

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BORIS PUCKO

VREDNOTENJE STABILNOSTI NEKATERIH BENZODIAZEPINOV PRI
STRESNIH POGOJIH Z METODO TEKOČINSKE KROMATOGRFIJE
VISOKE LOČLJIVOSTI

EVALUATION OF FORCED DEGRADATION STABILITY OF SOME
BENZODIAZEPINES BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID
CHROMATOGRAPHY

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljal na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko Fakultete za farmacijo v Ljubljani pod mentorstvom izr. prof. dr. Roberta Roškarja, mag. farm.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju izr. prof. dr. Robertu Roškarju, mag. farm. za vse nasvete in strokovno pomoč. Zahvala gre tudi družini, ki mi je študij omogočila in mi je tekom študija vedno stala ob strani. Hvala Tamari za vso ljubezen in potrpežljivost. Hvala tudi vsem prijateljem za nepozabna študijska leta.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelal pod vodstvom izr. prof. dr. Roberta Roškarja, mag. farm.

Boris Pucko

Predsednica komisije:

izr. prof. dr. Anamarija Zega, mag. farm.

Članica komisije:

dr. Urša Pečar Fonović, univ. dipl. biol.

VSEBINA

VSEBINA.....	i
POVZETEK	iii
ABSTRACT	iv
SEZNAM OKRAJŠAV	v
1 UVOD.....	1
1.1 BENZODIAZEPINI	1
1.1.1 Mehanizem delovanja benzodiazepinov	1
1.1.2 Delitev in farmakokinetika benzodiazepinov.....	2
1.1.3 Uporaba benzodiazepinov	3
1.2 STABILNOST ZDRAVIL	4
1.2.1 Razdelitev stabilnosti	5
1.2.2 Testi stabilnosti	9
1.3 RELACIJA STRUKTURA-AKTIVNOST/STABILNOST SPOJINE	12
1.3.1 QSAR	12
1.3.2 Hammettova enačba in njen pomen	13
1.3.3 Taftova enačba in njen pomen	14
2 NAMEN DELA.....	16
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 MATERIALI	17
3.1.1 Spojine.....	17
3.1.2 Reagenti in topila	18
3.1.3 Naprave in pribor	18
3.2 METODE.....	19
3.2.1 Razvoj in optimizacija analizne metode.....	19
3.2.2 Priprava vzorcev za razvoj in optimizacijo ter validacijo metode	20
3.2.3 Validacija analizne metode	22
3.2.4 Priprava vzorcev za študijo stabilnosti.....	24
3.2.5 Obdelava podatkov.....	25
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	26
4.1 RAZVOJ IN VALIDACIJA ANALIZNE METODE	26
4.1.1 Razvoj metode HPLC.....	26

4.1.2 Validacija analizne metode	29
4.2 ŠTUDIJA STRESNE STABILNOSTI BD.....	33
4.2.1 Določitev reda reakcij	34
4.2.2 Stabilnost BD pri različnih stresnih pogojih	36
4.2.3 Vpliv temperature.....	37
4.2.4 Vpliv pH.....	39
4.2.5 Primerjava in vpliv funkcionalnih skupin na stabilnost BD v raztopinah.....	42
4.2.6 Mehanizem razpada BD	51
5 SKLEPI.....	55
6 LITERATURA	57

POVZETEK

1,4-benzodiazepini (BD) se pogosto uporabljajo kot anksiolitiki, uspavala, protiepileptiki in mišični relaksanti. BD so med seboj strukturno podobne spojine z enako osnovno strukturo, razlikujejo se le v različnih funkcionalnih skupinah.

Namen magistrske naloge je bil opredeliti vpliv teh funkcionalnih skupin na stabilnost enajstih BD v stresnih pogojih in tako ugotoviti povezavo med vplivi posameznih funkcionalnih skupin in stabilnostjo. V študijo smo vključili naslednje BD: diazepam, lorazepam, bromazepam, oksazepam, nitrazepam, flunitrazepam, nimetazepam, medazepam, klonazepam, nordiazepam in pinazepam. Za namen študije stabilnosti smo najprej razvili in optimizirali metodo HPLC, s katero smo uspešno ločili vseh enajst BD in šest pripadajočih razpadnih produktov benzofenonov. Analizno metodo smo validirali v skladu s smernicami ICH in potrdili njeno primernost za predvideno uporabo. V sklopu 14-dnevne stabilnostne študije smo BD shranjevali v raztopinah različnih koncentracij HCl oz. NaOH 0,1, 0,2, 0,5 in 1 M, ki so bile izpostavljene temperaturam 4, 25 in 40 °C. Ob časih 0, 1, 2, 3, 7 in 14 dni smo z metodo HPLC izmerili upad koncentracije posameznih BD in nastanek razpadnih produktov.

Upad koncentracije vseh BD najbolje opisuje kinetika 1. reda. S pomočjo Arrheniusovega pristopa smo ugotovili linearno povezavo med konstantami hitrosti razpada nekaterih BD in temperaturo. Prav tako smo ugotovili linearni odnos med konstantami hitrosti razpada nekaterih BD in koncentracijo NaOH oz. HCl. Vsi BD razen bromazepama so bolj stabilni v kislih pogojih. Najbolj stabilna BD sta medazepam in diazepam, najmanj stabilna pa klonazepam in nitrazepam. Na osnovi rezultatov stabilnosti smo opredelili vpliv funkcionalnih skupin na reakcijo hidrolize in ugotovili izraziti stabilizirajoči učinek v primeru odsotnosti skupine =O na mestu R₂ in prisotnosti skupine –CH₃ na mestu R₁. BD pa bistveno destabilizira prisotnost skupine –NO₂ na mestu R₇ in prisotnost skupine –OH na mestu R₃. Z uporabo Hammettove in Taftove metodologije smo kljub omejenosti tega pristopa in izredne nestabilnosti nekaterih BD pri izbranih pogojih ugotovili povezavo med prispevki funkcionalnih skupin BD in njihovimi konstantami hitrosti razpada. Opredelili smo tudi mehanizem razpada, ki pri večini BD predvsem v raztopinah HCl in raztopinah NaOH nižjih koncentracij v velikem obsegu vodi do nastanka pripadajočih benzofenonov. Rezultati izvedene študije potrjujejo povezavo med strukturo BD in njihovo stabilnostjo.

Ključne besede: benzodiazepini, stabilnost, stresno testiranje, HPLC, funkcionalne skupine

ABSTRACT

1,4-benzodiazepines (BD) are widely used anxiolytics, hypnotics, anticonvulsants and muscle relaxants. The BD share a similar molecular structure, but differ in some functional groups.

