nalazi pod visokim vakuumom kako bi se postiglo kontrolisano kretanje i fragmentacija jona. Fragmentacijom se dobijaju produkt joni koji omogućuju visokospecifično praćenje analita izborom odgovarajuće tranzicije *prekursor jon* → *produkt jon*. Naponi u CID komori definišu fragmentaciju analita i izgled masenih spektara koji sadrže produkt jone. Kolizijom idukovana jonizacija rezultira bogatijim (složenijim) masenim spektrima i većom osetljivošću metode. Izborom napona u MS/MS detektoru (Q1, CID, Q2) selektuje se samo prolaz odgovarajućeg prekursor jona u prvom Q1, a produkt jona u drugom Q2 kvadrupolnom analizatoru čime se ostvaruje visoka specifičnost metode. Pomoću automatskog vodiča u Lab Solution računarskom programu izvršena je optimizacija multi reakcionog monitoring moda za ambroksol i verapamil, i podešeni su ostali parametri MS/MS detektora. Za svaki analit određeni su najintenzivniji produkt joni na optimalnim naponima Q1/Q3 kvadrupolnih analizatora, optičkih delova aparata i odgovarajućim kolizionim energijama, što je prikazano u tabeli 4.1.3.1. Fragmentacijom prekursor jona dobijeni su redom najintenzivniji produkt joni  $m/z$  264, 116, 185 za ambroksol i  $m/z$  165, 303, 150 za IS. Na slici 4.1.3.2. su prikazani tipični maseni spektar produkt jona protonizovanog molekulskog jona (a) ambroksola,  $m/z$  378.9→263.8 i (b) verapamila (IS),  $m/z$  455.3→165.0, u MRM modu sa naznačenim fragmentacijama. Selektovane jonske tranzicije za dalji u rad MRM modu bile su  $m/z$  378.9→263.8 za ambroksol i  $m/z$  455.3→165.0 za IS, merene redom u odvojenim vremenskim segmentima od 0.4 - 1.2 min i 0.5 - 1.5 min. Ukupno vreme trajanja analize bilo je 1.5 min sa *dwell/pause* vremenom 200/1 msec za ambroksol i 100/2 msec za IS. Kolizione energije su

optimizovane i primenjene redom za ambroksol i IS na -20 V i -25 V; Q1 prekursor bias/Q3 produkt bias vrednost na: -28/-18 V i -11/-10 V. U tabeli 4.1.3.1. su prikazane i vrednosti *Pause Time* i *Dwell Time*, Q1 i Q3 Pre-Bias naponi i kolizione energije (CE) selektovanih jonskih tranzicija.

Ostali parametri tandem MS detektora bili su: temperature desolvatacionog kapilare (DL): 270°C i grejnog bloka (HB): 400°C, naponi detektora: - 1.92 kV, konverzije dinode: 6 kV, izlaznog sočiva CID komore: - 4.0 V i interfejsa 4.5 V. Argon je upotrebljen kao kolizionni gas (230 kPa) i azot kao nebulizer i pomoćni (*dry*) gas pri protocima od 3 i 15 L/min. Sa optimizovanim uslovima vršena su dalja merenja u postupku validacije i primene UHPLC-MS/MS metode. Slika 4.1.3.3. daje pregled MRM jonskog hromatograma a) ekstrakta seruma bez internog standarda (blank), b) ekstrakta seruma sa internim standardom (nula, zero), c) ekstrakta seruma opterećenog sa 20 ng/mL ambroksola (m/z 378.9→263.8) i 20 ng/mL IS (m/z 455.2→164.9) i d) ekstrakta seruma kunića 4h nakon primene jedne oralne doze ambroksola od 30 mg.

U literaturi su nalaze mnogobrojne metode za određivanje ambroksola u plazmi, urinu i farmaceutskim formulacijama primenom spektrofotometrijskih metoda [78-80], GC-ECD [97, 98] i HPLC sa UV/VIS i fluorescentnim detektorom [87-95, 70-73]. Širok je spektar primenjenih ekstrakcionih tehnika i analitičkih uslova, tipa kolone, satava MF, pH vrednosti i osetljivosti. Međutim, prikazane metode nisu idealne za opsežne farmakokinetičke studije zbog visokih LOQ (4 ng/mL – 30 µg/mL) i dugotrajnih postupaka pripreme uzoraka, kao i vremena trajanja analize (> 5 min). Za postizanje odgovarajućih LOQ primenjena je relativno velika zapremina uzorka (0.5-5 mL) i organskih rastvarača (do 1- 6 mL) [69, 78-92, 97, 98]. Kod HPLC metoda prevladuje upotreba 5µm reverzno-faznih C-18 kolona i fostano-puferskih MF na pH 3-6 čija priprema takođe oduzima dosta vremena i produžava vreme trajanja analize [70, 71, 73, 93]. U novije vreme primenom visoko-osetljivih LC- MS/MS metoda analitika ambroksola je znatno unapređena [74, 75, 99-102]. Postignuti su limiti detekcije od 0.2 - 2.0 ng/mL sa 0.1 - 1 mL uzorka. Primenuju se kraće kolone sa submikrometarskim česticama (<2 µm) što znatno skraćuje vreme analize (< 10 min), kao i lakoisparljive puferske i nepuferske MF. *Kim i sar.* [74] su



opisali za sada najostljiviju tečno-tandem masenu metodu (LC–MS/MS) za određivanje ambroksola iz plazme. Metoda se pokazala linearnom u opsegu 0.2–200 ng/mL i izuzetno osetljivom sa LOQ 0.2 ng/mL, ali sa upotrebom 1mL plazme i injektovanjem 20 µL uzorka u aparat. Nedostatak metode je i upotreba relativno velike količine ekstrakcionog rastvarača (6 mL etra) i dugotrajan proces pripreme (>20 min), kao i primena složene puferske MF sa visokom pH vrednostima, ne preporučljivim za UHPLC sisteme (20 mM amonijum acetat u 90 % AcN, pH 8.8). Pregledom metoda zaključeno je da je neophodno razviti ekstrakciono i puferski jednostavniju LC–MS/MS metodu za određivanje ambroksola u biološkom materijalu kako bi našla praktičniju primenu.

UHPLC-MS/MS metodom u ovom radu može se odrediti ambroksola iz malih količina seruma (250 µl) nakon SPE ekstrakcije i primene jednostavne nepuferske MF i C-18 1.3 µm submikrometerske kolone. Visoka osetljivost i dobro razdvajanje analita postiže se injektovanjem 2 µl uzorka (prema literturnim podacima najmanja zabeležena zapremina). Separacija analita se ostvaruje na Rt 0.79 min za ambroksol i 0.91 min za IS sa ukupnim vremenom trajanja analize od 1.5 min, što omogućuje analizu većeg broja uzoraka za kraće vreme. Postavljenom UHPLC-MS/MS metodom postignuta su sledeća poboljšanja u odnosu na publikovane maseno spektrometrijske metode: 1) hromatografsko razdvajanje primenom nepuferske mobilne faze na 1.3 µm submikrometarkoj koloni za nekoliko minuta, 2) visoka osetljivost sa veoma malom količinom uzorka i zapreminom injektovanja, i 3) visoka čistoća i prinos ekstrakata uzorka nakon SPE ekstrakcije. Usvojena UHPLC-MS/MS metoda je izuzetno pogodnom za dugotrajne validacione procese sa velikim brojem analiza. Nakon validacije metoda bi mogla naći značajnu primenu u *in vivo* i *in vitro* farmakokinetičkim ispitivanjima gde bi obezbedila relevantne i pouzdane rezultate.

## 5.4. VALIDACIONI PARAMETRI

### 5.4.1. Kalibracione krive i linearnost

*Kalibracione krive* (eng. *calibration curves*). Veći broj snimljenih podataka u eksperimentalnim merenjima se analizira sa ciljem određivanja optimalnih uslova

metode (npr. ponovljivost retencionog vremena, površina pika, granice detekcije, linearnost). Kada se utvrde optimalni uslovi merenja vrši se kvantifikacija ciljanog analita u poznatom standardnom uzorku, a zatim u nepoznatom uzorku na osnovu rezultata dobijenih snimanjem standarda. U cilju kvantifikacije kreira se kalibraciona kriva iz vrednosti površine pikova standardnih uzoraka poznatih koncentracija koja se koristi za izračunavanje koncentracije ciljne komponente u nepoznatom uzorku.

Kalibraciona, regresiona ili standardna kriva predstavlja odnos između odgovora detektora i poznate koncentracije analita u zadatom opsegu merenja. Odnos između odgovora detektora i koncentracije analita treba da bude kontinuiran i ponovljiv. Za opisivanje proporcionalnosti neopohodno je primeniti najjednostavniju funkciju.

Kalibracija bioanalitičkih metoda je znatno složenija od kalibracije metoda za određivanje aktivnih supstanci (AS). Linearna kalibracija metoda za određivanje AS je jednostavna i ostvaruje se merenjem malog broja standardnih uzoraka, dok je kalibracija bioanalitičkih metoda znatno složenija usled ekstrakcije uzoraka i dodavanja internog standarda. Izmerene koncentracije najmanje četiri od šest standarda ne uključujući nulu (67 %) treba da budu  $\pm 15$  % od očekivane vrednosti ( $\pm 20$  % za LLOQ). Kalibraciona kriva se obrazuje za svaki analit u uzorku (npr. plazma) pomoću opterećenih uzoraka. Opterećeni uzorak se priprema u istom matriksu kao i originalni uzorak dodavanjem poznatih koncentracija analita u prazan matriks. Prema validacionim vodičima za bioanalitičke metode (FDA, ICH) kalibraciona kriva se konstruiše sa najmanje 6-8 uzoraka (bez nule) koji pokrivaju očekivani opseg merenja, uključujući i LLOQ. Kalibracione krive moraju da sadrže i prazan uzorak (eng. *blank sample*) - matriks bez analita i internog standarda, i nulti uzorak (eng. *zero sample*) - matriks uzorka bez analita sa internim standardom. U analitičkom radu konstruišu se dva tipa kalibracionih krivih: sa standardnim rastvorima u vodi ili metanolu i opterećenim uzorcima odgovarajućeg matriksa (kalibratori). Za određivanje LLOQ potrebna su dva uslova (1) odgovor analita na LLOQ mora biti više od 5 puta veći od praznog uzorka, i (2) pik analita treba da bude prepoznatljiv, diskretan i ponovljiv uz nepreciznost  $\leq 20$  % i tačan 80 - 120 % [103].

*Linearnost.* Linearnost je sposobnost metode da u datom opsegu merenja pruži direktno proporcionalne rezultate (npr. odnos površina pik/IS) sa koncentracijom

analita. Linearnost se uopšteno predstavlja kao varijansa nagiba kalibracione krive (npr. standardna greška određena regresionom analizom) koja ujedno definiše osetljivost metode. Linearnost metode se utvrđuje sa najmanje 5 standardnih koncentracija koje su u opsegu od 80 - 120 % od očekivane vrednosti. Predstavlja se matematički i grafički. Matematički se izražava pomoću regresione jednačine  $y = A \cdot x + B$  (npr.  $y$  - odnos površina pik/IS za datu koncentraciju  $x$ ,  $A$  - nagib prave u odnosu na  $x$ -osu i  $B$  - odsečak na  $y$ -osi) i korelacionog koeficijenta ( $r$ ) koji predstavlja stepen rasipanja tačaka oko idealne prave. Dobijene vrednosti koeficijenta korelacije određuju kvalitet linearnosti date prave tj. stepen zavisnosti između promenljivih  $x$  i  $y$ ., što predstavlja U idalnom slučaju linearnosti  $r = 1$ . Prema preporukama FDA i ICH vrednost korelacionog koeficijenta ( $r$ ) treba da bude  $\geq 0.99$  za prihvatanje linearnosti metode. Kriterijum prihvatanja odsečka  $B$  je  $\pm 2$  % odnosno da što manje odstupa od nule jer svako veće odstupanje ukazuje na postojanje nekih interakcija. Značajan podatak za proveru linearnosti odgovora detektora je faktor odgovora (eng. *Response Factor*, RF), koji predstavlja odnos odgovora detektora i koncentracije. Ova vrednost je konstantna u oblasti u kojoj važi linearnost za bilo koje vrednosti odgovor/koncentracija.

Postupak određivanja linearnosti podrazumeva injektovanje kalibracionih standarda, konstruisanje kalibracione krive i utvrđivanje linearnost izračunavanjem: parametara jednačine prave  $y = A \cdot x + B$  (npr. metodom najmanjih kvadrata), standardne devijacije odsečka na  $y$ -osi,  $SD_y$ , standardne devijacije nagiba prave,  $SD_a$  i koeficijenta korelacije ( $r$ ) i njegove standardne devijacije  $SD_r$  [103, 104, 106].

U ovoj tezi linearna korelacija ispitana je između odnosa površina pikova ambroksol/IS ( $F$ ) i koncentracije ambroksola ( $C$ ). Konstruisane su kalibracione krive standardnih rastvora ( $STD_{S,S=1-5}$ ) i opterećenih seruma – kalibratora ( $CC_{S, S=1-9}$ ). Rastvori kalibratora napravljeni su na devet koncentracionih nivoa 0.5-2-5-10-20-50-100-150-200 ng/mL (ne uključujući nulu), a standarda na pet 0.5-10-20-100-200 ng/mL. Merenja su zatim vršena u tri različita dana sa po šest ponavljanja po koncentraciji ( $n=6$ ). Pojedinačna tačnost i preciznost merenja kalibratora na svakom koncentracionom nivou prikazana je u tabelama 4.3.1.1. za 1CC, 4.3.1.2. za 2CC i 4.3.1.3. za 3CC kalibracionu krivu. Na osnovu srednjih vrednosti odnosa površina pikova ambroksola i IS ( $F$ ) konstruisane su po tri STD i CC kalibracione krive kao  $F =$

$f(C)$  i prikazane na slikama 4.1.2.1. za 1STD, 4.1.2.2. za 2STD i 4.1.2.3. za 3STD i slikama 4.3.1.5. za 1CC, 4.3.1.6. za 2CC i 4.3.1.7. za 3CC. Korelacije dobijenih kalibracionih kriva,  $F = f(C)$  izražene su sledećim regresionim jednačinama:

$$1\text{STD: } y_1 = 0.0125 x_1 - 0.0187, r = 0.9995,$$

$$2\text{STD: } y_2 = 0.0125 x_2 - 0.0007, r = 0.9999,$$

$$3\text{STD: } y_3 = 0.0123 x_3 - 0.0375, r = 0.9949,$$

$$1\text{CC: } y_1 = 0.0125 x_1 - 0.0018, r = 0.9996,$$

$$2\text{CC: } y_2 = 0.0128 x_2 - 0.0004, r = 0.9990,$$

$$3\text{CC: } y_3 = 0.0121 x_3 - 0.0016, r = 0.9999.$$

Na osnovu dobijenih jednačina  $n\text{STD}_{n=1-3}$  i  $n\text{CC}_{n=1-3}$  određene su i srednje jednačine kalibracionih pravih standarda,  $\text{STD}_{\text{Sr}}$  i kalibratora,  $\text{CC}_{\text{Sr}}$  kao  $y = (a \pm \text{SD}_a) x - (b \pm \text{SD}_b)$ ,  $r \pm \text{SD}_r$ , gde je  $y$  = odnos površina pikova ambroksol/IS ( $F$ ),  $x$  = koncentracija ambroksola,  $a$ - nagib prave i  $b$ -odsečak prave:

$$\text{STD}_{\text{Sr}}: y = (0.0124 \pm 0.0001) x - (0.0019 \pm 0.0184), r = 0.9981 \pm 0.0028,$$

$$\text{CC}_{\text{Sr}}: y = (0.0125 \pm 0.0003) x - (0.0013 \pm 0.0008), r = 0.9995 \pm 0.0004.$$

Srednje tačnosti i preciznosti dobijenih kalibracionih krivih preko devet koncentracionih nivoa (0.5-2-5-10-20-50-100-150-200 ng/mL,  $n=6$ ) prikazani su u tabeli 4.3.1.5. za 1CC, 4.3.1.6. za 2CC i 4.3.1.7. za 3CC. Rezultati regresione analize pojedinačnih kalibracionih krivih kao i srednjih kalibracionih krivih standarda i kalibratora prikazane su redom u tabelama 4.1.2.1. i 4.3.1.4. Za sve kalibracione krive utvrđene su jednačine prave sa pripadajućim koeficijentima korelacije ( $r$ ), standardne greške (SG), standardne devijacije odsečaka, tačnosti i preciznosti. Sumarni valdacioni izveštaji kalibratora prikazani su u tabelama 4.3.1.8. za 1CC, 4.3.1.9. za 2CC i 4.3.1.10. za 3CC. Za CC kalibracione krive dobijene su srednje vrednosti koeficijenta korelacije ( $r$ ) od  $0.9995 \pm 0.0004$  ( $0.9990 - 0.9999$ ), standardne greške (SG)  $0.0086 \pm 0.0051$  ( $0.0040 - 0.0138$ ), standardne devijacije odsečka ( $\text{SD}_y$ )  $0.028 \pm$

0.011 (0.019 – 0.041). Tačnost merenja bila je  $104.14 \pm 7.76$  % za 1CC,  $102.24 \pm 7.04$  % za 2CC i  $102.46 \pm 6.91$ % za 3CC a srednja precinost merenja 3.49 % RSD.