The purpose of this master's thesis was to define the impact of these functional groups on the stability of eleven BD under stress conditions and in addition to determine the correlation between the contribution of the functional groups and the stability of the BD. The study involves the following BD: diazepam, lorazepam, bromazepam, oxazepam, nitrazepam, flunitrazepam, nimetazepam, medazepam, clonazepam, nordiazepam and pinazepam. For the purpose of evaluation of degradation of the BD, a HPLC method was developed and optimized. The method was used to separate all of the eleven BD and six of their degradation products benzophenones (BF). The method was validated according to the ICH guidelines and was proven to be suitable for its intended use. For the stress testing the BD were dissolved in solutions of 0.1, 0.2, 0.5 and 1 M HCl and NaOH. The solutions were then exposed to temperatures of 4, 25 and 40 °C for 14 days. In 0, 1, 2, 3, 7 and 14 days the decline of BD concentration and the appearance of degradation products were measured with the developed analytical method.

The decline of the BD concentration is best described with the kinetics of first order reactions. Some BD show linear correlation between temperature and their reaction rate constants (confirmed with the Arrhenius plot). The same linear correlation was observed between the reaction rate constants of some BD and the concentration of the HCl and NaOH solutions. BD were proven to be more stable in acidic solutions. Medazepam and diazepam are the most stable BD, nitrazepam and klonazepam are the least stable BD. The stabilizing or destabilizing effects of individual functional groups on hydrolysis were determined. The absence of =O group on R₂ and the presence of a –CH₃ group on R₁ stabilize the BD molecule. –NO₂ group on R₇ and –OH group on R₃ destabilize the molecule. With the help of Hammett's and Taft's methodology correlation between the contribution of functional groups of BD and their reaction rate constants was determined. The degradation paths of most BD in the solutions of HCl and solutions of NaOH of low concentration mainly lead to the formation of associated BF. The results of the study confirm the correlation between the structure of BD and their stability.

Key words: benzodiazepines, stability, stress testing, HPLC, functional groups

SEZNAM OKRAJŠAV

ACN	Acetonitril
BD	Benzodiazepin
BF	Benzofenon
BF BRO	Benzofenon bromazepama
BF DIA	Benzofenon diazepama
BF KLO	Benzofenon klonazepama
BF LOR	Benzofenon lorazepama
BF NIT	Benzofenon nitrazepama
BF NOR	Benzofenon nordiazepama
BRO	Bromazepam
DIA	Diazepam
E _a	Aktivacijska energija
FLU	Flunitrazepam
FO	Farmacevtska oblika
GABA	γ-aminobutanojska kislina
HPLC	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>)
ICH	Mednarodna konferenca za harmonizacijo (ang. <i>International Conference on Harmonisation</i>)
KLO	Klonazepam
LOR	Lorazepam
MED	Medazepam

MF	Mobilna faza
NIM	Nimetazepam
NIT	Nitrazepam
NOR	Nordiazepam
OKS	Oksazepam
PIN	Pinazepam
QCh	Kontrolna raztopina visoke koncentracije (ang. <i>Quality Control high</i>)
QCl	Kontrolna raztopina nizke koncentracije (ang. <i>Quality Control low</i>)
QCm	Kontrolna raztopina srednje koncentracije (ang. <i>Quality Control medium</i>)
QSAR	Kvantitativna povezava med strukturo in aktivnostjo (ang. <i>Quantitative Structure-Activity Relationship</i>)
R^2	Determinacijski koeficient
RH	Relativna vlažnost (ang. <i>Relative Humidity</i>)
RSD	Relativni standardni odklon (ang. <i>Relative Standard Deviation</i>)
SAR	Povezava med strukturo in aktivnostjo (<i>Structure-Activity Relationship</i>)
SD	Standardni odklon (ang. <i>Standard Deviation</i>)
t_r	Retencijski čas
ZU	Zdravilna učinkovina

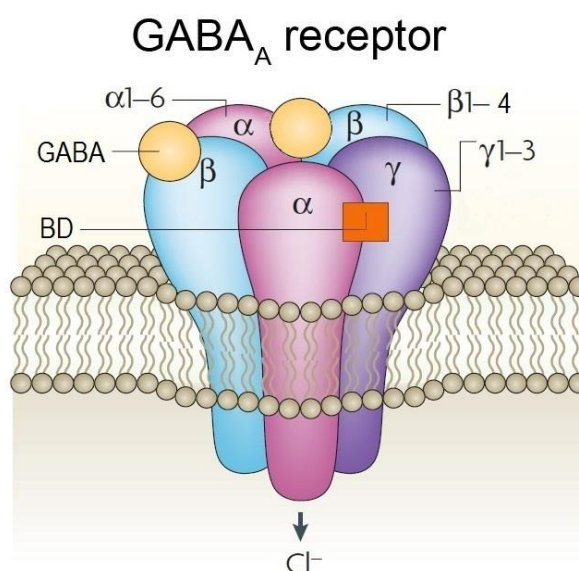
1 UVOD

1.1 BENZODIAZEPINI

Odkritje prvega benzodiazepina (BD) in njihov nadaljnji razvoj v 50-tih letih 20. stoletja je bila prelomnica v terapiji anksioznosti. Pred tem so se v ta namen uporabljali: etanol, alkaloidi, pridobljeni iz različnih rastlin, bromidi in predvsem barbiturati. Vse te snovi imajo veliko neželenih učinkov. Vzporedno z odkritjem BD se je širilo znanje o gabanergičnem sistemu, na katerega BD delujejo (1).

1.1.1 Mehanizem delovanja benzodiazepinov

Tarča BD so receptorji GABA_A gabanergičnega sistema, ki so prisotni v nevronske membrane v centralnem živčnem sistemu. Receptor je transmembranski protein, ki deluje kot ionski kanalček za Cl^- ione, aktivira pa ga zaviralni prenašalec γ -aminobutanojska kislina (GABA) (2). Makromolekularni kompleks GABA_A ima pet podenot, ki jih gradi osem polipeptidnih skupin. Receptorski kompleks je sestavljen iz dveh α , dveh β in ene γ podenote (slika 1). Receptor ima dve vezavni mesti za GABA in eno vezavno mesto za BD. Znanstveniki so opredelili šest različnih α , štiri β in tri γ podenote. Taka raznolikost omogoča veliko število receptorskih izoform. GABA se veže na podenote α in β , odpre kloridne kanalčke, kar privede do hiperpolarizacije membrane (3).



Slika 1: Receptor GABA_A z označenimi mesti vezave GABA in BD, povzeto po (4)

Afiniteta BD do receptorja je odvisna od variacije podenot α , β in γ . Izkazalo se je, da imajo BD največjo afiniteto do izoforme s podenotami α_1 , β_2 in γ_2 . Ta izoforma je široko porazdeljena po celotnem centralnem živčnem sistemu (5). BD so pozitivni alosterični modulatorji receptorjev GABA_A. Vezava BD v žep med podenoti α in γ povzroči konformacijsko spremembo receptorja, ki olajša vezavo GABA na receptor (6).

1.1.2 Delitev in farmakokinetika benzodiazepinov

BD, ki so trenutno na trgu, se razlikujejo po farmakokinetičnih lastnostih, kjer je v ospredju čas delovanja posameznega BD (7). Trenutno je na trgu več kot 50 različnih BD. Zaradi različnih indikacij so razvili veliko število BD, ki jih lahko razdelimo v naslednje skupine: dolgo delujoči, srednje dolgo delujoči in kratko delujoči (8). V metabolizmu nekaterih BD (npr. diazepam (DIA) in flunitrazepam (FLU)) nastajajo tudi aktivni presnovki. Vsem BD sta skupna hitra absorpcija in hiter čas porazdelitve (9). V preglednici I je predstavljenih nekaj lastnosti BD, ki smo jih uporabili v naši raziskavi.

Preglednica I: Razpolovni časi in opredelitev BD uporabljenih v naši študiji, povzeto po (10) (11)

Učinkovina \ Lastnosti	Razpolovni čas [h]	Čas delovanja
DIAZEPAM (DIA)	26 – 50	dolgo delujoči
NORDIAZEPAM (NOR)	30 – 150	dolgo delujoči
LORAZEPAM (LOR)	10 – 20	kratko delujoči
OKSAZEPAM (OKS)	5 – 15	kratko delujoči
NITRAZEPAM (NIT)	17 – 48	srednje dolgo delujoči
BROMAZEPAM (BRO)	10 – 20	kratko delujoči
PINAZEPAM (PIN)	40 – 100	dolgo delujoči
FLUNITRAZEPAM (FLU)	18 – 26	srednje dolgo delujoči
NIMETAZEPAM (NIM)	14 – 30	srednje dolgo delujoči
MEDAZEPAM (MED)	36 – 200	dolgo delujoči
KLONAZEPAM (KLO)	20 – 50	dolgo delujoči

Večina BD ima biološko aktivne presnovke, ki nastanejo z demetilacijo in hidroksilacijo. Tako je eden pogostejših aktivnih presnovkov dolgo delujočih BD NOR, ki je glavni metabolit DIA. NOR se s hidroksilacijo nadalje pretvori do OKS, ki je še vedno aktiven. OKS nato tvori neaktiven glukuronid in se z urinom izloči iz telesa (12).

1.1.3 Uporaba benzodiazepinov

BD so najpomembnejši in najširše uporabljeni anksiolitiki in uspavala. Zraven tega se še uporabljajo kot pomirjevala, protiepileptiki in mišični relaksanti. V splošnem večina BD izraža podobno farmakološko delovanje, izbira je pa odvisna od želenega časa delovanja (13).

1.1.3.1 USPAVALNO DELOVANJE

BD spadajo med zdravila za simptomatsko zdravljenje primarne nespečnosti. Uporaba BD skrajša čas, ki je potreben, da bolnik zaspi ter podaljša čas spanca (14). Ob kratkotrajni uporabi veljajo za varne in učinkovite. Dolgotrajnejša uporaba ni priporočljiva zaradi razvoja odvisnosti in tolerance. Uporaba BD kot hipnotikov mora biti omejena na štiri tedne (15). V ta namen se uporabljajo naslednji BD: BRO, FLU, LOR, NIM in NIT (10) (11).

1.1.3.2 ANKSIOLITIČNO DELOVANJE

Prednost BD pred ostalimi zdravili za zdravljenje anksioznosti je hitro delovanje in učinkovito izboljšanje razpoloženja bolnikov. Slabe lastnosti so, da lahko pri nepravilni uporabi pride do odvisnosti in pretiranega pomirjevalnega učinka. Slednji lahko še posebej pri starejši populaciji privede do nadaljnjih komplikacij, kot so padci in posledično zlomi (16). Za anksiolitično delovanje so najprimernejši BD s počasnejšo absorpcijo, biološko aktivnimi metaboliti in nizko lipofilnostjo (5). V ta namen se uporabljajo naslednji BD: BRO, KLO, DIA, MED, NOR, OKS in PIN (10) (11).

1.1.3.3 PROTIEPILEPTIČNO DELOVANJE

BD so zdravila prvega izbora pri obliki status epilepticus, kjer se dajejo intravensko ali intramuskularno (17). V ta namen se uporabljajo naslednji BD: KLO, DIA, LOR, in NIT (10) (11). Kronična terapija z BD se ne izvaja, ker se razvije toleranca in zaradi pretiranega pomirjevalnega učinka pride do poslabšanja motoričnih sposobnosti (18).

1.1.3.4 MIŠIČNI RELAKSANTI

BD se uporabljajo kot alternativa mišičnim relaksantom, vendar je njihova uporaba v ta namen zelo omejena (19). 5 – 60 mg odmerka DIA zadošča za sprostitev krča pri bolnikih

z lezijami, ki so prizadele hrbtenjačo in pri nekaterih bolnikih s cerebralno paralizo (5). V ta namen se uporabljajo: DIA, NIT in KLO (10) (11).

Za vsa zdravila, ne samo BD, je potrebno zagotoviti varnost, kakovost in učinkovitost. Stabilnost zdravil je eden od osnovnih segmentov zagotavljanja kakovosti in posledično tudi varnosti in učinkovitosti zdravil.

1.2 STABILNOST ZDRAVIL

Stabilnost zdravila je definirana kot sposobnost zdravila, da v času shranjevanja in uporabe ohrani svoje lastnosti znotraj predpisanih mej. Obstaja mnogo razlogov zaradi katerih lahko pride do odstopov od predpisanih mej, ki so posledica nestabilnosti farmacevtskih izdelkov (20). V preglednici II so predstavljene oblike nestabilnosti, njihova razlaga, konkretni primeri farmacevtskih oblik (FO), zdravilnih učinkovin (ZU) oz. ovojnine in ustrezen parameter stabilnosti, ki se v posameznem primeru testira.

Preglednica II: Posledice nestabilnosti, povzeto po (20) (22)

Oblika nestabilnosti	Posledica	Primer FO, ZU oz. ovojnine	Parameter testiranja
znižanje koncentracije ZU	zmanjšanje učinkovitosti zdravila zaradi upada vsebnosti ZU pod mejo sprejemljivosti	nitroglicerinske tablete, antibiotiki	vsebnost ZU, po navadi čas v katerem se vsebnost zmanjša do 10 %
zvišanje koncentracije ZU	vpliv na varnost zaradi izhlapevanja nosilca	lidokainski geli, raztopine v infuzijskih vrečkah	vsebnost ZU v končni ovojnine
sprememba biološke uporabnosti/raztapljanja	sprememba hitrosti in obsega absorpcije ZU tekom shranjevanja zdravila	pretvorba med kristalnimi oblikami ZU, pomožne snovi	študije sproščanja ZU iz FO
izguba enakomernosti vsebnosti	neenakomerno odmerjanje ZU	suspenzije, emulzije	možnost redispergiranja in volumen sedimentacije
upad mikrobiološke kakovosti	povišanje števila že prisotnih mikroorganizmov v FO ali kontaminacija zaradi nepravilnega shranjevanja	kreme, vodne raztopine, vhodne surovine	skupno število živih mikroorganizmov in test na specifične mikroorganizme; sterilnost sterilnih pripravkov
izguba elegancie izdelka	sprememba barve	tablete s »spray-dried« laktozo, adrenalin	organoleptične lastnosti
nastanek toksičnih razpadnih produktov	vpliv na varnost zaradi razpada ZU do toksičnih produktov	tetraciklini, proteini, BD, penicilini	vsebnost razpadnih produktov tekom shranjevanja zdravila

Oblika nestabilnosti	Posledica	Primer FO, ZU oz. ovojnine	Parameter testiranja
izguba integritete ovojnine	vpliv na stabilnost zdravila, ustreznost odmerjanja zdravila	zamaškom lahko popusti navoj	specifični testi ovojnine, parametri kakovosti FO

V nadaljevanju smo stabilnost razdelili na osnovne segmente. Večjo pozornost smo posvetili kemijski stabilnosti, saj smo se na ta del stabilnosti osredotočili v naši študiji stabilnosti.