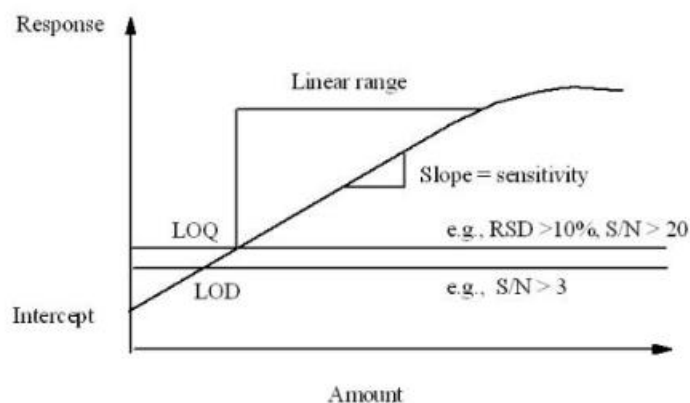
Tačnost gore navedenih rezultata potvrđena je statističkim testovima linearnosti kalibracionih krivih 1CC, 2CC i 3CC na nivou značajnosti  $p=0.001$ . Pod određenim uslovima neophodnim za izvođenje validne linearne regresije, dobijeni su pouzdani statistički podaci i definisana je najbolja aproksimativna funkcija za prognozu zavisne promenljive. Nisu primećeni značajna odstupanja (eng. *outlier*), tj. tačke koje bitno odstupaju od grafika dobijene regresione krive. Homosedastičnost, odnosno homogenost varijansi reziduala je utvrđena primenom *Hartlijevog testa*, a njihova nezavisnost je dokazana primenom *Durbin-Vatsonovog autokorelacionog testa*. Takođe, može se smatrati da reziduali imaju normalnu raspodelu, što je pokazao *Šapiro-Vilk test normalnosti*. Urađen je i test poređenja dobijene i empirijske krive (eng. *lack of fit test*) koji je pokazao vrlo mala odstupanja krivih i visok koeficijent korelacije ( $r > 0.999$ ) između posmatranih varijabli. Vrednost  $p < 0.001$  pokazuje da dobijeni linearni regresioni model ima visoku pouzdanost u prognoziranju posmatrane promenljive, te da sa visokom tačnošću opisuje empirijske podatke. Detaljna obrada podataka izvršena je primenom Excelu 2010, a rezultati primenjenih testova sa odgovarajućim tabelama prikazani u Prilogu 1.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je postavljena UHPLC-MS/MS metoda za određivanje ambroksola u serumu linearna, precizna i tačna u opsegu koncentracija 0.5 – 200 ng/mL.

#### 5.4.2. Opseg merenja

Prema ICH smernicama, opseg (raspon) merenja je linearni interval između gornje i donje koncentracije analita koje se mogu izmeriti precizno i tačno primenjenom analitičkom metodom. Opseg se određuje potvrđivanjem linearnosti, preciznosti i tačnosti analitičke metode pri merenju uzoraka koji sadrže količine analita u ili na granicama usvojenog opsega analitičke metode. Opseg se izražava u istim jedinicama kao i rezultati izmereni postavljenom metodom (npr. ng/mL). Prema ICH smernicama, opseg metode mora biti najmanje od 80 - 120 % u odnosu na koncentraciju ispitivanog analita, odnosno najmanje od 50 - 150 % kada se određuju

nečistoće. Na slici 5.4.2.1. prikazana je grafička definicija linearnosti i opsega analitičke metode.



Slika 5.4.2.1. Grafički prikaz linearnosti i opsega analitičke metode; response - odgovor, amount - koncentracija, intercept - odsečak, slope - nagib, sensitivity - osetljivost, LOD - limit detekcije, LOQ - limit kvantifikacije

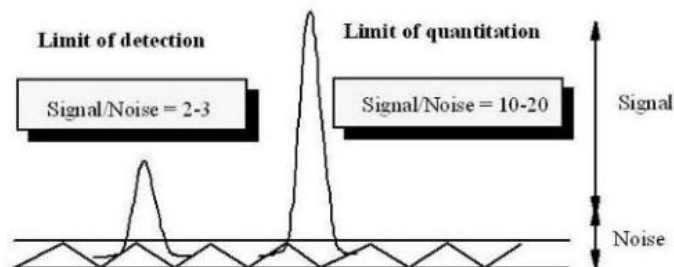
Opseg merenja se obično izvodi iz studije linearnosti što je učinjeno i u ovom radu i nisu vršena dodatna merenja. Interval koncentracija koji je usvojen za UHPLC-MS/MS metodu kao linearan, precizan i tačan je 0.5 - 200 ng/ml.

### 5.4.3. Granica detekcije i granica kvantifikacije

Granica ili limit detekcije se definiše kao najniža koncentracija analita u uzorku koja se može detektovati ali ne nužno i kvantifikovati, dok limit kvantifikacije predstavlja najnižu koncentraciju analita u uzorku koji se može kvantifikovati sa prihvatljivom preciznošću i tačnošću.

*Limit detekcije* (LOD, eng. *limit of detection*) se obično poistovećuje sa terminom osetljivosti metode. Osetljivost analitičke metode je sposobnost metode da pravi male razlike u koncentracijama analita. U praktičnom smislu osjetljivost je nagib kalibracione krive odgovor detektora - koncentracija analita. Limit detekcije predstavlja količinu injektovanog analita koja daje pik visine najmanje 2 - 3 puta veće od šuma bazne linije ( $\geq 3:1$  ili  $2:1$ ) kao što je predstavljeno na slici 5.4.3.1.

Određivanje LOD iz odnosa signal/šum se primenjuje samo u slučaju postojanja šuma bazne linije.



Slika 5.4.3.1. Limit detekcije i limit kvantifikacije preko odnosa signal/šum

Prema ICH smernicama LOD se može odrediti na tri načina:

- *Vizuelnom evaluacijom.* LOD se određuje analizom uzoraka poznate koncentracije i uspostavljanjem minimalnog nivoa na kome se analit može pouzdano detektovati. Vizuelna evaluacija se primenjuje i kod neinstrumentalnih i kod instrumentalnih metoda.
- *Prema standardnoj devijaciji odgovora blank (praznih) uzoraka.* Analizom odgovarajućeg broja praznih uzoraka meri se veličina pozadinskog odgovora (šum bazne linije) a zatim se statističkim preračunavanjem određuje standardno odstupanje tih odgovora. Prihvatljivi rezultati su  $RSD \leq 20 \%$ .
- *Prema standardnoj devijaciji baziranoj na nagibu kalibracione krive.* Ispituje se posebno konstruisana kalibraciona kriva sa koncentracijama analita oko granice detekcije. Rezidualna standardna devijacija linije regresije ili standardna devijacija odsečka na y-osi se može koristiti kao standardna devijacija. Limit detekcije se tada određuje jednačinom:  $LOD = 3.3 \sigma / A$ , gde je  $\sigma$  - standardna devijacija odgovora blank uzoraka ili odsečka kalibracione krive, A - nagib kalibracione krive.

U validacionim izveštajima limit detekcije se dokumentuje zajedno sa primenjenom metodom. Vizuelno utvrđen LOD na osnovu odnosa signal/šum se dokumentuje ogovarajućim hromatogramima pri čemu se relevantnost može naknadno potvrditi nezavisnom analizom određenog broja uzoraka blizu LOD i

preračunavanjem standardne devijacije. Na slici 5.4.2.1. je grafički prikazana evaluacija LOD i LOQ preko odnosa signa / šum.

Određivanje *limita kvantifikacije* (LLOQ ili LOQ, eng. *limit of quantification*) je postupak koji se ostvaruje u dva koraka. Bez obzira na primenjenu metodu, LOQ se prvo procenjuje na osnovu eksperimentalnih podataka kao što je odnos signal/šum ili nagiba kalibracione krive, a zatim potvrđuju statističkom obradom dobijenih rezultata na LOQ. Prema ICH u zavisnosti da li je metoda instrumentalna ili ne-instrumentalna, postoji nekoliko načina za utvrđivanje granice detekcije. Prema vizuelnoj evaluaciji odnosa signal / šum i prema standardnoj devijaciji odgovora detektora ili nagiba kalibracione krive.

- *Vizuelna evaluacija* LOQ se određuje analizom uzoraka poznate koncentracije analita i uspostavljanjem minimalnog nivoa na kome se analit može kvantifikovati sa prihvatljivom preciznošću i tačnošću. Vizuelna evaluacija se primenjuje kod ne-instrumentalnih i instrumentalnih metoda sa baznom linijom. Meri se signal uzorka s poznatom niskom koncentracijom analita (blizu LOQ) i praznih uzoraka a zatim se određuje minimalna koncentracija na kojoj se analit može pouzdano kvantifikovati. Tipičan odnos signal-šum je 10:1 kao što je predstavljeno na slici 5.4.3.1.

- *Procena LOQ prema standardnoj devijaciji odgovora detektora i nagiba kalibracione krive* se određuje iz jednačine:  $LOQ = 10 \sigma / A$ , gde je  $\sigma$  - standardna devijacija odgovora detektora,  $A$  - nagib kalibracione krive. Nagib se očitava sa kalibracione krive dok se standardna devijacija može odrediti pomoću blank uzoraka ili odsečka kalibracione krive. Standardna devijacija bazirana na blank uzorcima određuje se merenjem intenziteta bazne linije odgovarajućeg broja blank uzoraka i izračunavanjem standardne devijacije tih odgovora. Drugi tip određivanja koristi kalibracionu krivu sa opsegom koncentracija analita od LOQ gde se rezidualna standardna devijacija regresione prave ili standardna devijacija  $y$  - odsečka koristi kao standardna devijacija. U validacionim izveštajima LOQ se navodi sa metodom koja se koristila za njeno određivanje. Granica kvantifikacije se naknadno potvrđuje analizom odgovarajućeg broja kontrolnih uzoraka sa koncentracijama na ili blizu granice kvantifikacije [104, 126].

U ovom radu LOD ambroksola primenom UHPLC-MS/MS metode utvrđen je vizuelnom metodom na 0.25 ng/mL pri odnosu S/N = 3.4 – 4.8, a LLOQ na 0.5



ng/mL pri odnosu S/N = 10.5 – 10.9. Opterećeni uzorci seruma na LLOQ i LOD su po šest puta u tri dana injektovani u aparat (n=3x6), a zatim visine pikova upoređivane sa visinom bazne linije (intenzitet B.L. 150-200). Preciznost merenja iznosila je 14.44 % RSD za LOD i 16.24 % RSD za LLOQ, a tačnost 101.61 % za LOD i 100.02 % za LLOQ. Evaluacija rezultata prikazana je u tabeli 4.3.3.1. za LOD i u tabeli 4.3.4.1 za LLOQ. Statistička obrada dobijenih podataka pokazala je da su tačnost i preciznost merenja za LOD i LLOQ u saglasnosti sa ICH validacionim kriterijumima  $RSD \leq 20\%$ .

U literaturi se vrednosti LOQ za ambroksol kreću u širokom opsegu od 0.2 ng/mL do 2 mg/mL u zavisnosti od tipa i osetljivosti primenjene analitičke metode. Kod spektrometrijskih metoda LOQ se kreće od 1 - 2  $\mu\text{g/mL}$  [78-80], kod HPLC metoda od 5 ng/mL do 1.5 mg/mL [70-73, 87-95], elektrohemijskih metoda od 4 - 5 ng/mL [81-84] i kod gasne hromatografije sa EC detektorom do 10 ng/mL [97, 98]. Najniži LOQ postignut je visoko osetljivim maseno spektrometrijskim metodama od 0.2 – 0.5 ng/mL [74, 75, 99-102].

Na osnovu dobijenih vrednosti LLOQ u ovom radu zaključeno je da su rezultati u skladu sa literaturnim podacima [102]. Pretpostavlja se da bi se injektovanjem veće zapremine uzorka mogao postići i niži LLOQ i time povećala osetljivost metode. Međutim, u ovoj fazi istraživanja uticaj zapremine injektovanja na povećanje osetljivosti metode nije ispitan usled primene hromatografskih kolona veoma sitnih čestica od 1.3  $\mu\text{m}$  (nedovoljno podataka u literaturi o primeni) i mogućnosti kontaminiranja kolone većim zapreminama uzorka. Ovakva mogućnost ostavlja se za dalja ispitivanja.

#### 5.4.4. Tačnost i preciznost metode

Tačnost je mera ekzagzaktanosti analitičke metode ili bliskosti odgovora između prihvaćene referentne vrednosti (standard) i izmerene vrednosti uzorka. U datom mernom opsegu tačnost se izražava kao udeo (procenat, prinos) izmerenog analita primenjenom analitičkom metodom u odnosu na stvarnu referentnu vrednost. Termin koji se još koristi za tačnost metode je i istinitost metode (eng. *trueness*). Tačnost se određuje višestrukim merenjem identičnih uzoraka koji sadrže poznatu količinu

analita (opterećeni serumi), a rezultati prikazuju kao devijacija srednje od prave vrednosti, udeo %  $\pm$  SD. Validacioni vodiči ICH i FDA preporučuju najmanje pet merenja po uzorku, na minimum tri do pet koncentraciona nivoa npr. za lekove 80, 100, 120% od preporučene doze pri čemu srednja vrednost za sve koncentracije treba da bude  $\pm 15$  % od stvarne vrednosti osim za donju granicu kvantifikacije LLOQ gde je prihvatljiva vrednost  $\pm 20$  % [103].

Preciznost analitičke metode se definiše kao bliskost (slaganje, usaglašenost) rezultata dobijenih iz više merenja homogenog uzorka u kratkom vremenskom intervalu pod istim uslovima. Preciznost je mera ponovljivosti i reproduktivnosti jedne analitičke metode. Statistički se procenjuje standardnom devijacijom (SD) ili relativnom standardnom devijacijom (RSD) tj. koeficijentom varijacije (CV). ICH i FDA vodič preporučuju najmanje pet merenja po koncentraciji na najmanje tri koncentraciona nivoa preko očekivanog opsega merenja. Nepreciznost merenja na svim koncentracionim nivoima ne sme preći 15 % RSD osim za LLOQ, gde ne sme biti veća od 20 % RSD. Obično se isti podaci merenja koriste za određivanje i preciznost i tačnosti metode.

Prema ICH preporukama preciznost se određuje na tri različita načina određivanjem 1) ponovljivosti (eng. *repeatability*), 2) srednje preciznosti (eng. *intermediate precision*) i 3) reproducibilnost (eng. *reproducibility*).

*Ponovljivost* analitičke metode je sposobnost dobijanja istih rezultata pod istim uslovima merenja u kratkom vremenskom intervalu (intradnevna preciznost). Ponovljivost utvrđuje preciznosti merenja istog analitičara, na istoj aparaturi i istim uzorcima sa najmanje devet merenja. Procena ponovljivosti sprovodi se u određenom opsegu merenja tj. na tri koncentracije sa po tri merenja ili merenjem iste koncentracije ciljanog analita najmanje šest puta. Metoda je precizna ako je  $RSD \leq 2$  %.

*Srednja preciznost* se odnosi na usaglašenost rezultata merenja unutar iste laboratorije, na čiji rad utiče više faktora kao što su različiti dani merenja, analitičari ili oprema. Srednja preciznost je procena preciznosti merenja usled varijacija slučajnim događajima do kojih može doći u rutinskoj primeni metode. Za utvrđivanje srednje preciznosti razvija se eksperimentalni model koji prati uticaje (ako ih ima) svake varijable pojedinačno. Procenjuje se unutar iste laboratorije na istoj aparaturi,

od strane više analitičara u toku više dana (inter-dnevna preciznost). Najčešći zahtev za srednju preciznost je  $RSD \leq 2\%$ .

*Reproducibilnost ili interlaboratorijska preciznost* je preciznost procenjena u različitim laboratorijama od strane više analitičara, na različitim aparatima, u više dana na seriji uzoraka. Dokumentacija kolaborativnih studija različitih laboratorija treba da sadrži standardne devijacije, relativne standardne devijacije i interval pouzdanosti merenja. Analitička metoda se smatra reproduktivnom ukoliko je  $RSD \leq 2\%$ . Prema preporukama ICH reproduktivnost nije neophodna ukoliko je predhodno utvrđena srednja preciznost metode [104].

Prema USP smernicama (ICH vodič ne koristi ovaj termin), reproducibilnost se definiše i kao rigidnost (eng. *ruggedness*), odnosno kao stepen reproduktivnost merenja istih uzoraka pod različitim uslovima; različite laboratorije, analitičari, instrumenti, serije reagenasa, temperature, dani i vreme merenja [105].