1.2.1 Razdelitev stabilnosti

Stabilnost lahko v grobem razdelimo na fizikalno, mikrobiološko in kemijsko (20).

1.2.1.1 FIZIKALNA STABILNOST

Fizikalne lastnosti so odvisne od fizikalnega stanja ZU in pomožnih snovi. Te lastnosti vplivajo na varnost in učinkovitost zdravila, zato je treba fizikalna stanja ZU in pomožnih snovi opredeliti (23). Primer fizikalnega stanja sta amorfna in kristalna oblika ZU. S časom lahko ZU ali pomožna snov prehajata iz enega v drugo fizikalno stanje, odvisno od tega katero je termodinamično bolj stabilno (20). V preglednici III so predstavljeni dejavniki, ki vplivajo na spremembo fizikalne stabilnosti ZU in kaj pri teh pogojih vrednotimo. V preglednici IV so opisane spremembe v FO, ki so posledica fizikalne nestabilnosti.

Preglednica III: Dejavniki, ki vplivajo na fizikalno stabilnost ZU, povzeto po (24)

Dejavnik	Vrednotenje
temperatura	spmemba kristalnega stanja
vlaga	spmemba kristalnega stanja ali tvorba hidratov oz. sprememba hidratnega stanja
mehanski stres	fizikalne spremembe, ki so posledica mehanske obdelave med proizvodnjo
vakuum (pospešeno sušenje)	tvorba brezvodnega stanja oz. sprememba hidratnega stanja
svetloba	spmemba barve in sprememba kristalnega stanja

Preglednica IV: Spremembe v FO zaradi fizikalne nestabilnosti, povzeto po (25)

Farmacevtska oblika	Sprememba zaradi nestabilnosti
trdne farmacevtske oblike	
želatinske kapsule	sprememba v trdnosti kapsule
obložene tablete	razpoke v oblogi, sprememba v strukturi ali barvi obloge
neobložene tablete	razpoke, spremembe na površini tablete
praški in granule	zbitje ali razbarvanje
tekoče farmacevtske oblike	
raztopine in sirupi	precipitacija ali tvorba plinov
emulzije	ločitev faz
suspenzije	sedimentacija in tvorba pogače
sterilne tekočine	sprememba barve, motnost, tvorba površinskega filma
tinkture	precipitacija
poltrdne farmacevtske oblike	
kreme	ločitev faz, rast kristalov in izhlapevanje vode
mazila	sprememba konsistence, izhlapevanje tekočine na površino
svečke	pretirano mehčanje, sušenje ali strjevanje

1.2.1.2 MIKROBIOLOŠKA STABILNOST

Mikroorganizmi so pogosto prisotni v okolju, zato je treba ohranjati mikrobiološko stabilnost od izhodnih snovi do končnega izdelka. Patogeni mikroorganizmi v farmacevtskih izdelkih ne smejo biti prisotni zaradi neposrednega vpliva na varnost bolnika (20). Prisotnost nepatogenih mikroorganizmov lahko povzroči kvarjenje zdravila, ki se izraža predvsem v organoleptičnih spremembah: motnost, vonj, barva, okus ali ločitev faz (26). Mikrobiološko stabilnost zagotovimo z dobro proizvodno prakso, z izbiro primernih vsebnikov in ovojnine, primernimi izhodnimi snovmi ter konzervansi, kjer so potrebni (24). Za kontrolo mikrobiološke kakovosti se uporabljata naslednja testa: test za vrednotenje skupnega števila živih aerobnih mikroorganizmov in test na specifične mikroorganizme. Za zagotavljanje sterilnosti farmacevtskih izdelkov se uporablja test sterilnosti in test prisotnosti pirogenov (27).

1.2.1.2 KEMIJSKA STABILNOST

Kemijsko nestabilnost razumemo kot razpad ZU, zaradi neke kemijske reakcije, ki posledično vodi do zmanjšanja učinkovitosti zdravila. V nekaterih primerih lahko nastajajo tudi toksični razpadni produkti, v drugih pa razpadni produkti, ki so estetsko nesprejemljivi (22). Obstaja več poti razpada ZU, med katerimi so najpogostejše hidrolize, oksidacije in

dehidracije. Ostale poti zajemajo: izomerizacijo in racemizacijo, dekarboksilacijo in eliminacijo, fotokemijski razpad, ... Na kemijsko stabilnost vpliva več dejavnikov: molekularna struktura ZU, temperatura, pH, ionska moč, dielektrična konstanta topila, kristalna struktura in polimorfizem, kisik, svetloba, vlaga, ... S kontrolo teh dejavnikov vplivamo na kemijsko stabilnost zdravila (20) (24) (28). V preglednici V so predstavljene funkcionalne skupine ZU, ki so pogosto podvržene kemijskim spremembam, in produkti, ki pri tem nastanejo.

Preglednica V: Spremembe na funkcionalnih skupinah ZU, povzeto po (29)

Funkcionalna skupina	Reakcija	Produkt
amidi	hidroliza	amin in karboksilna kislina
estri	hidroliza	alkohol in karboksilna kislina
karbamati	hidroliza	alkohol in amin
imin	hidroliza	keton in amin
aldehidi	oksidacija	karboksilna kislina
reakcije na dušikovih in žveplovih atomih	oksidacija	N-oksid, sulfoksid, sulfon
alkoholi	oksidacija	aldehid, keton, karboksilna kislina

1.2.1.2.1 Hidroliza

Hidroliza je ena najpogostejših reakcij razpada ZU, ki poteka skozi široko območje pH. Za potek reakcije je pomembna voda, ki je v času shranjevanja zdravila lahko v FO v obliki topila ali pa v obliki zračne vlage. Obseg hidrolize ZU je smiselno testirati skozi široko območje pH, saj tako lahko ugotovimo, pri katerem pH je ZU najbolj (ne)stabilna (30). V preglednici VI so navedene nekatere reakcije hidroliz ZU.