U eksperimentalnom delu ovog rada ispitana je tačnost i preciznost merenja kalibracionih uzoraka (kalibratori,  $CC_s$ ,  $s=1-9$ ) preko devet koncentracionih nivoa 0.5-2-5-10-20-50-100-150-200 ng/mL i test uzoraka (kontrola,  $QC_s$ ,  $s=1-4$ ) preko četiri koncentraciona nivoa  $QC_1$ - niskom,  $QC_2/QC_3$ - srednjem i  $QC_4$ - visokom redom 0.5-20-100-200 ng/mL. Tačnost kao slaganje između šest izmerenih vrednosti i stvarne vrednosti koncentracije predstavljena je procentualno (%) dok je preciznost kao slaganje u okviru jedne ( $n = 6$ ) i tri serije merenja ( $n = 3 \times 6$ ) izražena preko osnovnih statističkih parametara centralne tendencije, standardne devijacije  $X_{SR} \pm SD$  i relativne standardne devijacije,  $RSD\%$ . Kriterijumi prihvatanja odstupanja tačnosti merenja za sve koncentracione nivoe bili su  $\pm 15\%$  srednje od stvarne vrednosti ( $85 \leq \text{tačnost } \% \leq 115$ ) osim za  $LLOQ \pm 20\%$  ( $80 \leq \text{tačnost } \% \leq 120$ ), a preciznosti  $RSD \leq 15\%$  osim za  $LLOQ \leq 20\%$ .

Tačnost i preciznost merenja kalibratora  $CC_s$  na devet koncentracionih nivoa prikazane su u tabelama 4.3.1.1. za seriju 1, 4.3.1.2. za seriju 2 i 4.3.1.3. za seriju 3, a kontrola  $QC_s$  na četiri koncentraciona nivoa u tabelama 4.3.5.1. za seriju 1, 4.3.5.2. za seriju 2 i 4.3.5.3. za seriju 3. Validacioni izveštaji merenja intra- i interdnevne preciznosti i tačnosti prikazani su u tabelama 4.3.5.4. za kalibracione uzorke  $CC_s$  i 4.3.5.5. za kontrolne  $QC_s$  na ispitivanim koncentracionim nivoima.

Statističkom obradom podataka serije kalibratora CCs u toku jednog i tri različita dana na devet koncentracionih nivoa dobijena je srednja intradnevna preciznost od 3.82 % RSD (opseg 0.31 – 14.91 %) i odgovarajuća interdnevna preciznost od 6.01 % RSD (opseg 0.82 – 16.92 %). Srednja intradnevna tačnost od 100.4 % (opseg 99.8 – 102.9 %) i odgovarajuća interdnevna tačnost od 102.9 % (opseg 97.5-109.8 %). Statističkom obradom podataka serije kontrola QCs na četiri koncentraciona nivoa u toku jednog i tri različita dana određene su srednja intradnevna preciznost od 3.38 % RSD (opseg 0.69 - 5.74 %), a odgovarajuća interdnevna preciznost od 5.43 % RSD (opseg 3.18 - 7.77 %) i srednja intradnevna tačnost od 107.6 % (opseg 100.3-118.6 %), a odgovarajuća interdnevna tačnost od 106.7 % (opseg 99.9-110.1 %).

Kako su dobijeni rezultati merenja kontrolnih i kalibracionih uzoraka u intradnevnim i interdnevnim sekvencama na svim koncentracionim nivoima u saglasnosti sa ICH validacionim kriterijumima, može se zaključiti da je usvojena UHPLC-MS/MS metoda visoko precizna i tačna sa ponovljivim i reproducibilnim merenjima u opsegu koncentracija ambroksola od 0.5-200 ng/mL. Postignuti opseg linearnosti je u skladu sa literaturnim podacima.

#### 5.4.5. Specifičnost / selektivnost

Specifičnost i selektivnost (eng. *slectivity* / *specificity*) su termini koji se često poistovećuju i definišu kao sposobnost nedvosmislenog određivanja analita u prisustvu drugih potencijalno prisutnih interferirajućih supstanci. Razlika u terminima je što selektivnost podrazumeva sličnost u strukturi analita sa interferirajućim supstancama, a specifičnost ne. Za jednu analitičku metodu kažemo da je selektivna, ukoliko pokazuje dobro hromatografsko razdvajanje supstanci sličnih struktura, a specifična je ako odgovor detektora potiče samo od analita i ne postoji preklapanje sa nekim drugim interreferirajućim supstancam. Interferirajuće supstance mogu biti endogenog porekla (matriks uzorka - proteini, lipidi, saharidi) i/ili egzogenog (boje, punioci, rastvarači, nečistoće, degradacioni produkti). Specifičnost/selektivnost metode se u tačnoj hromatografiji postiže izborom kolone i podešavanjem hromatografskih uslova kao što su sastav mobilne faze, temperatura kolone, izbor talasne dužine ili

jonske mase zavisno od primenjenog detektora i sl. Osim hromatografskog razdvajanja na specifičnost /selektivnost metode može se uticati i načinom pripreme uzorka. Prema ICH i FDA smernicama specifičnost/selektivnost se ispituje testiranjem opterećenih uzoraka odgovarajućeg biološkog matriksa (serum, plazma, urin, tkivo) na LLOQ iz najmanje šest različitih izvora. Svakom uzorku dodaje se poznata koncentracija analita na LLOQ, izvrši ekstrakcija i utvrdi odsustvo interferenci primenom odgovarajuće analitičke metode. Odgovor detektora na LLOQ u statistički dozvoljenim granicama ( $RSD < 20\%$ ) dokaz je odsustva interferenci. Specifičnost metode određuje se i analiziranjem uzoraka bez dodavanja analita (eng. *blank sample*) iz 6 različitih izvora gde odsustvo odgovora detektora predstavlja i odsustvo interferenci. Identifikacija specifičnosti/selektivnosti se ogleda u (1) odvajanju pikova analita od pikova drugih komponenti i/ili (2) poređenjem pikova analita sa pikovima standardnih referentnih supstanci. Dokumentuje se analitičkim hromatogramima, rezolucijom, brojem teorijskih podova (efikasnost) i/ili faktorom razvlačenja pikova. U praktičnom smislu nekada je dovoljno testirati specifičnost/selektivnost samo vizuelnom komparacijom retencionih vremena, površine pikova i oblika pikova analita i referentnih standarda.

Nedostatak specifičnosti/selektivnosti jedne analitičke metode može se nadoknaditi dodatnim analitičkim ispitivanjima kao što su *test identifikacije analita* (osigurava tačan identitet analita), *test čistoće uzorka* (izveštaj tačnog sadržaja nečistoća analita; metali, rastvarači) i *test sadržaja uzorka* (obezbeđuju rezultate koji pokazuju tačan sadržaj svakog analita u uzorku).

Specifičnost metode u ovom radu je ispitana merenjem *blank* (bez analita i IS) i *nultih* (samo IS) uzorka seruma iz tri različita izvora. Snimljeni MRM jonski hromatogrami prikazani na slici 4.1.3.2. (a) i (b) pokazuju da na retencionim vremenima ambroksola i internog standarda ne postoje neželjene interferirajuće endogene i egzogene jonske mase koje bi uticale na tačnost merenja analita.

Pri validaciji bioanalitičkih maseno - spektrometrijskih metoda ispituje se i uticaj matriks efekta (eng. *matrix effect*) na jonizaciju analita. U ovim testiranjima koriste se *blank* uzorci odgovarajućih matriksa iz najmanje 6 različitih izvora koji ne sadrže analiziranu supstancu. Prema EMA za svaki analit i interni standard posebno se određuje matriks faktor (MF) kao odnos površina pikova uzorka sa matriksom

(*blank* uzorak opterećen analitom pre ekstrakcije) i bez prisustva matriksa (čist rastvor analita ili *blank* uzorak opterećen analitom nakon ekstrakcije). Normalizovan MF se određuje deljenjem MF analita sa MF internog standarda. Koeficijent varijacije (CV) normalizovanih MF iz 6 različitih izvora ne treba da bude veći od 15 %. Ispitivanje matriks efekta se vrši na dva koncentraciona nivoa, niskom i visokom. Ukoliko ovaj pristup ne može da se primeni npr. u slučaju *on line* ekstrakcije varijabilnost odgovora detektora treba oceniti analizom najmanje 6 uzoraka opterećenih na 3 x LLOQ i blizu LLOQ. Validacioni izveštaji treba da sadrže površine pikova analita i IS i izračunate koncentracije za svaki pojedinačni uzorak i MF vrednosti. Ukupni koeficijent varijacije izračunat po koncentraciji, ne sme biti veći od 15%. Prema EMA/275542/2014 smericama ukoliko je teško obezbediti određeni biološki matriks za procenu se može koristiti i manje od 6 različitih izvora. Ukoliko formulacije koje se ispituju na ljudima ili životinjama sadrže ekscipijente kao što su polietilen glikol ili polisorbit oni se ispituju posebno. Osim normalnog matriksa preporučuje se i ispitivanje matriksa drugih vrsta uzoraka npr. hemolizirana i hiperlipemična plazma kao i uzoraka posebnih populacija npr. sa oštećenjem bubrega ili jetre ukoliko se takvi uzorci analiziraju [103].

U ovom radu, za potpunu validaciju bioanalitičke UHPLC-MS/MS metode ispitan je uticaj matriks efekta seruma na jonizaciju ambroksola i IS. Procena je izvršena izračunavanjem matriks faktora (MF) prema proceduri *Matuszewski i sar.* [143]. Matriks faktor predstavlja odnos površina pikova analita u prisustvu (B) i odsustvu (A) matriksa,  $MF=B/A$ . U idealnom slučaju  $MF=1$  kada ne postoji uticaj matriksa na jonizaciju analita. Izmerene srednje vrednosti  $MF \pm SD$  iznosile su za ambroksol  $0.98 \pm 0.02$  i  $0.97 \pm 0.03$  za IS. Statistička evaluacija matriks efekta seruma na MS/MS jonizaciju ambroksola (2 ng/mL) i IS (20 ng/mL) nakon tri uzastopna injektovanja prikazana je u tabeli 4.3.6.1. Dobijene MF vrednosti ( $B/A > 0.9$ ,  $RSD < 15\%$ ) pokazuju da ne postoji značajna supresija jonizacije ambroksola i IS pod uticajem konstituenata seruma, i može se zaključiti da na kvantifikaciju ambroksola primenom postavljene UHPLC-MS/MS metode, matriks efekat nema značajan uticaj.

Ispitivanje interferenci u MS/MS analizi uključuje i testiranje metode na *cross-talk* efekat. *Cross-talk* efekat je pojava jonskih masa analita na unakrsnim

MS/MS kanalima merenja. U ovom radu ispitivanje *cross-talk* efekta izvršeno je odvojenim injektovanjem ambroksola i IS u visokim koncentracijama (200 ng/ml) i posmatranjem odgovarajućih jonskih masa ( $m/z$  378.9→263.8 za ambroksol i 455.2→165 za IS) na suprotnim MS/MS kanalima. Kako nije uočeno prisustvo ne pripadajućih jonskih masa u posmatranim MS/MS kanalima zaključeno je da ne postoji prisustvo *cross-talk* efekta pri postavljenim uslovima metode.

#### 5.4.6. Testovi stabilnosti bioloških uzoraka

Testovima stabilnosti dokazuje se da ne dolazi do raspadanja analita u tipičnim laboratorijskim uslovima. Ukoliko dođe do raspadanja analita uzroci se prepoznaju i kontrolišu odgovarajućim čuvanjem i skladištenjem uzoraka. Mnogi faktori utiču na stabilnost bioloških uzoraka od fizičko - hemijskih osobina analita i matriksa do uslova čuvanja. Pri proceni stabilnosti uzoraka studije se dizajniraju tako da obuhvate sve moguće faktore uticaja. U obzir se uzimaju uslovi prikupljanja i rukovanja uzorcima kako pri dugoročnim (temperatura čuvanja) tako i kratkoročnim (sobna temperatura) skladištenjima i ciklusima zamrzavanje-odmrzavanje. Uslovi koji se koriste pri testiranju stabilnosti moraju podražavati realne uslove kojima uzorci (uključujući standardne i radne rastvore) mogu biti izloženi tokom procesa prikupljanja, skladištenja i rutinske analize. Testovima stabilnosti se procenjuje vreme od uzorkovanja do analize za koje ne dolazi do raspadanja analita[126].

U ovom radu ispitana je stabilnost osnovnog i radnih rastvora ambroksola u serumu (QC) pod različitim temperaturnim uslovima i u različitim vremenskim intervalima. Osnovni (štok) rastvor je za validaciona ispitivanja pripremljen u čistom serumu (matriksu koji simulira biološke uslove) u koncentraciji od 1 mg/mL. Stabilnost osnovnog rastvora (razbl. od 10 ng/mL) je ispitana nakon šest sati stajanja na sobnoj temperaturi u odnosu na kontrolni sveže pripremljeni rastvor. Izmerene koncentracije testiranih i kontrolnih rastvora kao i evaluacija stabilnosti osnovnog rastvora ambroksola u serumu (10 ng/mL, 6h/sobna temperatura, n=3) prikazani su u tabeli 4.3.7.3. Upoređivanjem koncentracija testiranih i kontrolnih rastvora utvrđena je srednja razlika u merenju od 4.59 %. Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da ne postoje značajne rezlike u koncentracijama testiranih i kontrolnih rastvora pa se

može sa sigurnošću tvrditi da se osnovni rastvor ambroksola u serumu stajanjem na sobnoj temperaturi do 6 h ne menja, odnosno zadržava svoju stabilnost.

Radni rastvori ambroksola (QC testovi) su pripremani od svežeg osnovnog rastvora razblaživanjem u serumu do odgovarajuće koncentracije, a zatim podvrgnuti testiranju stabilnosti. Eksperimentalno testiranje stabilnosti kao i post eksperimentalna statistička obrada podataka QC testova izvršeni su u skladu sa propisima ICH pravilnika. Prema ICH za ispitivanje stabilnosti bioloških uzoraka preporučuje se testiranje kratkoročne i dugoročne temperaturne stabilnosti i stabilnost nakon ciklusa zamrzavanje-odmrzavanje. Za ispitivanje stabilnosti ambroksola u ciklusima zamrzavanje-odmrzavanje u ovom radu su testirani uzorci tri puta izloženi ovom postupku na dva koncentraciona nivoa (niskom 20 ng/mL i visokom 200 ng/mL). Uzorci su čuvani 24 sata na temperaturi skladištenja (-20°C), a zatim odmrzavani na sobnoj temperaturi bez grejanja. Nakon potpunog odmrzavanja uzorci su ponovo zamrzavani na 24 h i ponovo odmrzavani. Ovaj postupak je ponovljen i treći put, a analiza uzoraka je vršena nakon svakog ciklusa zamrzavanja-odmrzavanja. Za studije kratkoročne temperaturne stabilnosti, uzorci na niskom i visokom koncentracionom nivou su pre analize čuvani 1 h na sobnoj temperaturi, odnosno vremenski onoliko dugo koliko je predviđeno da će uzorci stajati na sobnoj temperatura pre merenja. Za evaluaciju dugoročne stabilnosti, vreme čuvanja uzoraka koje bi obuhvatilo period od prvog prikupljanja uzoraka do analize poslednjeg uzorka procenjeno je na 10 dana, na -20 °C. Tokom analize serije uzoraka predviđeno je i stajanje pripremljenih uzoraka u autosempleru neko vreme do analize pa je ispitana i stabilnost ekstrakata analita u odnosu na predviđeno vreme stajanja u autosempleru od 24 h. Kontrolni uzorci su pripremani od sveže napravljenih standarda, a rezultati dobijeni poređenjem srednjih vrednosti test uzoraka sa srednjim vrednostima kontrolnih uzoraka (za dugoročne studije u odnosu na merenja od prvog dana). Sva ispitivanja izvršena su na dva koncentraciona nivoa 20 ng/mL i 200 ng/mL sa po šest ponavljanja (n=6). Površine pikova ambroksola i internog standarda, izmerene koncentracije, preciznost i tačnost merenja testiranih uzoraka QC pri testu (a) kratkotrajne stabilnosti, (b) dugotrajne stabilnosti, (c) na autosempleru i (d1/d2) 3 ciklusa zamrzavanje-odmrzavanje prikazani su u tabeli 4.3.7.1. a evaluacija stabilnost testiranih uzoraka QCs ambroksola pod različitim uslovima prikazana je u tabeli 4.3.7.2. Rezultati



merenja predstavljeni su kao tačnost  $\pm$  SD merenja testiranih u odnosu na kontrolne vrednosti i iznosile su 111-105 % za kratkoročne studije stabilnosti, 113-112 % za dugoročne, 97-96 % na autosempleru i 100-94 % za studije odmrzavanje-zamrzavanje.

Dobijeni rezultati su pokazali visoku tačnost merenja testiranih u odnosu na kontrolne uzorke pa se može zaključiti da nije došlo do degradacije ambroksola u serumu pri ispitivanim uslovima, odnosno ambroksol se može smatrati konstantno stabilnim u serumu do 24 h na sobnoj temperaturi, na  $-20^{\circ}\text{C}$  najmanje 10 dana i nakon tri uzastopna ciklusa zamrzavanja-odmrzavanja.

#### 5.4.7. Ekstrakcioni prinos

Testovi ekstrakcionog prinosa (eng. *recovery*) se odnose na ispitivanje efikasnosti metoda za pripremu uzoraka upoređivanjem odgovora detektora ekstrahovanih uzoraka sa referentnim standardima. Ekstrakcioni prinosi mogu biti manji od 100% ali kvantitativni, odnosno precizni i ponovljivi. Ispitivanje ekstrakcionih prinosa vrši se na niskim, srednjim i visokim koncentracijama upoređivanjem ekstrahovanih uzoraka prema ne-ekstrahovanim uzorcima prilagođenih razblaživanjem. U praktičnom testiranju se ne koriste neekstrahovani biološki uzorci, npr. injektovanje neekstrahovane plazme može trajno kontaminirati većinu LC kolona, već vodeni i organski rastvori ekstrakata i referentnih standarda. Ekstrakcioni prinosi analita izražavaju se u procentima (%) kao maseni udeo ekstrakta prema standardu.

U ovom radu testiranje ekstrakcionog prinosa vršeno je na tri koncentraciona nivoa ambroksola 20-100-200 ng/mL sa po šest ponavljanja ( $n=6$ ). Rezultati su dobijeni upoređivanjem odgovora detektora ekstrahovanih uzoraka seruma nakon SP ekstrakcije (serumi opterećeni određenom količinom ambroksola) sa odgovorima iste količine referentnih standarda (bez postupka SP ekstrakcije). Srednja vrednost SPE prinosa ambroksola iz opterećenih seruma na tri koncentraciona nivoa iznosila je  $85.96 \pm 9.04\%$ . Ekstrakcioni prinosi opterećenih seruma na pojedinim koncentracionim nivoima ambroksola od 20 -100 - 200 ng/mL sa odgovarajućim RSD vrednosti prikazani su u tabeli 4.3.8.1. U literaturi je za određivanje ambroksola MS/MS metodom, priprema uzoraka vršena uglavnom PP sa visokim prinosima od

>95 %, što je nešto veće od postignutih vrednosti u ovom radu. Međutim, ekstrakcije su vršene sa većom zapreminom uzorka (500  $\mu$ L), a razdvajanja na kolonama sa krupnijim česticama (2.1 - 5  $\mu$ m), gde su male mogućnosti za kontaminacijom usled analize uzoraka niske čistoće [101]. Kako se u ovo radu primenjivala kolona sa izuzetno malim česticama, da ne bi došlo do zapušnja, razvijena je SPE priprema kako bi se obezbedili uzorci visoke čistoće i zadovoljavajućeg prinosa.

#### 5.4.8. Carry-over efekat

*Carry-over* efekat je mogućnost pojave analita iz prethodnog merenja u novom merenju (*run-u*) što može uticati na tačnost dobijenih rezultata. Uticaj *carry-over* efekata u ovom radu ispitan je merenjem visoke koncentracije standarda ambroksola od 300 ng/ml tri puta za redom (n=3). Nakon merenja visoke koncentracije injektovan je uzorak blank seruma QC<sub>0</sub> (n=3), pri čemu nije došlo do značajnog povećanja visine bazne linije na retencionom vremenu ambroksola. Na slici 4.3.9.1 prikazan je hromatogram standarda ambroksola od 300 ng/mL, a na slici 4.3.9.2 hromatogram uzorka blank seruma QC<sub>0</sub> nakon injektovanja standarda ambroksola od 300 ng/mL. Na osnovu izgleda bazne linije zaključeno je da na uspostavljenim analitičkim uslovima nema pojave *carry-over* efekata nakon injektovanja koncentracije ambroksola 1.5 veće od koncentracije na gornjem kvantifikacionom nivou metode (HLOQ).

#### 5.4.9. Robustnost metode

Robusnost ili izdržljivost (eng. *robustnes*) analitičke metode predstavlja sposobnost metode da zadrži tačnost i preciznost merenja pri malim varijacijama eksperimentalnih uslova. Robusnosti pokazuje da je metoda stabilna i pouzdana tokom rutinske primene, odnosno da male nenamerne promene hromatografskih uslova tokom rada ne utiču na rezultate merenja. Najčešći parametri koji se ispituju u testiranju robustnosti metode prikazani su u Tabeli 5.4.9.1.

**Tabela 5.4.9.1.** Tipične varijacije u testiranju robustnosti metode (izokratski mod)

Parametar	Opseg
Udeo organskog rastvarača	± 2 - 5 %
Koncentracija pufera	± 1 - 2 %
pH pufera	± 0.1 - 0.2 pH
Temperatura	± 3°C
Brzina protoka	± 0.1 - 0.2 mL/min
Talasna dužina	± 2 - 3 nm

Ključne reči u definiciji robustnosti su mogućnost nenamerne promene. U studijama robusnosti neophodno je izabrati širok opseg procene faktora uticaja tako da obuhvati sve moguće nenamerne varijabilnosti do kojih može doći u toku laboratorijskog rada. U postupku validacije naročito se obraća pažnja na hromatografske parametre koji su najosetljiviji na male promene, pa se testovima robusnosti njihov uticaj pažljivo ispituje. U merenju i dokumentovanju robustnosti prate se sledeće karakterisistike: određeni pik prema rezoluciji  $R_s$ , broj teorijskih podova kolone  $N$  (ili širina pika u gradijent modu), retenciono vreme  $t_R$ , faktor simetrije (faktor razvlačenja) pika  $A_s$ , površina/visina pika  $i$ /ili koncentracija. Testiranje robustnosti podrazumeva višestruko injektovanje uzoraka i statističku obradu podataka (npr. %RSD) koja bi pokazala i dokazala tendenciju uticaja malih promena eksperimentalnih uslova na rezultate merenja [103, 104].

U ovom radu izdržljivost postavljene UHPLC-MS/MS metode ispitana je malim promenama kod tri hromatografska parametara. Procenjeno je da bi u rutinskoj primeni metode moglo doći do neznatnih promena temperature kolone ( $40 \pm 5^\circ\text{C}$ ), protoka MF ( $0.30 \pm 0.05$  ml/min) i udela organskog dela MF ( $90 \pm 5\%$  metanol). Testiranje robustnosti izvršeno je merenjem standarda ambroksola na izmenjenim i validiranim uslovima, na dva koncentraciona nivoa 20-200 ng/mL sa po tri ponavljanja ( $n=3$ ). Tačnost i preciznost merenja na izmenjenim uslovima utvrđena je poređenjem rezultata sa vrednostima izmerenim na validiranim uslovima. U tabeli 4.3.10.1. prikazane su površine pikova, izmerene koncentracije, preciznost i tačnost merenja standarda ambroksola na 20 i 200 ng/mL pri promeni (a) temperature kolone  $\pm 5^\circ\text{C}$ , (b) udela organskog dela mobilne faze  $\pm 5\%$  metanola, (c) protoka mobilne faze

$\pm 0.05$  ml/min i (d) na uspostavljenim uslovima metode (40 °C, 0.30 ml/min, 90 % metanola), a evaluacija robustnosti UHPLC-MS/MS metode pri koncentracijama standarda ambroksola 20 ng/mL i 200 ng/mL (n=3) u tabeli 4.3.10.1. Dobijeni rezultati pokazuju da se promenom temperature kolone od 35 - 45°C tačnost i preciznost merenja na dva koncentraciona nivoa kreće od 96.46 - 101.45 % RSD sa standardnim devijacijama od 0.41 - 1.75, promenom protoka MF od 0.25 – 0.35 mL/min od 89.40 - 111.58 % RSD sa standardnim devijacijama od 0.71 - 1.96 i promenom udela metanola od 85 - 95 % u MF od 94.89 - 111.25 % RSD sa standardnim devijacijama od 0.12 - 1.07.

Na osnovu dobijenih rezultata pokazano je da malim promenama temperature, protoka i sastava MF primenjena UHPLC-MS/MS metoda zadržava visoku tačnost i preciznost merenja koncentracija ambroksola na 20 ng/ml i 200 ng/ml u odnosu na vrednosti pri validiranim uslovima. Robustnost metode potvrđena je i intralaboratorijskom kontrolom, merenjem od strane drugog analitičara gde dobijeni rezultati nisu pokazali statistički značajnu razliku tačnosti i preciznosti merenja u odnosu na validaciona merenja. Testiranjem robustnosti metode potvrđeno je da je postavljena UHPLC-MS/MS metoda stabilna i izdržljiva, pa se može pouzdano koristiti u daljem praktičnom radu.

#### **5.4.10. Test podobnosti sistema**

Testiranje podobnosti sistema (eng. *system suitability test*) je sastavni deo mnogih analitičkih postupaka i podrazumeva testiranje opreme, elektronike, analitički rad i uzorke za analizu. Parametri testa podobnosti sistema se uspostavljaju prema određenoj metodi i zavise od vrste postupka koji se vrednuje (prema odgovarajućim farmakopejama). U ovom radu test podobnosti sistema nije posebno rađen s obzirom da je aparat validiran i atestiran za upotrebu od strane proizvođača.

Prema dobijenim rezultatima kompletne validacione procedure koji su bili u skladu sa svim kriterijumima Internacionalnog komiteta za validaciju bioanalitičkih metoda ICH, zaključuje se da je postavljena UHPLC-MS/MS validna i da se može pouzdano primeniti za tačnu i preciznu kvantifikaciju ambroksola. Eksperimentalnim

putem izvršena je evaluacija optimalnih parametara za pripremu uzoraka, hromatografsko razdvajanje i MS/MS detekciju.

## 5.5. FARMAKOKINETIČKA STUDIJA NA KUNIĆIMA

Ambroksol hidrohlorid je mukolitik koji se uspešno primenjuje u terapiji respiratornih puteva više od trideset godina pa je njegova farmakokinetika kod ljudi dobro proučena. Ambroksol se iz gastrointestinalnog trakta resorbuje brzo i potpuno nakon *per os* primene čvrstih formulacija sa trenutnim oslobađanjem. Najveća koncentracija u plazmi dostiže se nakon 1 do 2.5 sata gde se za proteine plazme vezuje u visokom procentu od 90%. Putem krvi se brzo raspoređuje do svih tkiva u organizmu sa najvećim afinitetom prema plućima [63]. Trećina oralno unete doze eliminiše se metabolizmom prvog prolaza. Većim delom razgrađuje se u jetri u prisustvu mikrozomalnog enzima CYP3A4 do dibromantranilne kiseline u prvoj fazi biotransformacije, dok se u drugoj fazi konjuguje sa glukuronskom kiselinom. Metaboliti nastali u jetri se 90% izlučuju urinom, a nepromenjeni ambroksol se urinom izlučuje manje od 10%. Neizmenjeni ambroksol se eliminiše sa poluvremenom eliminacije od 10 časova, a metaboliti i do 22 časova [65].

U literaturi je zabeleženo nekoliko kontrolisanih humanih farmakokinetičkih studija ambroksola primenom tečno-masene spektrometrije. Testiranja su vršena na dobrovoljcima u grupama od 12-24 kojima je ambroksol aplikovan jednokratno (30 i 90 mg) ili višekratno (7 dana, 60 mg/dan) oralnim putem [64,74,75]. Farmakokinetički parametri su određivani i u studijama bioekvivalence različitih formulacija ambroksola samostalno, kao i kombinovanjem ambroksola sa drugim lekovima (roksitromicin, amoksicilin) [99,101,102]. U svim farmakokinetičkim studijama nakon odvajanja plazme praćene su koncentracije ambroksola sa vremenom pri definisanim uslovima, konstruisane srednje krive zavisnosti koncentracija-vreme i izračunati osnovni farmakokinetički parametri. Maksimalne koncentracije ( $C_{max}$ ) u plazmi su dostizale vrednost od 50 - 100 ng/mL za vreme od 1.5-2 h nakon davanja 30 mg jednokratne oralne doze ambroksola sa klirensom od 40-64 l/h i volumenom distribucije od 292 - 676 L.

Farmakokinetičke studije ambroksola na životinjama su u manjem broju zastupljene u literaturi u odnosu na humane studije. Naročito je primećen nedostatak relevantnih podataka kod životinja, odnosno nedostatak farmakokinetičkih podataka određenih validiranim analitičkim metodama. Još 1978. god. su Hammer i sar. ispitivali farmakokinetiku ambroksola kod ljudi i životinja primenom tankoslojne hromatografije i  $^{14}\text{C}$  markiranog ambroksola. Eksperimentalnim životinjama (pacovi, pas i kunić) dozirano je 10 mg/kg obeleženog ambroksola, a volonterima oko 0.25 mg/kg. Na osnovu srednjih farmakokinetičkih krivih zabeleženo je  $C_{\max}$  oko 7  $\mu\text{g/mL}$  za 20 h kod pacova, 5  $\mu\text{g/mL}$  za 1 h kod kunića, 14  $\mu\text{g/mL}$  za 2 h kod pasa i oko 150 ng/mL za 1.5 h kod čoveka sa vremenima polueliminacije  $T_{1/2}$  25 h kod pacova, 20 h kod psa i čoveka, a samo 2 h kod kunića. [145]. U novijoj literaturi mogu se naći relevantni farmakokinetički podaci ambroksola ali ne na svim životinjskim vrstama. Na modelu pacova rađene su dve studije (Rupali sa sar. i Ren sa sar.) primenom validirane HPLC metode. U prvom radu tri grupe pacova tretirane su sa 2.7 mg/kg ambroksola i merena je njegova koncentracija u plazmi do 24 h. Grupe I, II i III pokazale su maksimalne koncentracije 25.47, 25.75 i 25.64 ng/ml u 2 satu i vreme polueliminacije ambroksola od 10.3, 12.45 i 11.28 h. Konstanta eliminacije u sve tri grupe bila je  $0.06 \text{ h}^{-1}$  [146]. U drugoj studiji dvema grupama od šest pacova aplikovano je odvojeno po 20 mg/kg ambroksola inhalaciono i intravenski. Merenja su vršena narednih 12 h. Maksimalne koncentracije postignute u plazmi bile su 20  $\mu\text{g/mL}$  nakon 1.5 h kod inhalacione i 50  $\mu\text{g/mL}$  nakon 1.25 h kod *i.v.* primene ambroksola [147].

U cilju provere razvijene metode u biološkim uslovima, u ovom radu urađena je farmakokinetička studija ambroksola na kunićima. Ispitivanje je vršeno na muškim *Oryctolagus cuniculus* kunićima težine od 3 – 3.5 kg, kojima je peroralno data tableta ambroksola od 30 mg direktno u želudac. U određenim vremeskim intervalima (0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6 i 24 h) uzorkovana je krv iz ušne vene. Uzorci su centrifugirani, odvojeni serumi i nakon SPE ekstrakcije injektovani po tri puta u UHPLC-MS/MS sistem. Određivanje koncentracije ambroksola izvršeno je iz 0.25 ml seruma. Izmerene koncentracije ambroksola u serumu kunića 1, 2 i 3 u osam vremenskih tačaka prikazane su u tabeli 4.4.1. Na osnovu dobijenih rezultata konstruisane su krive zavisnosti koncentracija u serumu (ng/mL)- vreme (h) za kuniće 1, 2 i 3 nakon

primene jedne oralne doze ambroksola od 30 mg i prikazane redom na slici 4.4.1. (a), (b), (c) i uporedni prikaz (d), a srednja kriva zavisnosti koncentracija - vreme u na slici 4.4.2. Iz dobijenih koncentracionih profila preračunati su i određeni osnovni farmakokinetički parametri primenom računarskog programa Thermo Scientific™ Kinetica 5. Dobijene su vrednosti: maksimalna koncentracija ( $C_{max}$ )  $185.52 \pm 3.25$  ng/mL za maksimalno vreme ( $T_{max}$ )  $1.61 \pm 0.35$  h, površina ispod krive ( $AUC_{0-24}$ )  $536.39 \pm 67.16$  h ng/mL, ( $AUC_{0-inf.}$ )  $538.74 \pm 66.85$  h ng/mL, poluvreme eliminacije ( $T_{1/2}$ )  $3.53 \pm 0.18$  h, volumen distribucije ( $V_d$ )  $0.29 \pm 0.05$  mg/(ng/mL), konstanta brzine eliminacije ( $K_{el}$ )  $0.19 \pm 0.01$  1/h i klirens (Cl)  $0.06 \pm 0.01$  mg h/(ng/mL). Srednje vrednosti farmakokinetičkih parametara kod kunića nakon administracije jednokratne oralne doze ambroksola od 30 mg (n=3) prikazane su u tabeli 4.4.2.

Iz dobijenih rezultata može se zaključiti da je validirana UHPLC-MS/MS metoda uspešno primenjena za određivanje farmakokinetičkih parametara ambroksola na eksperimentalnom modelu kunića nakon primene 30 mg jedne oralne doze leka. Smatra se da dobijeni originalni farmakokinetički rezultati mogu naći značajnu primenu u ispitivanjima bioekvivalence/biorasploživosti novih formulacija ambroksola i njegove primeni u kombinaciji sa drugim lekovima.

## 5.6. TEST BRZINE RASTVARANJA AMBROKSOLA IZ TABLETA

Testovi brzine rastvaranja lekovite supstance ili disolucioni testovi se koriste za ispitivanje brzine oslobađanja lekovite supstance iz farmaceutskih preparata prema postupcima propisanim odgovarajućim farmakopejama. Primarno se izvode u procesima kontrole kvaliteta i stabilnosti farmaceutskih preparata, ali poslednjih godina disolucioni testovi dobijaju sve veći značaj u određivanju *in vitro-in vivo* korelacije ispitivanih lekovitih supstanci. Ovim testiranjima se kvantitativno povezuju *in vitro* rezultati brzine rastvaranja sa farmakokinetičkim parametrima leka kako bi se manjio broj *in vivo* ispitivanja. Na osnovu dobijenih *in vitro* rezultata postavljaju se matematički modeli koji opisuju kinetiku i mehanizam rastvaranja lekovite supstance, kvantitativno povezuju sa farmakokinetičkim parametrima i predviđaje ponašanje leka u organizmu.