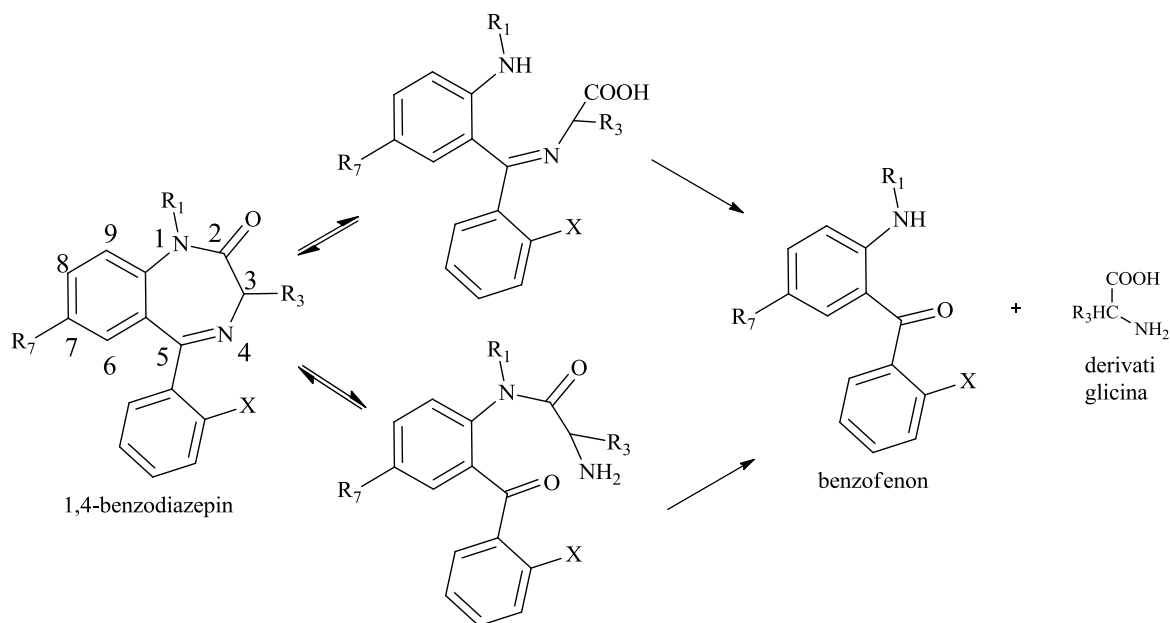
Preglednica VI: Reakcije hidroliz ZU, povzeto po (20) (22)

Reakcija hidrolize	Zdravilna učinkovina
hidracija (adicija vode na dvojno vez)	fumarna kislina
hidroliza etrov	orfenadrin
hidroliza glikozidov	digoksin, gentamicin, streptomycin
obrat kondenzacijske reakcije	diazepam, nitrofurantoin, hidroklortiazid
hidroliza estrov	acetilsalicilna kislina, prokain, pilokarpin, varfarin
hidroliza amidov	paracetamol, kloramfenikol, benzilpenicilini,

V nadaljevanju smo se osredotočili na hidrolizo BD, saj smo med študijo stabilnosti raziskovali potek te reakcije.

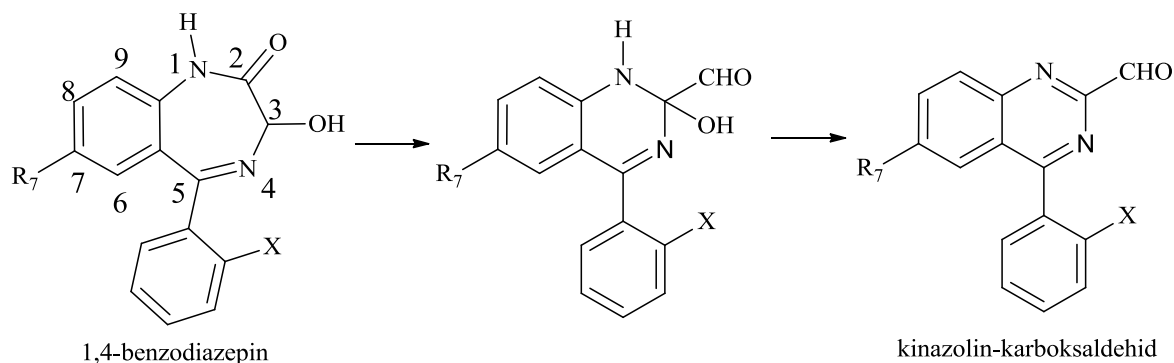
1.2.1.2.2 Hidroliza BD

Hidroliza 1,4-benzodiazepinov poteče na 1,2-amidni in/ali na 4,5-azometinski vezi. Preko dveh vmesnih produktov nastanejo pripadajoči derivati BF in derivati glicina. Prva stopnja reakcije je reverzibilna, obseg reverzibilnosti in pot reakcije sta odvisna od pH raztopine. Hidroliza BD je predstavljena na sliki 2 (26).



Slika 2: Hidroliza 1,4-benzodiazepina

Dodatna razpadna pot obstaja pri derivatih 3-OH (LOR, OKS), kjer najprej nastane kinazolin-karboksaldehid, ki nato razpada naprej (slika 3) (26).



Slika 3: Dodatna pot razpada 3-OH derivatov 1,4-benzodiazepinov

Stabilnost ZU in FO vrednotimo s testi stabilnosti, ki so opisani v nadaljevanju. Osredotočili smo se na stresne teste stabilnosti, katere smo izvajali med študijo stabilnosti.

1.2.2 Testi stabilnosti

Stabilnostni testi so pomembni za oceno kakovosti ZU in končnih FO, ki se s časom spreminja zaradi že prej navedenih dejavnikov. Stabilnostne študije se načrtujejo glede na klimatske cone (preglednica VII), njihov glavni cilj pa je določitev roka do ponovnega preskušanja ZU, roka uporabnosti FO in predlagati pogoje shranjevanja (31).

Preglednica VII: Klimatske cone, povzeto po (32)

Klimatska cona	Opis	Temperatura in relativna vlaga
I	zmerno podnebje	21 °C / 45% RH
II	subtropsko in mediteransko podnebje	25 °C / 60% RH
III	vroče in suho podnebje	30 °C / 35% RH
IVA	vroče in vlažno podnebje	30 °C / 65% RH
IVB	vroče in zelo vlažno podnebje	30 °C / 75% RH

1.2.2.1 DOLGOROČNO TESTIRANJE

Dolgoročno in pospešeno testiranje stabilnosti spadata med formalne stabilnostne študije. Za to vrsto študij obstajajo posebni protokoli in smernice za izvedbo (33). Namen dolgoročnega testiranja stabilnosti je opredelitev roka do ponovnega preskušanja ZU oz. roka uporabnosti zdravila pri predpisanih pogojih shranjevanja (20). Dolgoročno testiranje novih ZU oz. FO poteka pri naslednjih pogojih: 25 °C ± 2 °C/60 % relativne vlažnosti (RH) ± 5 % RH ali 30 °C ± 2 °C/65 % RH ± 5 % RH. Ti pogoji veljajo za klimatski coni I in II (sem spadajo EU, ZDA in Japonska) v primeru 30 °C/ 65 % RH pa tudi za klimatsko cono III in IV A. V prvem letu testiranja poteka vzorčenje vsake tri mesece, v drugem letu vsakih šest mesecev, v nadaljevanju pa vsakih dvanajst mesecev do predvidenega roka uporabe zdravila oz. roka do ponovnega preskušanja ZU. Dolgoročno testiranje poteka maksimalno pet let. Testiranje se izvaja na treh registracijskih serijah (34).