Brzina oslobađanja aktivne supstance iz farmaceutskog oblika značajan je pokazatelj bioraspoloživosti leka u organizmu kao i drugih farmakokinetičkih parametara. Brzina oslobađanja utiče na resorpciju leka i količinu koja dospeva u krv odnosno na mesto farmakološkog dejstva. Međutim, brzina oslobađanja aktivne supstance utiče na bioraspoloživost leka samo ukoliko se lek iz organizma eliminiše brzo ( $t_{1/2} < 12$  h), odnosno kod lekova sa kontrolisanim oslobađanjem lekovite supstance, dok kod lekova sa produženim delovanjem, gde je vreme polueliminacije  $t_{1/2} > 12$  h, ne utiče znatno na koncentraciju leka u krvi.

Mnogobrojni faktori utiču na brzinu oslobađanja lekovite supstance iz farmaceutskih preparata. Od onih koji su vezani za fizičko-hemijske osobine lekovite supstance, zatim formulacije leka (oblik, pakovanje, sastav ekscipijenasa i dr.) do bioloških karakteristika organizma. U literaturi su prezentovani disolucioni testovi ambroksola iz različiti čvrstih i tečnih farmaceutskih preparata kao i uticaj različitih faktora na kinetiku otpuštanja leka [76,77,148-150]. Dobijeni eksperimentalni rezultati su fitovani i uklapani u različite kinetičke modele (kinetika nultog reda, prvog reda, Higuchi model, Korsmeyer-Peppas model), pri čemu se na osnovu vrednosti koeficijenata korelacije ( $r$ ) utvrđivao optimalni model za opisivanje kinetike i mehanizma oslobađanja ambroksola iz ispitivane formulacije.

Za dobijanje tačnih i pouzdanih rezultata disolucionih testova, merenja je neophodno vršiti validiranim i osetljivim analitičkim metodama. U ovom radu prikazana je primena postavljene UHPLC-MS/MS metode u određivanju brzine rastvaranja ambroksola iz tleta u *in vitro* uslovima primenom tri disoluciona medijuma pri različitim pH vrednostima. Eksperimentalni uslovi postavljeni su prema propisima odgovarajućih farmakopeja (Ph. Eur. 7) i FDA smernicama sa malim modifikacijama usled tahničkih ograničenja [46, 47, 53]. Uslovi koji su omogućili oslobađanje i određivanje ambroksola iz tableta bili su 1000 mL rastvora na pH vrednostima 1.2, 4.5 i 6.8 (sink uslovi) i temperaturi  $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , magnetna mešalica sa brzinom obrtanja magneta od 50 rpm i filtriranje uzorka kroz  $0.22 \mu\text{m}$  najlon špric-filter. U određenim vremenskim intervalima (1-3-5-10-15-30-60-120-240-360 min) izvršeno je uzorkovanje disolucionih rastvora, razblaživanje (1000 x) i merenje koncentracije ambroksola u poznatoj zapremini tečnog medijuma po tri puta. Nakon preračunavanja, konstruisane su krive zavisnosti procenta oslobođenog leka sa



vremenom, % osl. lek = f (t). Zapremine disolucioničkih medijuma su nakon uzorkovanja nadoknađene sa 0.5 mL svežeg rastvora. Za oponašanje uslova u gastrointestinalnom traktu primenjena su tri različita medijuma pod sink uslovima: 0.1M HCl pH 1.2 za želudačnu sredinu, fosfatni pufer pH 6.8 za sredinu tankog creva i acetatni pufer 4.5 za sredinu duodenuma. Srednje koncentracije ambroksola i procenat oslobođenog ambroksola iz tableta sa vremenom na pH 1.2, pH 4.5 i pH 6.8 prikazane su u tabelama 4.5.1., 4.5.2. i 4.5.3, a krive profila brzine rastvaranja ambroksola sa vremenom na pH 1.2, 4.5 i 6.8 i temperaturi  $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$  na slikama 4.5.1., 4.5.2., 4.5.3. i 4.5.4.

Rezultati disolucioničkih testiranja pokazali su da je brzina rastvaranja ambroksola iz tableta najveća u kiseloj pH 1.2, zatim neutralnoj pH 6.8 i nešto slabija u blago kiseloj sredini na pH 4.5. Procenat rastvorenog ambroksola u odnosu na početnu količinu leka u tabletama nakon 30 min je 85% na pH 1.2, 81% na pH 4.5 i 84% na pH 6.8, što pokazuje da je najveća brzina rastvaranja ambroksola u medijumu koji simulira želudac, zatim nešto manja u medijumu tankog creva i najmanja u simuliranom medijumu duodenumu. Razvijen i potvrđen jednostavan disolucionički test se smatra zadovoljavajućim sa procentom oslobađanja ambroksola u ispitivanom farmaceutskom preparatu većim od 80% u 30-60 minutu od početka rastvaranja pri simuliranim biološkim uslovima. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se ispitivana aktivna supstanca iz preparata oslobađa u visokom procentu za vreme od 30-60 min pri postavljenim uslovima, te se preparat može okarakterisati kao lek sa brzim, trenutnim oslobađanjem lekovite supstance.

Kako je UHPLC-MS/MS metoda uspešno primenjena u ispitivanju brzine rastvaranja ambroksola iz tableta predlaže se njena dalja upotreba u studijama proizvodnje, kontrole kvaliteta i bioraspoloživosti/bioekvivalence drugih farmaceutskih formulacija ambroksola sa ciljem postizanja sigurne terapijske efikasnosti leka.

---

## 6. ZAKLJUČAK

Nakon završenog eksperimentalnog rada i dobijenih rezultata može se zaključiti sledeće:

1. Postavljena je i validirana nova metoda ultra-brze tečne hromatografije sa tandem masenim detektorom (UHPLC-MS/MS) za određivanje ambroksol hidrohlorida u serumu.
2. Hromatografsko razdvajanje ambroksola i verapamila (IS) izvršeno je na C<sub>18</sub> 1.3 μm submikrometerskoj analitičkoj koloni sa mobilnom fazom metanol – 0.01% mravlja kiselina u vodi (90:10 v/v), pri brzini protoka mobilne faze od 0.3 mL/min i injektovanoj zapremini uzorka od 2 μL.
3. MS/MS detekcija ostvarena je primenom elektrosprej pozitivne jonizacije (ESI+) masenog spektrometra na atmosferskom pritisku u multi reakcionom monitoring modu (MRM) sa tipičnim jonskim tranzicijama  $m/z$  378.9→263.8 za ambroksol i  $m/z$  455.2→165.0 za IS i kolizionim energijama od -20V i -25V.
4. Validacija analitičke UHPLC-MS/MS metode sprovedena je u skladu sa smernicama priručnika Internacionalne Komisije za harmonizaciju i validaciju bioanalitičkih metoda ICH (1996). Linearnost, preciznost, tačnost, LOD, LLOQ, ekstrakcioni prinos, *carryover* efekat, matriks efekat, robustnost, kao i testovi stabilnosti osnovnih rastvora i kontrolnih uzoraka seruma na različitim uslovima čuvanja su zadovoljili sve uslove za prihvatanja prema smernicama ICH. Metoda se pokazala prihvatljivom prema svim validacionim parametrima.
5. Dobijene vrednosti koeficijenta korelacije ( $r$ ), koeficijenta varijacije (RSD%) i standardne devijacije (SD) merenja, UHPLC-MS/MS metode, za opsegu koncentracija od 0.5 - 200 ng/mL sa limitom detekcije (LOD) od 0.25 ng/mL i

- donjim limitom kvantifikacije (LLOQ) od 0.5 ng/mL, pokazuje da je metoda linearna, precizna i tačna sa visokim stepenom osetljivosti.
6. Na osnovu dobijenih rezultata merenja intra- i interdnevne preciznosti i tačnosti, izmerene u jednom i tri različita dana koji su bili u prihvatljivim opsezima od  $\pm 15\%$ , zaključeno je da je metoda ponovljiva i reproducibilna.
  7. Testovi stabilnosti osnovnih i kontrolnih rastvora ambroksola pokazali su visoku stabilnost u periodu od najmanje dvadeset dana pri čuvanju na temperaturi od  $-4^{\circ}\text{C}$ .
  8. Analitičkim putem utvrđeno je da ne postoji endogeni i egzogeni interferirajući faktori, kao ni značajan uticaj matriks efekta na MS/MS detekciju ambroksola i IS u serumu. Zaključuje se da je UHPLC-MS/MS metoda visoko selektivna i specifična.
  9. Vreme trajanja analize uzorka seruma postavljenom UHPLC-MS/MS metodom je 1.5 min što je se čini izuzetno brzom i pogodnom za analizu velikog broja uzoraka u kratkom vremenskom intervalu.
  10. Razvijena je i originalna metoda za pripremu uzoraka seruma tečno-čvrstom ekstrakcijom (SPE) primenom katjon-jonoizmenjivačkih SPE kertridža. SPE tehnikom dobijeni su veoma čisti ekstrakti sa zadovoljavajućim analitičkim prinosima. SPE metoda se pokazala jednostavnom i brzom za rutinsku primenu uz minimalnu upotrebu organskih rastvarača i uzorka seruma (250  $\mu\text{L}$ ).
  11. Postavljena UHPLC-MS/MS metoda je uspešno primenjena u *in vivo* i *in vitro* ispitivanjima ambroksol hidrhlorida. U *in vivo* uslovima metoda je primenjena za određivanje farmakokinetičkih parametara u serumu kunića nakon primene jedne oralne doze ambroksol hidrohlorida od 30 mg. U *in vitro* uslovima ispitan je profil brzine rastvaranja ambroksola sa vremenom iz tableta pri različitim pH vrednostima 1.2, 4.5 i 6.8.

12. Validirana UHPLC-MS/MS metoda kao garant pouzdanih i tačnih rezultata smatra se da bi mogla naći značajnu primenu u farmaceutskoj industriji u ispitivanju novih formulacija leka ambroksola. Primena postavljene metode omogućila bi izbor optimalne farmaceutske formulacije ambroksola proverom farmakokinetike leka na kunićima pre sprovođenja studije bioekvivalencije na ljudima.

---

## 7. LITERATURA

1. Ambroxol Hydrochloride [Ph Eur monograph], 01/2011; 1489: 1365-1366.
2. Budavari S. The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. Merck Research Laboratories Division of Merck and Co., Inc. Whitehouse Station. Merck Index: 13th ed., 2001: 67–68.
3. Material Safety Data Sheet Ambroxol Hydrochloride MSD, <http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9922869>
4. Weiser T. Ambroxol: A CNS Drug?. *CNS Neuroscience & Therapeutics* 2008; 14: 17–24.
5. Balsamo R, Lanata L and Egan C. Mucoactive drugs. *Eur Respir Rev* 2010; 19: 127–133.
6. Aliperta A, Bellissimo U, Turco D and Antinolfi G. Normalization of bronchial exocrine pathology after endobronchial treatment with ambroxol. *Int J Tiss Reac* 1986; 8(2): 167-174.
7. Cataldi M, Sblendorio V, Leo A, Piazza O. Biofilm-dependent airway infections: A role for ambroxol? *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 2014; 28: 98-108.
8. Seifart C, Clostermann U, Seifart U, Müller B, Vogelmeier C, Wichert P, Fehrenbach H. Cell-specific modulation of surfactant proteins by ambroxol treatment. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2005; 203:27–35.
9. Van Wichert P, Bavendamm U, Von Teichmann M, Moller G, Thalheim E, Wilke A, and Wiegers U. Increased incorporation of fatty acids into phospholipids of lungs and livers of rabbits under the influence of bromhexine and ambroxol. *Arch. Pharmacol.* 1977; 297: 269-273.
10. Cerutti P and Kapanci Y. Effects of metabolite VIII of Bromexine (Na 872) on type II Epithelium of the Lung. *Respiration* 1979; 37:241-251.
11. Irvani J and Melville G. Mucociliary function of the respiratory tract as influenced by drugs. *Respiration* 1974; 31: 350-357.
12. Disse B, Ziegler H. Pharmacodynamic mechanism and therapeutic activity of ambroxol in animal experiments. *Respiration* 1987; 51: 15-22.
13. Agencija za lekove i medicinska sredstva Srbije, Uputstvo za lek Flavamed, 2011.

14. Rogers DF. Mucoactive agents for airway mucus hypersecretory diseases. *Respiratory Care* 2007; 52: 1176-1197.
15. Houtmeyers E, Gosselink R, Gayan-Ramirez G and Decramer M. Effects of drugs on mucus clearance. *Eur Respir J* 1999; 14: 452-467.
16. Chung K. Drugs to suppress cough. *Expert Opin. Investig. Drugs* 2005; 14: 19-27.
17. Seagrave JC, Albrecht HH, Hill DB, Rogers DF and Solomon G. Effects of guaifenesin, N-acetylcysteine, and ambroxol on MUC5AC and mucociliary transport in primary differentiated human tracheal-bronchial cells. *Respiratory Research* 2012; 13: 98.
18. V. Štětinová, Herout V, Květina J. In vitro and in vivo antioxidant activity of ambroxol. *Clin Exp Med* 2004; 4:152–158.
19. Nowak D, Antczak A, Krol M, Bialaciewicz P, and Pietras T. Antioxidant properties of ambroxol. *Free Radical Biology and Medicine* 1994; 16 (4): 517-522.
20. Strapkova A, Nosalova G, Franova S. Mucolytics and antioxidant activity. *Life Science* 1999; 65: 1923-125.
21. Castro SM, Guerrero-Plata A, Suarez-Real G, Adegboyega P, Colasurdo G, Khan A, Garofalo R, and Casola A. Antioxidant treatment ameliorates respiratory syncytial virus-induced disease and lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 1361–1369.
22. Hong JS, Ko HH, Han ES, Lee CS. Inhibition of bleomycin-induced cell death in rat alveolar macrophages and human lung epithelial cells by ambroxol. *Biochemical Pharmacology* 2003; 66:1297–1306. Suzuki M, Teramoto S, Matsuse T, Ohga E, Katayama H, Fukuchi Y and Ouchil Y. Inhibitory production effect of ambroxol on superoxide anion and generation by murine lung alveolar macrophages. *Journal of Asthma* 1998; 35: 267-272.
23. Cho Y, Jang Y, Han E, Lee C. The inhibitory effect of ambroxol on hypochlorous acid-induced tissue damage and respiratory burst of phagocytic cells. *European Journal of Pharmacology* 1999; 383:83-91.
24. Gillissen A and Novak D. Characterization of N-acetylcysteine and ambroxolin anti-oxidant therapy. *Respiratory Medicine* 1998; 92:609-623.

25. Suzuki M, Teramoto S, Matsuse T, Ohga E, Katayama H, Fukuchi Y and Ouchil Y. Inhibitory production effect of ambroxol on superoxide anion and generation by murine lung alveolar macrophages. *Journal of Asthma* 1998; 35: 267-272.
26. Gibbs B, Wolff Hand Grabbe J. Effects of free radical scavengers on histamine release from human basophils stimulated by immunological and non-immunological secretagogues. *Inflamm Res* 1999; 48: S13-S14.
27. Beeh K, Beier J, Esperester A and Paul L. Antiinflammatory properties of ambroxol. *Eur J Med Res* 2008; 13:557-562.
28. Pozzi E. Acebrophylline: an airway mucoregulator and anti-inflammatory agent. *Monaldi Arch Chest Dis* 2007;67:106-115.
29. Gupta PR. Ambroxol - Resurgence of an old molecule as an anti-inflammatory agent in chronic obstructive airway diseases. *Lung India* 2010; 27: 46-48.
30. Bellussi L and Passali D. Treatment of upper airways inflammation with Nimesulid. *Drugs* 1993; 46: 107-110.
31. Sharafkhaneh A, Velamuri S, Badmaev V, Lan C and Hanania N. The potential role of natural agents in treatment of airway inflammation. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease* 2007; 1(2): 105–120.
32. Utsugi M, Dobashi K, Koga Y, Masubuchi K, Shimizu Y, Endou K, Nakazawa T, Mori M. Ambroxol inhibits platelet-derived growth factor production in human monocytic cells. *European Journal of Pharmacology* 2002; 436: 47–51.
33. Gaida W, Klinder K, Arndt K, Weiser T. Ambroxol, a Nav1.8-preferring Na (+) channel blocker, effectively suppresses pain symptoms in animal models of chronic, neuropathic and inflammatory pain. *Neuropharmacology* 2005; 49: 1220-1227.
34. Leffler A, Reckzeh J, Nau C. Block of sensory neuronal Na<sup>+</sup> channels by the secretolytic ambroxol is associated with an interaction with local anesthetic binding sites. *Eur J Pharmacol* 2010; 630:19–28.
35. Yang B, Yao D, Ohuchi M, Ide M, Yano M, Okumura Y, and Kido H. Ambroxol suppresses influenza-virus proliferation in the mouse airway by increasing antiviral factor levels. *Eur Respir J* 2002; 19:952–958.

36. Hafez M, Aboulwafa M, Yassien M and Hassouna N. Activity of some mucolytics against bacterial adherence to mammalian cells. *Appl Biochem Biotechnol* 2009;158: 97–112.
37. Li F, Yu J, Yang H, Wan Z and Bai D. Effects of ambroxol on alginate of mature *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Curr Microbiol* 2008; 57: 1–7.
38. Lu Q, Yu J, Yang X, Wang J, Wang L, Lin Y and Lina L. Ambroxol interferes with *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. *International Journal of Antimicrobial Agents* xxx (2010) xxx–xxx.
39. Narahara H, Tatsuta M, Iishi H, Baba M, Mikuni T, Uedo N, Sakai N, Yano H. Attenuation by ambroxol of monochloramine-enhanced gastric carcinogenesis: a possible prevention against *Helicobacter pylori*-associated gastric carcinogenesis. *Cancer Letters* 2001; 168: 117-124.
40. Malerba M, Ponticiello A, Radaeli A, Bensi G, Grassi V. Effect of twelve - months therapy with oral ambroxol in preventing exacerbations in patients with COPD. Double-blind, randomized, multicenter, placebo-controlled study (the AMETHIST Trial). *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 2004; 17: 27–34.
41. Olivieri D. Ambroxol for the prevention of chronic bronchitis exacerbations: Long-term multicenter trial. *Respiration* 1987; 51: 42-51.
42. Poole P and Black P. Oral mucolytic drugs for exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: systematic review. *BMJ* 2001; 322: 1271–4.
43. Poole P and Black P. Preventing exacerbations of chronic bronchitis and COPD. Therapeutic potential of mucolytic agents. *Am J Respir Med* 2003; 2:367-370.
44. Psarras S, Caramori G, Contoli M, Papadopoulos N and Papi A. Oxidants in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Current Pharmaceutical Design* 2005; 11: 2053-2062.
45. Rogers DF. Mucoactive drugs for asthma and COPD: any place in therapy?. *Expert Opin. Investig. Drugs* 2002; 11(1):15-35.
46. Malerba M and Ragnoli B. Ambroxol in the 21st century: pharmacological and clinical update. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2008; 4:1119-1129.
47. Boehringer Ingelheim Ltd Consumer Healthcare, Summary of Product Characteristics last updated on medicines.ie: 31/07/2014, Lysopadol Mint 20



mg Lozenges.

<http://www.medicines.ie/printfriendlydocument.aspx?documentid=15167&companyid=2470>

48. Weiser T. Comparison of the effects of four Na<sup>+</sup> channel analgesics on TTX-resistant Na<sup>+</sup> currents in rat sensory neurons and recombinant Nav1.2 channels. *Neurosci Lett* 2006; 395: 179–184.
49. Hama A, Plum A and Sagen J. Antinociceptive effect of ambroxol in rats with neuropathic spinal cord injury pain. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2010; 97: 249–255.
50. Gibbs B, Schmutzler W, Vollrath I, Brosthardt P, Braam U, Wolff H and Zwadlo-Klarwasser G. Ambroxol inhibits the release of histamine, leukotrienes and cytokines from human leukocytes and mast cells. *Inflamm Res* 1999; 48: 86–93.
51. De Mey C, Peil H, Kölsch S, Bubeck J, Vix J. Efficacy and safety of ambroxol Lozenges in the treatment of acute uncomplicated sore throat. *Arzneimittel-Forsch* 2008; 58: 557–568.
52. Nobata K, Fujimura M, Ishiura Y, Myou S, Nakao S. Ambroxol for the prevention of acute upper respiratory disease. *Clin Exp Med* 2006; 6:79–83.
53. Frascini F, Scaglione F, Scarpazza G, Marchi F, and Calzavara M. Effects of a mucolytic agent on the bioavailability of antibiotics in patients with chronic respiratory diseases. *Curr Ther Res* 1988; 43(4):734-742.
54. Gene R, Poderoso JJ, Corazza C, Lasala MB, Wiemeyer JCM, Fernandez M, Guerreiro RB. Influence of ambroxol on Amoxicillin levels in bronchoalveolar lavage fluid. *Arzneim. Forsch. Drug Res* 1987; 37: 967-968.
55. Paganin F, Bouvet O, Chanez P, Fabre D, Galtier M, Godard P, Michel F and Bressolle F. Evaluation of the effects of ambroxol on the ofloxacin concentrations in bronchial tissues in COPD patients with infectious exacerbation. *Biopharmaceutics and Drug Disposition* 1995; 16: 393-401.
56. Principi N, Zavattini G and Daniotti S. Possibility of interaction among antibiotics and mucolytics in children. *Int. J. Clin. Pharm Res.* 1986; 6:369-372.

57. Spatola J, Poderoso JJ, Wiemeyer JCM, Fernandez M, Guerreiro RB and Corazza C. Influence of ambroxol on lung tissue penetration of amoxicillin. *Drug Res.* 1987; 37: 965-966.
58. Schmalisch G, Wauer R and Böhme B. Changes in pulmonary function in preterm infants recovering from RDS following early treatment with ambroxol: Results of a randomized trial. *Pediatric Pulmonology* 1999; 27:104–112.
59. Paleari D, Rossi G, Nicolini G and Olivieri D. Ambroxol: a multifaceted molecule with additional therapeutic potentials in respiratory disorders of childhood. *Expert Opin. Drug Discov.* [Early Online].
60. Wauer R, Schmalisch G, Böhme B, Arand J, Lehmann D. Randomized double blind trial of ambroxol for the treatment of respiratory distress syndrome. *Eur J Pediatr* 1992; 151:357-363.
61. Marini A, Franzetti M, Gios G, Flauto U, Arosio A, Maccabrini M, Rondini G, Chirico G, Giancola A, Console V, Schioppa F, Magni L, Pelti M, Zavattini G, Tomasini G and Daniotti S. Ambroxol in the treatment of idiopathic respiratory distress syndrome. *Respiration* 1987; 51:60-67.
62. Maegawa GHB, Tropak MB, Buttner JD, Rigat BA, Fuller M, Deepangi P, Liangiie T, Kornhaber GJ, Yoshitomo H, Joe TRC and Mahuran DJ. Identification and characterization of ambroxol as an enzyme enhancement agent for gaucher disease. *J Biol Chem.* 2009; 284(35): 23502–23516.
63. Mezzetti M, Colombo L, Marini M, Crusi V, Pierfederici P and Mussini E. A pharmacokinetic study on pulmonary tropism of ambroxol in patients under thoracic surgery. *J Em Surg* 1990; 13: 179-185.
64. Lee HJ, Joung SK, Kim YG, Yoo JY, Hana SB. Bioequivalence assessment of ambroxol tablet after a single oral dose administration to healthy male volunteers. *Pharmacol Res* 2004; 49: 93–98.
65. Ishiguro N, Senda C, Kishimoto W, Sakai Y, Funaeoe K and Igarashi T. Identification of CYP3A4 as the predominant isoform responsible for the metabolism of ambroxol in human liver microsomes. *Xenobiotica* 2000; 30: 71-80.

66. Tsunenari Y, Kast A, Honma M, Nishikawa J and Shibata T. Toxicity studies with ambroxol (NA 872) in rats, mice and rabbits. *Oyo Yakura* 1981; 21:281-311.
67. Lida H, Kast A and Tsunenari Y. Teratology studies with ambroxol (NA 872) in rats and rabbits. *Oyo Yakura* 1981; 21: 271-279.
68. Huq F. Molecular modelling analysis of the metabolism of ambroxol. *Journal of Pharmacology and Toxicology* 2008; 3: 147-152.
69. Pe´rez-Ruiz T, Mart´inez-Lozano C, Sanz A, Bravo E. Determination of bromhexine and ambroxol in pharmaceutical dosage forms, urine and blood serum. *Journal of Chromatography B* 1997; 692: 199–205.
70. Kiss B, Nemes K, Urmos I, Szfinyog J, Klebovich I. Determination of ambroxol in dog plasma by high-performance liquid chromatography and UV detection. *Chromatographia* 2000; 51: S217-220.
71. Dharumana J, Vasudhevan M, Ajithlal T. High performance liquid chromatographic method for the determination of cetirizine and ambroxol in human plasma and urine—a boxcar approach. *J. Chromatogr. B* 2011; 879: 2624– 2631.
72. Botterblom M, Janssen T and Guelen P. Rapid and sensitive determination of ambroxol in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1987; 42: 211-215.
73. Nobilis M, Pastera J, Svoboda D and Kvstina J. High-performance liquid chromatographic determination of ambroxol in human plasma. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* 1992; 58: 251-255.
74. Kim H, Yoo JY, Han SB, Lee HJ, Lee KR. Determination of ambroxol in human plasma using LC-MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003; 32: 209-216.
75. Su F, Wang F, Gao W and Li H. Determination of ambroxol in human plasma by high performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry (HPLC–MS/ESI). *J. Chromatogr. B* 2007; 853: 364–368.
76. Ahmed I, Roni MA, Kibria G, Islam MR and Jalil R. In vitro release kinetics study of ambroxol hydrochloride pellets developed by extrusion spherization technique followed by acrylic polymer coating. *Dhaka Univ. J. Pharm. Sci.* 2008; 7(1): 75-81

77. Akhter DT, Uddin R, Sutradhar KB and Rana MS. In vitro release kinetic study of ambroxol hydrochloride sustained release matrix tablets using hydrophilic and hydrophobic polymers. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 2012; 4: 1573- 1579.
78. Lakshmana Prabhu S, Shirwaikar AA, Shirwaikar A, Dinesh Kumar C, Aravind Kumar G. Simultaneous UV Spectrophotometric estimation of ambroxol hydrochloride and levocetirizine dihydrochloride. *Indian J Pharm Sci.* 2008; 70(2): 236–238.
79. Rele Rajan V, Gurav Pankaj J. Simple spectrophotometric methods for determination of ambroxol hydrochloride from pharmaceutical formulation. *International Journal of PharmTech Research* 2012; 4(3): 994-998.
80. Suma BV, Kannan K, Madhavan. V, Chandini R Nayar. Spectrophotometric estimation of ambroxol hydrochloride in bulk and tablet formulation. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2014; 3(2): 2090-2097.
81. Levent A, Yardım Y, Sentürk Z. Electrochemical performance of boron-doped diamond electrode insurfactant-containing media for ambroxol determination. *Sensors and Actuators B* 2014; 203: 517–526.
82. Abdel-Ghani NT, Hussein SH. Determination of ambroxol hydrochloride in pure solutions and some of its pharmaceutical preparations under batch and FIA conditions. *Il Farmaco* 2003; 58: 581-589.-potenciometrija
83. Felix FS, Brett CMA, Angnes L. Flow injection analysis using carbon film resistor electrodes for amperometric determination of ambroxol. *Talanta* 2008, 76:128-133.
84. Flores-Murrieta FJ, Hoyo-Vadillo C, Hong E, Castaneda-Hernandez G. Assay of ambroxol in human plasma by high-performance liquid chromatography with amperometric detection. *J Chromatogr Biomed Appl* 1989; 490:464-9.
85. Li J, Bi Y, Wang L, Sun F, Chen Z, Xu G, Fan G.  $\beta$  - Cyclodextrin enhanced on-line organic solvent field-amplified sample stacking in capillary zone electrophoresis for analysis of ambroxol in human plasma, following liquid–liquid extraction in the 96-well format. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2012; 66: 218– 224.

86. Perez-Ruiz T, Martinez-Lozano C, Sanz A, Bravo E. Sensitive method for the determination of ambroxol in body fluids by capillary electrophoresis and fluorescence detection. *J. Chromatogr. B* 2000; 742: 205–210.
87. Satinsky D, Dos Santos L, Sklenarova H, Solich P, Montenegro M, Araujo A. Sequential injection chromatographic determination of ambroxol hydrochloride and doxycycline in pharmaceutical preparations. *Talanta* 2005; 68: 214–218.
88. Hadad GM, El-Gindy A, Mahmoud WM. HPLC and chemometrics-assisted UV spectroscopy methods for the simultaneous determination of ambroxol and doxycycline in capsule. *Spectrochimica Acta Part A* 2008; 70: 655–663.
89. Shaikh KA, Patil SD, Devkhile AB. Development and validation of a reversed-phase HPLC method for simultaneous estimation of ambroxol hydrochloride and azithromycin in tablet dosage form. *J Pharm Biomed Anal* 2008; 48:1481–1484.
90. Thummala VRR, Ivaturi MR, and Nittala SR. Isolation, identification, and characterization of one degradation product in ambroxol by HPLC-hyphenated techniques. *Sci Pharm.* 2014; 82(2): 247–263.
91. Narasimha Rao LN, Krishnaiah C, Babu KS, Reddy KP. Development and validation of a stability-indicating LC method for simultaneous determination of related compounds of guaifenesin, terbutaline sulfate and ambroxol HCl in cough syrup formulation. *Journal of Saudi Chemical Society* 2014; 18: 593–600.
92. Satana E, Basan H, and Goger NG. Determination of ambroxol hydrochloride in tablets using flow-Injection UV spectrophotometry and HPLC. *Journal of Analytical Chemistry* 2008; 63: 451–454.
93. Trivedi RK, Patel MC, Jadhav SB. A Rapid, stability indicating RP-UPLC method for simultaneous determination of ambroxol hydrochloride, cetirizine hydrochloride and antimicrobial preservatives in liquid pharmaceutical formulation. *Sci Pharm.* 2011; 79: 525-543.
94. Belal FF, Sharaf El-Din MK, El-Enany NM and Saad S. Micellar liquid chromatographic method for the simultaneous determination of levofloxacin

- and ambroxol in combined tablets: Application to biological fluids. *Chemistry Central Journal* 2013, 7:162-175.
95. Emara S, Kamal M and Kawi MA. On-line sample cleanup and enrichment chromatographic technique for the determination of ambroxol in human serum. *Journal of Chromatographic Science* 2012; 50:91–96.
96. Rote A, Kande S. Development of HPTLC method for determination of cefpodoxime proxetil and ambroxol hydrochloride in human plasma by liquid–liquid extraction. *Pharm Methods* 2011; 2:242-246.
97. Colombo L and Marcucci F. Determination of ambroxol in biological material by gas chromatography with electron-capture detection. *Journal of Chromatography Biomed Appl* 1990; 530: 141-147.
98. Schmid J. Assay of ambroxol in biological fluids by capillary gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 1987; 414: 65-75.
99. Hang T, Zhang M, Song M, Shen J, Zhang Y. Simultaneous determination and pharmacokinetic study of roxithromycin and ambroxol hydrochloride in human plasma by LC-MS/MS. *Clin. Chim Acta* 2007; 382: 20–24.
100. Hu W, Xu Y, Liu F, Liu A, Guo Q. Rapid and sensitive liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the quantification of ambroxol in human plasma. *Biomed. Chromatogr.* 2008; 22: 1108–1114.
101. Wen A, Hang T, Chen S, Wang Z, Ding L, Tian Y, Zhang M, Xu X. Simultaneous determination of amoxicillin and ambroxol in human plasma by LC–MS/MS: Validation and application to pharmacokinetic study. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008; 48: 829–834.
102. Dong X, Ding L, Cao X, Jiang L and Zhong S. A sensitive LC-MS/MS method for the simultaneous determination of amoxicillin and ambroxol in human plasma with segmental monitoring. *Biomed. Chromatogr.* 2013; 27: 520–526.
103. Snyder LR, Kirkland JJ, and Dolan JW. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. 3rd Ed. Chichester, England: Wiley; 2010. Electronic version.
104. International Harmonized Tripartite Guideline (ICH)/World Health Organization (WHO): *Validation of Analytical Procedures*. Text and

- Methodology, Q2(R1), current step 4 version, parent guidelines on methodology dated November 6 1996, incorporated in November 2005.
105. US Environmental Protection Agency (EPA) 40 CFR Part 160. Good Laboratory Practice Standards. FIFRA and FFDCa (1989) and its subsequent revisions; 1989a.
  106. Food and Drug Administration (FDA). Guidance for Industry-Bioanalytical Method Validation, September 2013.
  107. Hubert P, Chiap P, Crommen J, Boulanger B, Chapuzet E, Mercier N, Bervoas-Martin S, Chevalier P, Grandjean D, Lagorce P, Lallier M, Laparra M, Laurentie M, Nivet JC. The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory. *Analytica Chimica Acta* 1999; 391: 135-148.
  108. Flanagan RJ, Taylor A, Watson ID and Whelpton R. Fundamentals of analytical toxicology. 1st ed. Chichester, England: Wiley; 2007.
  109. Mentus S, Mioč U. Odabrane metode fizičko-hemijske analize. Beograd: Univerzitet u Beogradu; 1993.
  110. Jovanović V, Kopečni M, Milonjić S, Ruvarac A, Spiričić A, Višacki V. Hromatografija, teorijski i praktični aspekti. Beograd: Institut za nuklearne nauke Boris Kidrič, Vinča centar za permanentno obrazovanje; 1988.
  111. Grumbach ES, Arsenault JC, McCabe DR. Beginners Guide to UPLC. Ultra-Performance Liquid Chromatography. Milford, USA: Waters Corporation; 2009.
  112. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. Principles of Instrumental Analysis. 5th ed. Philadelphia: Saunders College Publishing; 1998.
  113. Milosavljević SM. Strukturne instrumentalne metode. Beograd: Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet; 1994.
  114. Savić J, Savić M. Osnovi analitičke hemije. Sarajevo: Svjetlost; 1987.
  115. Downard K. Mass Spectrometry. A Foundation Course. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2004.
  116. Watson JT. Introduction to Mass Spectrometry. 3rd Ed. New York: Lippincott-Raven; 1997.
  117. Barwick V, Langley J, Mallet T, Stein B, and Webb K. Best practice guide for generating mass spectra. LGC; 2007.