1.2.2.2 POSPEŠENO TESTIRANJE

Pri pospešenem testiranju izpostavimo ZU oz. FO pogojem, ki odstopajo od pogojev shranjevanja, vendar niso toliko ekstremni kot pogoji pri stresnih testih. Izvaja se za zagotavljanje stabilnosti farmacevtskih izdelkov v pogojih ki odstopajo od predvidenih pogojev shranjevanja (kratkotrajni odstopi npr. pri transportu) (20). Dodaten namen pospešenih testov je pospešiti razpad ZU pri višji temperaturi, nato pa s pomočjo ekstrapolacije iz povišane temperature predvideti rok uporabe pri predvidenih pogojih

shranjevanja. V ta namen se uporablja Arrheniusova enačba, ki podaja zvezo med hitrostjo kemijskih reakcij in temperaturo (enačba 1) (21).

$$k = Ae^{-E_a/(RT)} \quad (\text{enačba 1})$$

Pri tem je k konstanta hitrosti pri temperaturi T [K], A je Arrheniusova konstanta, E_a je aktivacijska energija, R pa splošna plinska konstanta.

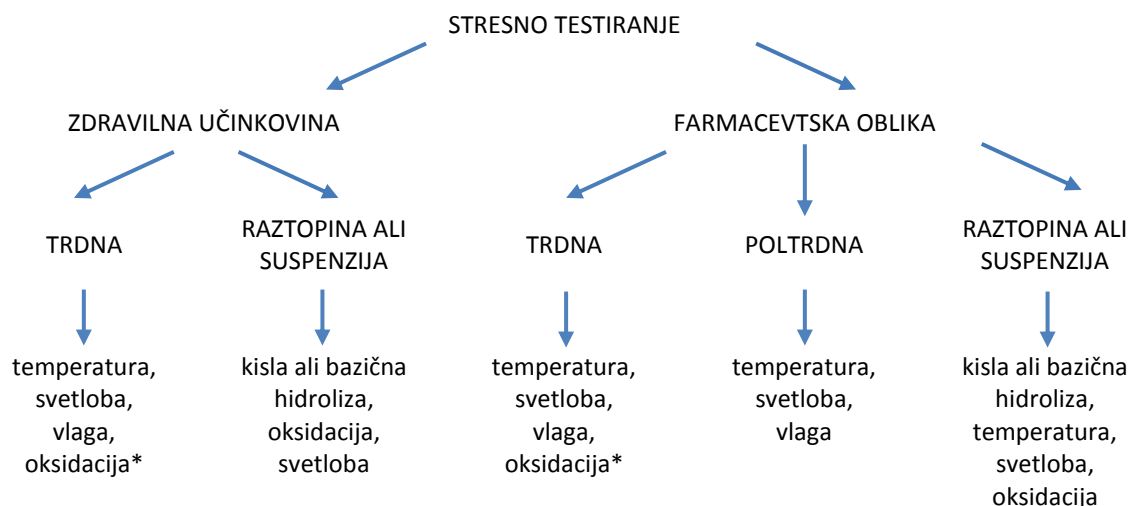
1.2.2.3 STRESNO TESTIRANJE

Za stresno testiranje obstajajo le osnovna priporočila, pogoji testiranja pa se spreminjajo glede na testirano ZU oz. FO. Stresni testi so vrsta testov stabilnosti, kjer ZU ali FO izpostavimo ekstremnim pogojem (35). Najprej se izvajajo na ZU, nato na eksperimentalnih formulacijah, kasneje pa še na izbranih formulacijah z namenom postavitve protokola in specifikacij za registracijske serije (20).

Namen stresnih testov je: (36)

- Ugotoviti mehanizem razpada ZU.
- Razlikovati med razpadnimi produkti FO in razpadnimi produkti, ki niso del FO.
- Ugotoviti strukturo razpadnih produktov.
- Določiti intrinzično stabilnost ZU v FO.
- Ugotoviti mehanizme razpada v reakcijah povezanih s hidrolizo, oksidacijo, termolizo in fotolizo ZU ali FO.
- Razviti ustrezno stabilnostno indikativno metodo.
- Bolje razumeti kemijske lastnosti ZU.
- Razviti stabilnejše FO.
- Najti rešitve za težave povezane s stabilnostjo.

Stresne teste je smiselno prirediti realni situaciji, ko smo na spodnji sprejemljivi meji vsebnosti ZU. Tako spremljamo razpad ZU v obsegu od 10 do 20 % začetne vsebnosti. Spremljati razpad v večjem obsegu je nesmiselno, saj bi v tem primeru lahko prišlo do nastanka sekundarnih razpadnih produktov, ki pa pod normalnimi pogoji shranjevanja ne nastajajo (29). ZU in FO sta med stresnim testiranjem izpostavljeni različnim pogojem, ki so predstavljeni na sliki 4.



Slika 4: Stresno testiranje ZU in FO, * - predlagano le za nekatere ZU oz. FO, povzeto po (29) (36)

Simulirani pogoji zajemajo temperaturo, ki za 10, 20, 30 °C ali več odstopa od temperature uporabljene pri pospešenih testih in 75 % ali višjo relativno vlažnost (37). V primeru raztopin ali suspenzij ZU izpostavimo širokemu spektru pH, kjer bi načeloma lahko potekala reakcija hidrolize. Za simulacijo kislih pogojev se uporabi HCl ali H₂SO₄ v razponu koncentracije 0,1 M – 1 M. Za bazične pogoje se uporabi NaOH (redkeje KOH ali NH₄OH) prav tako v razponu koncentracije 0,1 M – 1 M (38).

V sklopu stresnih testov se vrednoti tudi občutljivost ZU in FO na svetlobo. V tem primeru je ZU lahko v trdnem stanju, raztopini ali suspenziji. Med študijo se ZU shrani v kemijsko inertni, transparentni vsebnik. S predpisanim izborom izvora svetlobe zagotovimo čim boljšo simulacijo sončne svetlobe. Pomembno je, da izvor svetlobe pokriva UV in vidni spekter svetlobe. Predpisan čas izpostavljenosti na vidni svetlobi je približno en mesec pri $1,2 \times 10^6$ lux h, na UV pa približno pet dni pri 200 W h/m² (29) (39).

Za izvajanje testov oksidacije se najpogosteje uporablja 0,3 – 3 % raztopina vodikovega peroksida (H₂O₂). Slabost H₂O₂ je neselektivnost in relativna nepredvidljivost reakcij, saj ZU pogosto razpade do sekundarnih razpadnih produktov, kar ni posnemanje realnih pogojev (24). Alternativa vodikovemu peroksidu so težke kovine (železo (III), baker (II)) in določene azo spojine, ki sprožijo spontano oksidacijo spojin (40). Uporablja se tudi molekularni kisik, s katerim se dosegajo rezultati primerljivi realnim pogojem (29).

Stabilnost ZU je odvisna od njene strukture, ki poleg osnovnega skeleta vsebuje tudi določene funkcionalne skupine. Večina teh skupin vpliva na selektivno delovanje ZU,

zraven tega pa tudi vplivajo na njeno (ne)stabilnost. V nadaljevanju je predstavljen odnos med strukturo in aktivnostjo oz. stabilnostjo ZU.