118. Hewlett Packard. Basic of LC/MS. <http://www.agilent.com/cs/library/support/documents/a05296.pdf>
119. Shimadzu. Manual LCMS-8030 Triple Quadrupole LC/MS/MS Mass Spectrometer.
120. Chromacademy. Fundamental LC-MS. <http://www.chromacademy.com>
121. Mišović J, Ast T. Instrumentalne metode hemijske analize. Beograd: Tehnološko metalurški fakultet; 1987.
122. Finnigan MAT. Hardware Operator's and Service Manuel, Revision B; 1994.
123. Finnigan MAT. Atmospheric Pressure Ionization Operator's and Service Manual, Revision A; 1993.
124. Prasain J (Ed.). Tandem Mass Spectrometry. Application and Principles. Publisher: In Tech; 2012.
125. Vogeserand M and Seger C. Pitfalls associated with the use of liquid chromatography–tandem mass spectrometry in the clinical laboratory. *Clinical Chemistry* 2010; 56(8): 1234-1244.
126. Agilent Technologies. Basic of LC/MS. <http://ccc.chem.pitt.edu/wipf/Agilent%20LC-MS%20primer.pdf>
127. Sargent M (Ed). Guide to achieving reliable quantitative LC-MS measurements, RSC Analytical Methods Committee. 1st ed. LGC; 2013.
128. Pokrajac M. Farmakokinetika. Priručnik za praktičnu nastavu. II izd. Beograd: Grafolik; 2001.
129. Mutavdžić Pavlović D, Babić S, Horvat AJM, Kaštelan-Macan M. Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. *Trends in Analytical Chemistry* 2007; 26 (11): 1062-1075.
130. Shen DD. Toxicokinetics. In: Klaassen CD (Ed.). *Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, 7th Ed. USA: McGraw-Hill Companies; 2008: 305-325.
131. Jokanović M. Toksikologija. II izd. Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu; 2010.
132. Pokrajac M. Farmakokinetika. IV izd. Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu; 2012.



133. Dhillon S, Gill K: Basic pharmacokinetics. In: Dhillon S, Kostrzewski A (Ed.). *Clinical Pharmacokinetics*. London, UK: Pharmaceutical Press; 2006: 1-43.
134. Đurić Z. *Farmaceutska tehnologija sa biofarmacijom*. I izd. Zemun: Nijansa; 2004.
135. *European Pharmacopoeia (Ph. Eur.)*, 7th ed. Strasbourg: Council of Europe. European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care; 2014: 288-295. <http://online.pheur.org>.
136. *The Japanese Pharmacopoeia (JP)*, 15th Ed. 2001.
137. *USP 34. The United States Pharmacopoeia 34th ed*. Rockville, MD: The United States Pharmacopoeial Convention, Inc, 2010.
138. *British Pharmacopoeia (BP)*, 5th Ed. 2007.
139. Costa P, Lobo JMS. Modeling and comparison of dissolution profiles, *Eur. J. Pharm. Sci.* 2001; 13: 123–133.
140. Đurić Z, Parojčić J. *Praktikum iz biofarmacije*. Zemun: Nijansa; 2004.
141. *Guidance for industry: Bioavailability and bioequivalence studies for orally administered drug products—general considerations*. US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research; 2003. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070124.pdf>.
142. Melouna M, Syrový T, Vrána A. The thermodynamic dissociation constants of ambroxol, antazoline, naphazoline, oxymetazoline and ranitidine by the regression analysis of spectrophotometric data. *Talanta* 2004; 62: 511–522.
143. *Oasis Sample Extraction Products*. Waters Corporation. Milford, USA: 2002.
144. Matuszewski BK, Constanzer ML, and Chavez CM. Strategies for the assesment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Eng Anal Chem* 2003; 75: 3019-3030.
145. Hammer Von R, Bozler G, Jauch R and Koss FW. Speziesvergleich in pharmakokinetik und metabolismus von NA 872 Cl ambroxol bei ratte, kaninchen, hund und mensch. *Arzneimittelforschung*. 1978; 28(5a):899-903.

- 
146. Rupali R, Dhot K, Ilango K and Shabbeer S. Pharmacokinetic of ambroxol hydrochloride microspheres in rats after oral administration. *IJRPC* 2012; 2: 280-288. *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry*.
  147. Ren Y, Wang L, He H, Tang X. Pulmonary selectivity and local pharmacokinetics of ambroxol hydrochloride dry powder inhalation in rat. *Journal of Pharmaceutical Science* 2009; 98: 1797-1803.
  148. Poornima NB, Anup KR., Ramya BR, Ambujakshi HR., Subhasish M, Haque R. Formulation and in vitro evaluation of sustained release tabletes of ambroxol hydrochloride. *International Journal of Pharmacy and Engineering* 2013; 1(1): 41-54.
  149. Hajera K, Zaheer Z. Development and validation of a dissolution test with spectrophotometric analysis for gemifloxacin mesylate and ambroxol hydrochloride in tablet dosage form. *International Journal of PharmTech Research* 2012; 4(2): 661-668.
  150. Itoh K, Kubo W, Fujiwara M, Hirayama T, Miyazaki S, Dairaku M, Togashi M, Mikami R, Attwood D. The influence of variation of gastric pH on the gelation and release characteristics of in situ gelling pectin formulations. *International Journal of Pharmaceutics* 2006; 312: 37-42.
  151. Pravilnik o sadržaju zahteva, odnosno dokumentacije za odobrenje kliničkog ispitivanja leka i medicinskog sredstva, kao i način sprovođenja kliničkog ispitivanja leka i medicinskog sredstva.

# PROLOG 1. REZULTATI STATISTIČKE OBRADJE PODATAKA KALIBRACIONIH KRIVIH

## 1. Kalibraciona kriva 1CC

<i>Regression Statistics</i>					
Multiple R	0.999817695				
R Square	0.999635423				
Adjusted R Square	0.999583341				
Standard Error	0.018790362				
Observations	9				
ANOVA					p-value
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>
Regression	1	6.7767409	6.7767409	19193.34076	2.69312E-13
Residual	7	0.002471544	0.000353078		
Total	8	6.779212444			

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 99.0%</i>	<i>Upper 99.0%</i>
Intercept	-0.0018	<b>0.0083</b>	-0.2157	0.8353	0.0213	0.0177	-0.0307	0.0271
X Variable 1	0.0125	0.0001	138.540 0	0.0000	0.0123	0.0127	0.0122	0.0128

### PROBABILITY OUTPUT

<i>Percentile</i>	<i>Y</i>
5.55555556	0.005689804
16.66666667	0.026824506
27.77777778	0.061588748
38.88888889	0.126170553
50	0.25365164
61.11111111	0.600339638
72.22222222	1.270189152
83.33333333	1.839289514
94.44444444	2.514524804

DURBIN-WATSON TEST (k=1, n=9)									
Observation	Predicted Y	Residuals	Standard Residuals	Differences(D test correlations)	Square Differences	Sum of square differences	D(SSd/SSr)	Square Residuals	Sum of square residuals
1	0.0044 63758	0.0012 26046	0.0697 53728	0.00239 71	5.7460 9E-06	0.0085 045	<b>3.4409</b> <b>66292</b>	1.5031 9E-06	0.0024 71544
2	0.0232 0136	0.0036 23146	0.2061 32569	- 0.00271 0962	7.3493 1E-06			1.3127 2E-05	
3	0.0606 76564	0.0009 12184	0.0518 97117	0.00212 3133	4.5076 9E-06			8.3208 E-07	
4	0.1231 35237	0.0030 35317	0.1726 89057	0.00256 3741	6.5727 7E-06			9.2131 5E-06	
5	0.2480 52583	0.0055 99058	0.3185 48642	- 0.02806 404	0.0007 8759			3.1349 4E-05	
6	0.6228 0462	- 0.0224 64982	- 1.2781 06086	0.04526 2785	0.0020 4872			0.0005 04675	
7	1.2473 9135	0.0227 97803	1.2970 41328	- 0.05548 6368	0.0030 78737			0.0005 1974	
8	1.8719 78079	- 0.0326 88565	- 1.8597 59029	0.05064 856	0.0025 65277			0.0010 68542	
9	2.4965 64808	0.0179 59995	1.0218 02674					0.0003 22561	

**Kako je 3.44 > 0.998, zaključuje se da ne postoji autokorelacija između reziduala.**

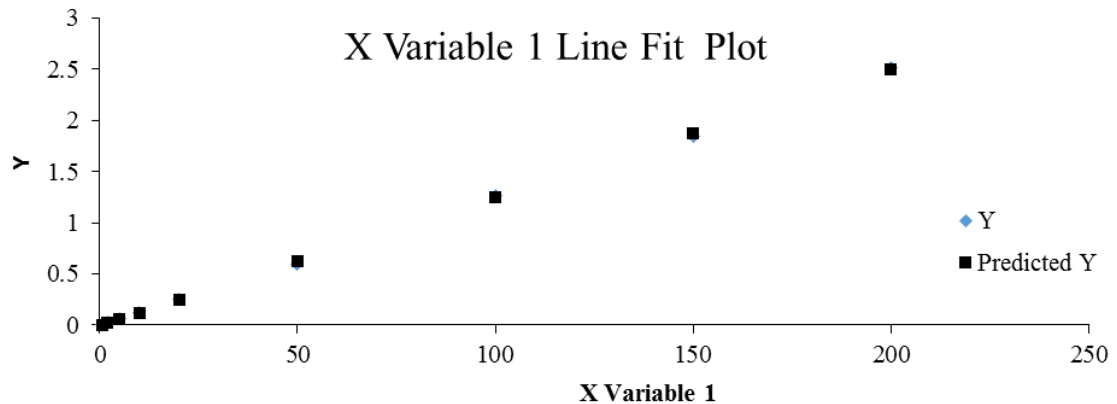
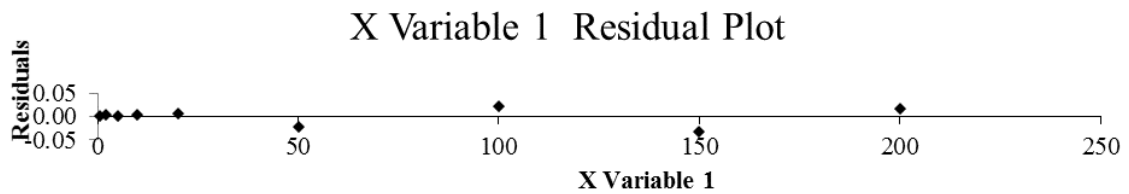
SHAPIRO-WILK NORMALITY TEST						
Residuals(Sort ascending)	SS (devsq(RESIDUALS))	m((n-1)/2)	a	ai*(emax-emin)	b(Sum(ai*(emax-emin)))	W(b*b/SS)
-0.032688565	0.002471544	4	0.5888	0.032670373	0.04694384	<b>0.89163863</b>
-0.022464982			0.3244	0.013113863		
0.000912184			0.1976	0.000926126		
0.001226046			0.0974	0.000233478		
0.003035317						
0.003623146						
0.005599058						
0.017959995						
0.022797803						
				0.1	0.5	0.27
				0.859	0.935	0.891

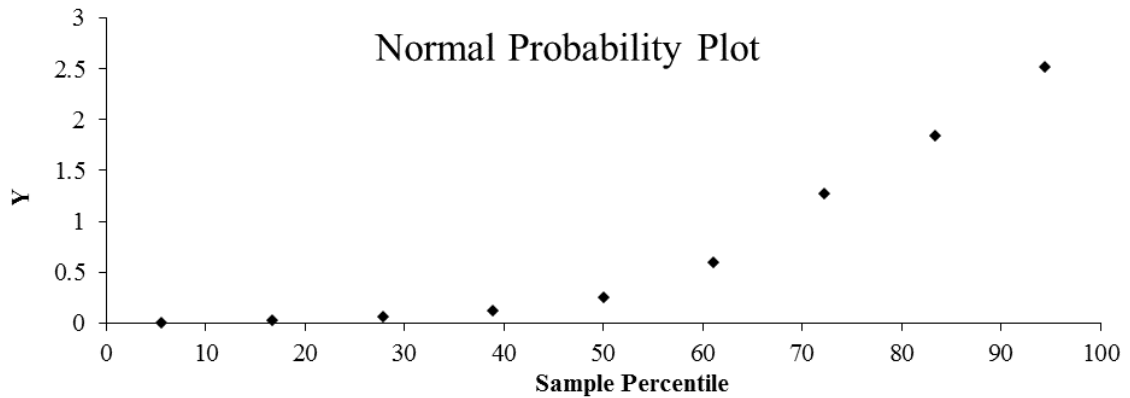
**Kako je 0.27 > 0.01, zaključuje se da reziduali imaju normalnu distribuciju.**

HARTLEY HOMESCEDASTICITY TEST				
Residuals	Variances(Var.s(e1-e6))	MAX(Var)	MIN(Var)	H(Max/Min)
0.001226046	1.24788E-06	6.01052E-05	1.24788E-06	<b>48.1657443</b>
0.003623146	5.2914E-06			
0.000912184	1.03484E-05			
0.003035317	1.03399E-05			
0.005599058	1.52697E-05			
-0.022464982	5.18511E-05			
0.022797803	2.82645E-05			
-0.032688565	4.71488E-05			
0.017959995	6.01052E-05			

Kako je  $48.16 < 50$ , zaključuje se da su varijanse reziduala homogene.

GOODNES OF FIT REGRESSION LINE	
F= MSreg/MSres	19193.34076
$\alpha$	0.01
F-crit= FINV( $\alpha$ , dfreg, dfres)	0.000168681
p-value=FDIST (F, dfreg, dfres)	2.69E-13
sig= IF (p-value < $\alpha$ , yes, no)	<b>da</b>





## 2. Kalibraciona kriva 2CC

<i>Regression Statistics</i>	
Multiple R	0.999511713
R Square	0.999023664
Adjusted R Square	0.998884187
Standard Error	0.031470161
Observations	9

<i>ANOVA</i>					<i>p-value</i>
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>
Regression	1	7.093693526	7.093693526	7162.662379	8.46632E-12
Residual	7	0.006932597	0.000990371		
Total	8	7.100626124			

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 99.0%</i>	<i>Upper 99.0%</i>
Intercept	-0.0004	<b>0.0138</b>	-0.0312	<b>0.9760</b>	-0.0331	0.0323	-0.0488	0.0480
X Variable 1	0.0128	0.0002	84.6325	0.0000	0.0124	0.0131	0.0123	0.0133

### PROBABILITY OUTPUT

<i>Percentile</i>	<i>Y</i>
5.55555556	0.005917832
16.66666667	0.024050735
27.77777778	0.070571138
38.88888889	0.139886623
50	0.289078917
61.11111111	0.617351775
72.22222222	1.217687308
83.33333333	1.90739694
94.44444444	2.593704615

DURBIN-WATSON TEST (k=1, n=9)									
Observation	Predicted Y	Residuals	Standard Residuals	Differences(D test correlations)	Square Differences	Sum of square differences	D(SSd/SSr)	Square Residuals	Sum of square residuals
1	0.0059 58757	- 4.0925 7E-05	- 0.0013 90252	- 0.00103 7877	1.0771 9E-06	0.0098 9674	<b>1.4275</b> <b>65933</b>	1.6749 2E-09	0.0069 32597
2	0.0251 29537	- 0.0010 78802	- 0.0366 47043	0.00817 8843	6.6893 5E-05			1.1638 1E-06	
3	0.0634 71097	0.0071 00041	0.2411 89198	0.00541 2886	2.9299 3E-05			5.0410 6E-05	
4	0.1273 73696	0.0125 12927	0.4250 65563	0.02138 7096	0.0004 57408			0.0001 56573	
5	0.2551 78894	0.0339 00023	1.1515 87645	- 0.05514 2736	0.0030 40721			0.0011 49212	
6	0.6385 94489	- 0.0212 42713	- 0.7216 17393	- 0.03869 0458	0.0014 96952			0.0004 51253	
7	1.2776 2048	- 0.0599 33172	- 2.0359 36667	0.05068 364	0.0025 68831			0.0035 91985	
8	1.9166 46471	- 0.0092 49531	- 0.3142 07626	0.04728 1684	0.0022 35558			8.5553 8E-05	
9	2.5556 72462	0.0380 32153	1.2919 56574					0.0014 46445	

Kako je  $1.42 > 0.998$ , zaključuje se da ne postoji autokorelacija između reziduala.

SHAPIRO-WILK NORMALITY TEST						
Residuals(Sort ascending)	SS (devsq(RESIDUAL S))	m((n - 1)/2)	a	ai*(emax-emin)	b(Sum(ai*(emax-emin)))	W(b*b/SS)
- 0.059933172	0.006932597	4	0.588 8	0.05768198 3	0.080667168	<b>0.93863693</b> 7
- 0.021242713			0.324 4	0.01788830 4		
- 0.009249531			0.197 6	0.00430026 2		
- 0.001078802			0.097 4	0.00079661 9		
-4.09257E-05						
0.007100041						
0.012512927						
0.033900023						
0.038032153						

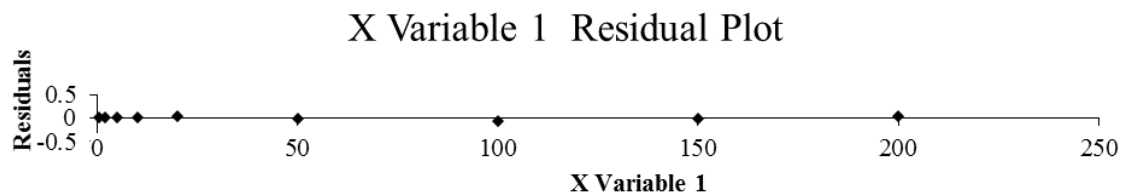
0.5      0.9      0.27  
0.935      0.972      0.939

Kako je  $0.54 > 0.01$ , zaključuje se da reziduali imaju normalnu distribuciju.

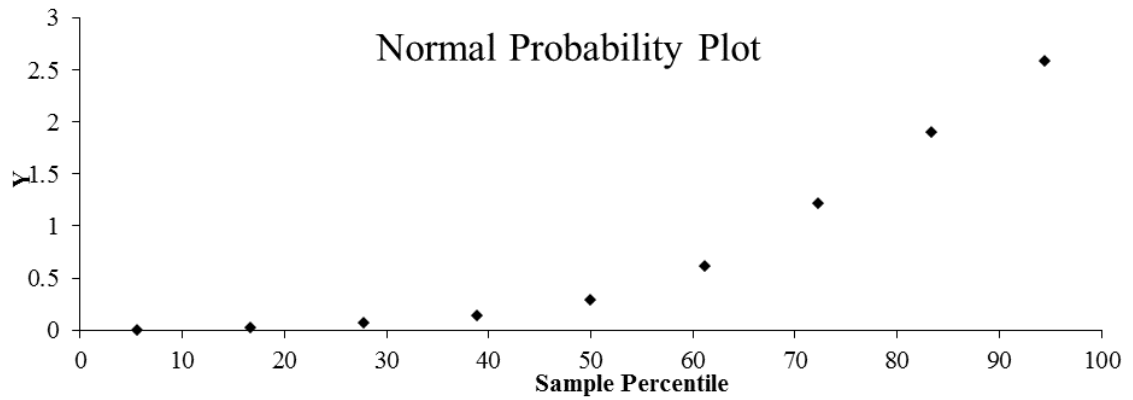
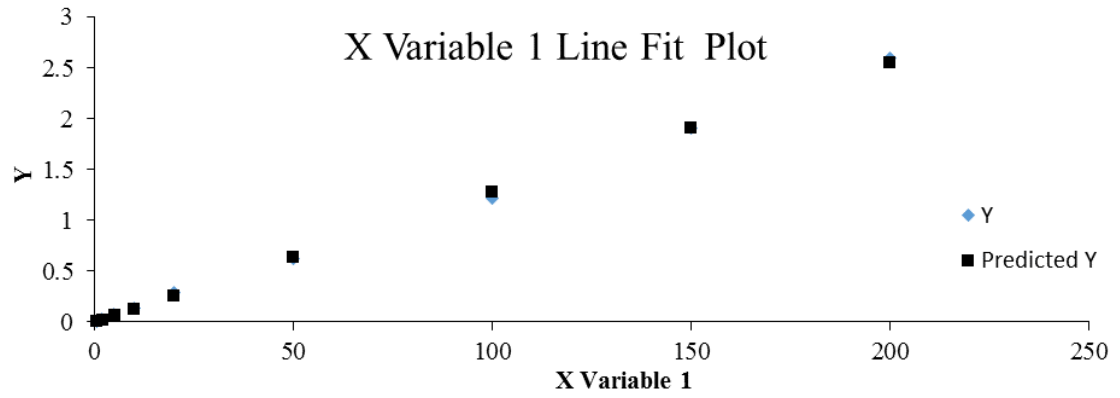
HARTLEY HOMESCEDASTICITY TEST				
<i>Residuals</i>	<i>Variances(Var.s(e1-e6))</i>	<i>MAX(Var)</i>	<i>MIN(Var)</i>	<i>H(Max/Min)</i>
-4.09257E-05	1.22704E-06	5.25061E-05	1.0518E-06	<b>49.92006205</b>
-0.001078802	1.0518E-06			
0.007100041	4.90042E-06			
0.012512927	5.02911E-05			
0.033900023	5.02741E-05			
-0.021242713	4.71837E-05			
-0.059933172	5.25061E-05			
-0.009249531	1.05781E-05			
0.038032153	1.27513E-06			

**Kako je 49.92 < 50, zaključuje se da su varijanse reziduala homogene.**

GOODNES OF FIT REGRESSION LINE	
F= MSreg/MSres	7162.662379
$\alpha$	0.01
F-crit= FINV( $\alpha$ , dfreg, dfres)	0.000168681
p-value=FDIST (F, dfreg, dfres)	8.47E-12
sig= IF (p-value < $\alpha$ , yes, no)	<b>da</b>







### 3. Kalibraciona kriva 3CC

<i>Regression Statistics</i>					
Multiple R	0.999962022				
R Square	0.999924045				
Adjusted R Square	0.999913194				
Standard Error	0.00828463				
Observations	9				
<b>ANOVA</b>					p-value
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<b>F</b>	<b>Significance F</b>
Regression	1	6.324904048	6.324904048	92152.63136	1.11146E-15
Residual	7	0.000480446	6.86351E-05		
Total	8	6.325384494			

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 99.0%</i>	<i>Upper 99.0%</i>
Intercept	-0.0016	<b>0.0036</b>	-0.4322	<b>0.6786</b>	-0.0102	0.0070	-0.0143	0.0112
X Variable 1	0.0121	0.0000	303.5665	0.0000	0.0120	0.0122	0.0119	0.0122

**PROBABILITY OUTPUT**

<i>Percentile</i>	<i>Y</i>
5.55555556	0.005097847
16.66666667	0.024245325
27.77777778	0.067894927
38.88888889	0.11500834
50	0.225012971
61.11111111	0.601851912
72.22222222	1.215075355
83.33333333	1.812856997
94.44444444	2.405398497

<b>DURBIN-WATSON TEST (k=1, n=9)</b>									
<i>Observation</i>	<i>Predicted Y</i>	<i>Residuals</i>	<i>Standard Residuals</i>	<i>Differences(D test correlations)</i>	<i>Square Differences</i>	<i>Sum of square differences</i>	<i>D(SSd/SSr)</i>	<i>Square Residuals</i>	<i>Sum of square residuals</i>
1	0.004459919	0.000637928	0.08231797	0.001045312	1.09268E-06	0.000810426	<b>1.686821878</b>	4.06952E-07	0.000480446
2	0.022562085	0.00168324	0.217204507	0.007445271	5.54321E-05			2.8333E-06	
3	0.058766416	0.00912851	1.177938947	-0.013227139	0.000174957			8.33297E-05	
4	0.119106969	-0.004098629	-0.528885289	-0.010676474	0.000113987			1.67988E-05	
5	0.239788074	-0.014775103	-1.90657274	0.014795625	0.000218911			0.000218304	
6	0.601831389	2.05226E-05	0.002648225	0.009817918	9.63915E-05			4.21176E-10	
7	1.205236914	0.009838441	1.269548096	-0.005623883	3.16281E-05			9.67949E-05	
8	1.80864244	0.004214558	0.543844653	-0.010864025	0.000118027			1.77625E-05	
9	2.412047965	-0.006649468	-0.858044369					4.42154E-05	

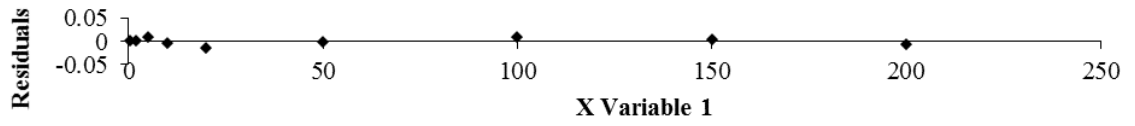
Kako je 1.687 > 0.998, zaključuje se da ne postoji autokorelacija između reziduala.

SHAPIRO-WILK NORMALITY TEST						
<i>Residuals(Sort ascending)</i>	<i>SS (devsq(RESIDUAL S))</i>	<i>m((n - 1)/2)</i>	<i>a</i>	<i>ai*(emax-emin)</i>	<i>b(Sum(ai*(emax-emin)))</i>	<i>W(b*b/SS)</i>
-0.014775103	0.000480446	4	0.5888	0.014492454	0.021415465	<b>0.954576568</b>
-0.006649468			0.3244	0.005118376		
-0.004098629			0.1976	0.001642686		
2.05226E-05			0.0974	0.000161949		
0.000637928						
0.00168324						
0.004214558						
0.00912851						
0.009838441						
				0.5	0.9	0.7
				0.935	0.972	0.955
<b>Kako je 0.71 &gt; 0.01, zaključuje se da reziduali imaju normalnu distribuciju.</b>						

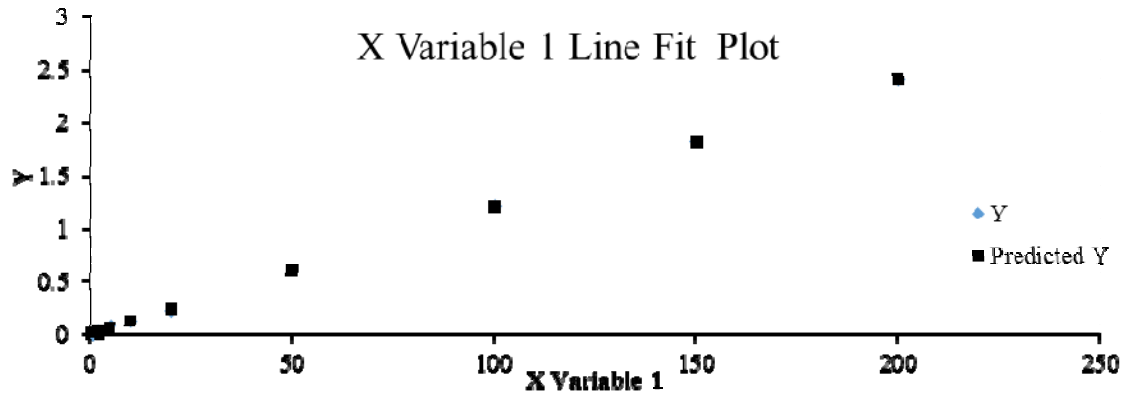
HARTLEY HOMESCEDASTICITY TEST				
<i>Residuals</i>	<i>Variances(Var.s(e1-e6))</i>	<i>MAX(Var)</i>	<i>MIN(Var)</i>	<i>H(Max/Min)</i>
0.000637928	1.03836E-06	4.5845E-05	1.03836E-06	<b>44.15151568</b>
0.00168324	1.5504E-05			
0.00912851	1.08304E-06			
-0.004098629	2.25227E-05			
-0.014775103	1.9688E-05			
2.05226E-05	3.56897E-05			
0.009838441	4.5845E-05			
0.004214558	3.17295E-05			
-0.006649468	1.33306E-06			
<b>Kako je 44.15 &lt; 50, zaključuje se da su varijanse reziduala homogene.</b>				

GOODNES OF FIT REGRESSION LINE	
F= MSreg/MSres	92152.63136
$\alpha$	0.01
F-crit= FINV( $\alpha$ , dfreg, dfres)	0.000168681
p-value=FDIST (F, dfreg, dfres)	1.11E-15
sig= IF (p-value < $\alpha$ , yes, no)	<b>da</b>

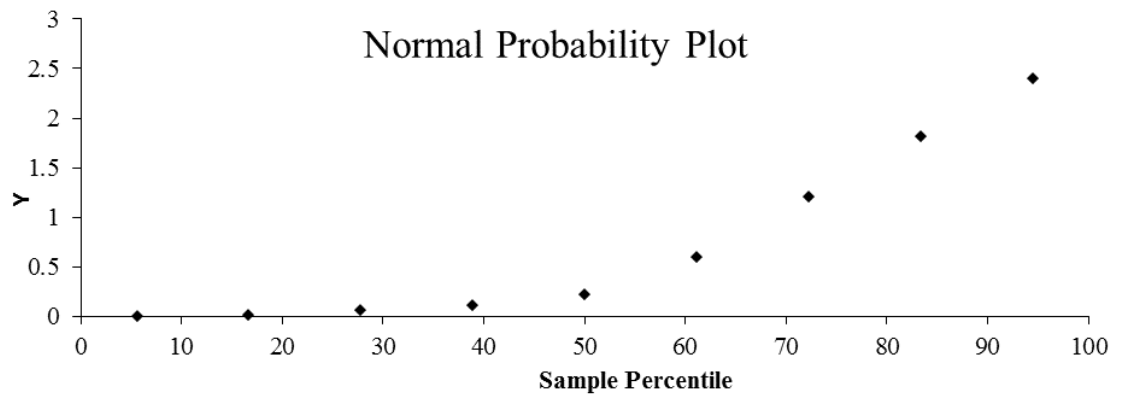
### X Variable 1 Residual Plot



### X Variable 1 Line Fit Plot



### Normal Probability Plot



## BIOGRAFIJA AUTORA

Maja Vujović rođena je 10.04.1971. god. u Nišu, gde je završila gimnaziju „Svetozar Marković”, 1990. god. Filozofski fakultet (danas Prirodno-matematički fakultet) odsek Hemija upisala je školske 1990/91. godine i diplomirala 1996. god. sa prosečnom ocenom 8,35. Od 1999. godine nalazi se u stalnom radnom odnosu u Toksikološko - hemijskoj laboratoriji Zavoda za sudsku medicinu u Nišu, a od 2006. godine angažovana je i kao saradnik u nastavi za užu naučnu oblast Farmacija, predmet Toksikološka hemija na Medicinskom fakultetu u Nišu. U sadašnje zvanje asistenta Toksikologije sa analitikom na integrisanim studijama odseka Farmacija izabrana je 2013. godine. Specijalističke studije iz Toksikološke hemije završila je 2003. godine u Nacionalnom centru za kontrolu trovanja Vojnomedicinske akademije u Beogradu, na temu „Određivanje  $\alpha$  - amanitina u biološkom materijalu primenom tečne hromatografije sa masenim detektorom“ sa prosečnom ocenom pet (5). Doktorske studije iz Toksikologije upisala je 2009. godine. Koautor je poglavlja “Alkoholi” u udžbeniku „Sudska medicina“ Vujadin Otašević sa saradnicima (Medicinski fakultet u Nišu, 2011. god.). Kao saradnik bila je angažovana na naučnim projektima „Uzroci smrti i stepen saglasnosti kliničkih dijagnoza i obdukcijskog nalaza prema materijalu Zavoda za sudsku medicinu u Nišu“ u periodima od 2006 - 2008. god. i od 2012 - 2013. god. odobreni od strane Ministarstva za zdravlje Republike Srbije. Od 2009. god. nalazi se na spisku stalnih sudskih veštaka Ministarstva pravde Republike Srbije iz oblasti Hemija, uža specijalnost Toksikološka hemija. Pohađala je kontinuirane edukacije u zemlji i inostranstvu i završila brojne osnovne i napredne kurseve za samostalni rad na različitim analitičkim tehnikama kao što gasna hromatografija sa masenim detektorom, ultra-brza tečna hromatografija sa tandem-masenim detektorom, UV/VIS spektrofotometrija, tečna hromatografija visokih performansi i dr. Učesnica je mnogobrojnih domaćih i međunarodnih kongresa i simpozijuma iz oblasti toksikologije sa preko 20 autorskih i koautorskih radova. Član je Sekcije za toksikološku hemiju Farmaceutskog društva Srbije, Udruženja toksikologa Srbije i Sekcije za sudsku medicinu Srbije.



Универзитет у Нишу

---

**Изјава 1.**

### **ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ**

Изјављујем даје докторска дисертација, под насловом

**Развој нове аналитичке методе ултра брзе течне хроматографије са тандем масеном детектором за одређивање амброксол хидрохлорида и њена примена**

која је одбрањена на Медицинском факултету Универзитетау Нишу:

- резултат сопственоистраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, каоиу публикацијама Универзитетау Нишу.

У Нишу, \_\_\_\_\_

Аутор дисертације: \_\_\_\_\_

Потпис аутора дисертације:

\_\_\_\_\_



Универзитет у Нишу

---

**Изјава 2.**

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНОГ И ЕЛЕКТРОНСКОГ ОБЛИКА  
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Име и презиме аутора: **Маја М. Вујовић**

Наслов дисертације: **Развој нове аналитичке методе ултра брзе течне хроматографије са тандем масеном детектором за одређивање амброксол хидрохлорида и њена примена**

Ментор: **Академик Проф. др Милан Јокановић**

Изјављујем да је штампани облик моје докторске дисертације истоветан електронском облику, који сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу.**

У Нишу, \_\_\_\_\_

Потпис аутора дисертације:

\_\_\_\_\_



Универзитет у Нишу

---

**Изјава 3:**

### **ИЗЈАВО КОРИШЋЕЊУ**

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да, у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, унесемоју докторску дисертацију, под насловом:

**Развој нове аналитичке методе ултра брзе течне хроматографије са тандем масеном детектором за одређивање амброксол хидрохлорида и њена примена**

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

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

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

(Молимода подвучете само једну од шест понуђених лиценци; опис лиценци дат је у наставку текста).

У Нишу, \_\_\_\_\_

Аутор дисертације: \_\_\_\_\_

Потпис аутора дисертације:

\_\_\_\_\_