1.3 RELACIJA STRUKTURA-AKTIVNOST/STABILNOST SPOJINE

Kratika za kvantitativno povezavo med strukturo in aktivnostjo je QSAR (angl. quantitative structure-activity relationship). QSAR je uporaben na več področjih, ki so predstavljena v nadaljevanju (41).

1.3.1 QSAR

Za ugotavljanje QSAR se uporabljajo kompleksni računalniški modeli. Ugodno je, če je za ugotavljanje QSAR na voljo čim večje število strukturno podobnih spojin, saj imamo na tak način večje število podatkov za ugotavljanje korelacije. Poznavanje QSAR modelov ima širok spekter uporabnosti.

Uporablja se na različnih področjih:

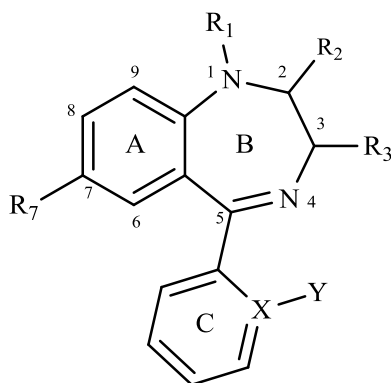
- Identifikacija novih spojin vodnic z določenimi lastnostmi.
- Optimizacija farmakoloških lastnosti spojin.
- Predvidevanje toksičnosti spojin.
- Napovedovanje fizikalno-kemijskih lastnosti spojin.
- Napovedovanje farmakokinetičnih lastnosti ZU.
- Napovedovanje stabilnosti spojin.

Z razvojem računalniških programov se vedno hitreje razvijajo tudi modeli QSAR, ki pridobivajo na uporabnosti (42). V nadaljevanju je predstavljeno osnovnejše področje QSAR BD – povezava med strukturo in aktivnostjo BD (SAR, angl. structure-activity relationship).

1.3.1.1 SAR BENZODIAZEPINOV

Na sliki 5 je osnovna struktura 1,4-benzodiazepinov. Obroči A, B in C so nujni za vezavo BD na receptor GABA_A. Obroč A je pomemben zaradi interakcij π - π na vezavnem mestu. Elektron privlačna skupina na mestu R₇ (običajno skupini -Cl ali -NO₂) prispeva k višji afiniteti do receptorja. Potencialni substituenti na mestih 6, 8 ali 9 bi zmanjšali afiniteto molekule do receptorja. Obroč C prispeva k vezavi na receptor s hidrofobnimi

interakcijami. Mesto Y je lahko nesubstituirano, pogosto pa so prisotni halogeni (–Cl ali –F), ki povečajo afiniteto do receptorja. Substituenti na ostalih mestih obroča C zmanjšajo aktivnost BD. Obroč B je nujen za optimalno delovanje. Niti skupina =O na mestu R₂ in substituenti R₁ niso nujni za vezavo na receptor. Na mestu R₁ so običajno –H, –CH₃ ali manjše alkilne skupine. Mesto R₃ je lahko nesubstituirano, ali pa je prisotna skupina –OH. Substituenti na mestih R₁, R₃ in R₇ vplivajo tudi na farmakokinetične lastnosti BD (5) (43).



Slika 5: Struktura 1,4-benzodiazepina z oštevilčenimi mesti, povzeto po (5)

Vpliv funkcionalnih skupin na reaktivnost in stabilnost molekul so proučevali že v 30. letih 20. stoletja. Na tem področju organske kemije sta kemika Louis Plack Hammett in Robert W. Taft naredila velik korak naprej (44). V povezavi z njunimi raziskavami so odkrili več substituentnih in reakcijskih parametrov, ki pripomorejo k razumevanju vpliva strukture na kemijsko aktivnost (45).

1.3.2 Hammettova enačba in njen pomen

Začetne korelacije med strukturo in reaktivnostjo molekule so izvedli na reakcijah *meta*- ali *para*- substituiranih derivatov benzena. Hammett je študije izvajal na substituiranih derivatih benzojske kisline, kjer je kot osnovno reakcijo izbral ionizacijo nesubstituirane benzojske kisline pri 25 °C. Z osnovno reakcijo se potem primerjajo reakcije substituiranih molekul (v tem primeru substituiranimi derivati benzojske kisline). Enačba 2 prikazuje osnovno obliko Hammettove enačbe.

$$\log k = \log k^{\circ} + \rho\sigma \quad (\text{enačba 2})$$

Pri tem je k konstanta hitrosti reakcije *meta*- ali *para*- substituiranega derivata benzena. k° predstavlja konstanto hitrosti osnovne reakcije (nesubstituirane molekule). σ predstavlja

konstanto substituenta, ki opisuje polarni (elektronski) efekt zamenjave –H z določenim substituentom na *meta*- ali *para*- mestu in je neodvisna od vrste reakcije. Reakcijska konstanta ρ je odvisna od vrste reakcije (vplivajo spremenljivke kot sta temperatura in vrsta topila) in predstavlja dovzetnost reakcije na vpliv polarnosti.

Hammett je ugotovil, da močno elektron privlačne skupine na mestih *meta*- ali *para*- močno stabilizirajo skupino –COO^- ionizirane benzojske kisline. Obratno delujejo elektron donorske skupine (45) (46).

Ta pristop ima določene omejitve, saj vplivi nekaterih skupin na mestih *meta*- in *para*- niso definirani. Prav tako niso definirani vplivi na mestu *orto*-. Zaradi tega so z različnimi modifikacijami enačbe vpeljali vpliv resonančnega efekta in steričnih vplivov funkcionalnih skupin na mestu *orto*-.

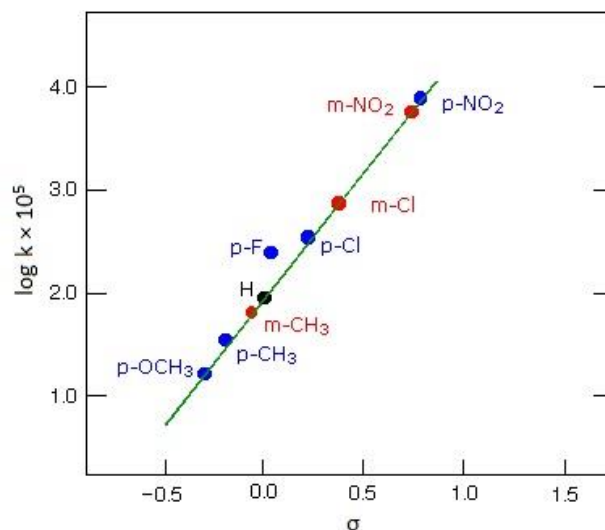
1.3.3 Taftova enačba in njen pomen

Pojavi steričnih efektov, polarnih efektov v alifatskih sistemih in *orto*- substituirani aromatski sistemi so predstavljali izzive v korelacijski analizi. Leta 1952 je R. W. Taft razvil postopek s katerim je lahko ločil polarne, sterične in resonančne efekte. Študija je zajemala bazično in kislinsko hidrolizo estrov. Enačba 3 predstavlja osnovno obliko Taftove enačbe.

$$\log(k/k^\circ) = \rho^* \sigma^* + \delta E_s \quad (\text{enačba 3})$$

Pri tem predstavlja $\log(k/k^\circ)$ razmerje hitrosti substituirane reakcije in osnovne reakcije, ρ^* predstavlja dovzetnost reakcije na vpliv polarnosti, σ^* predstavlja polarno konstanto substituenta, ki opisuje induktivni efekt, E_s je sterična konstanta substituenta, δ pa je dejavnik občutljivosti reakcije na sterične efekte (45).

Na sliki 6 je predstavljen odnos med konstantami hitrosti reakcij ($\log k$) hidrolize estrov benzojske kisline in prispevki posameznih funkcionalnih skupin (σ) na mestih *meta*- in *para*-.



Slika 6: Hitrost reakcije hidrolize estrov v odvisnosti od σ , povzeto po (47)

Iz slike 6 je razvidno, da močno elektron privlačne skupine ($-\text{NO}_2$, $-\text{Cl}$, $-\text{F}$) na mestih *meta*- in *para*- v estrih benzojskih kislin povečajo obseg reakcije hidrolize, saj zmanjšajo elektronsko gostoto na karbonilnem atomu C, ki postane dovzetnejši za nukleofilni napad. Nasprotno delujejo elektron donorske skupine ($-\text{CH}_3$, $-\text{OCH}_3$) (46). Linearna povezava med prispevki funkcionalnih skupin in konstantami hitrosti reakcij je najverjetneje posledica definiranosti vseh prispevkov funkcionalnih skupin, ki dejansko vplivajo na potek reakcije hidrolize.

2 NAMEN DELA

V sklopu magistrskega dela bomo preverili ali obstaja povezava med stabilnostjo in strukturo enajstih strukturno podobnih BD. Študija bo potekala po naslednjih korakih:

1) Razvili in optimizirali bomo metodo HPLC z UV detekcijo za sočasno kvantitativno vrednotenje izbranih BD in njihovih pripadajočih razpadnih produktov (BF). Nato bomo v skladu s smernicami ICH ovrednotili metodo z naslednjimi parametri: selektivnostjo, linearnostjo, ponovljivostjo, točnostjo in robustnostjo.

2) Za posamezne BD v raztopinah bomo izvedli stresne teste stabilnosti. Pogoji, ki jim bodo izpostavljeni med stabilnostjo študijo:

- Temperatura: 4, 25 in 40 °C.
- Koncentracija raztopin NaOH: 0,1, 0,2, 0,5 in 1 M.
- Koncentracija raztopin HCl: 0,1, 0,2, 0,5 in 1 M.

Raztopinam bomo izmerili odzive na napravi HPLC z razvito metodo ob naslednjih časovnih točkah: $t = 0, 1, 2, 3, 7$ in 14 dni.

3) Za namene kvantitativnega vrednotenja stabilnosti bomo najprej ugotovili red reakcije razpada BD in nato določili ustrezne konstante reakcijske hitrosti.

4) Ovrednotili bomo vpliv temperature in pH na obstojnost BD. Preverili bomo tudi, če obstaja linearna povezava med temperaturo oziroma pH in eksperimentalno ugotovljenimi konstantami razpada BD.

5) Na osnovi ugotovljenih konstant hitrosti razpada bomo vrednotili vpliv določenih funkcionalnih skupin na stabilnost BD. V to analizo bomo vključili BD, ki se razlikujejo le v eni funkcionalni skupini. S Hammettovo in Taftovo metodologijo bomo nato preverili ali obstaja korelacija med prispevki posameznih funkcionalnih skupin BD in njihovimi konstantami hitrosti razpada.

6) Ocenili bomo mehanizem razpada BD. V analizo bomo vključili 6 BD, za katere imamo na razpolago pripadajoče standarde razpadnih produktov (BF).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Spojine

- Diazepam, $C_{16}H_{13}ClN_2O$, $M = 284,74 \text{ g/mol}$, $\geq 98 \%$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Nordiazepam, $C_{15}H_{11}ClN_2O$, $M = 270,71 \text{ g/mol}$, $\geq 98 \%$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Lorazepam, $C_{15}H_{10}Cl_2N_2O_2$, $M = 321,16 \text{ g/mol}$, $\geq 98 \%$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Oksazepam, $C_{15}H_{11}ClN_2O_2$, $M = 286,17 \text{ g/mol}$, $\geq 98 \%$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Nitrazepam, $C_{15}H_{11}N_3O_3$, $M = 281,27 \text{ g/mol}$, $\geq 98 \%$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Bromazepam, $C_{14}H_{10}BrN_3O$, $M = 316,15 \text{ g/mol}$, $\geq 98 \%$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Pinazepam, $C_{18}H_{13}ClN_2O$, $M = 308,80 \text{ g/mol}$ (donacija farmacevtske industrije)
- Flunitrazepam, $C_{16}H_{12}FN_3O_3$, $M = 313,28 \text{ g/mol}$, $\geq 98 \%$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Nimetazepam, $C_{16}H_{13}N_3O_3$, $M = 295,29 \text{ g/mol}$, $\geq 98 \%$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Medazepam, $C_{16}H_{15}ClN_2$, $M = 270,80 \text{ g/mol}$ (donacija farmacevtske industrije)
- Klonazepam, $C_{15}H_{10}ClN_3O_3$, $M = 315,71 \text{ g/mol}$, $\geq 98 \%$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Benzofenon diazepama, 5-kloro-2-(metilamino)benzofenon, $M = 245,70 \text{ g/mol}$, $\geq 99 \%$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Benzofenon nordiazepama, 2-amino-5-klorobenzofenon, $M = 231,68 \text{ g/mol}$, $\geq 98 \%$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Benzofenon lorazepama, 2-amino-5,2'-diklorobenzofenon, $M = 267,13 \text{ g/mol}$, $\geq 84 \%$ (pridobljen v sklopu Diplomске naloge (12))
- Benzofenon nitrazepama, 2-amino-5-nitrobenzofenon, $M = 242,23 \text{ g/mol}$, $\geq 98 \%$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Benzofenon bromazepama, (2-amino-5-bromofenil)(2-piridil)metanon, $M = 277,12 \text{ g/mol}$, $\geq 98,6 \%$ (pridobljen v sklopu Diplomске naloge (12))
- Benzofenon klonazepama, 2-amino-2'-kloro-5-nitrobenzofenon, $M = 276,68 \text{ g/mol}$, $\geq 99,4 \%$ (pridobljen v sklopu Diplomске naloge (12))

3.1.2 Reagenti in topila

- Acetonitril (ACN), C_2H_2N , $M = 41,05 \text{ g/mol}$, HPLC grade (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Fosforjeva(V) kislina, H_3PO_4 , $M = 98,00 \text{ g/mol}$, 85 % (Merck, Nemčija)
- Kalijev dihidrogenfosfat, KH_2PO_4 , $M = 136,08 \text{ g/mol}$, $\geq 99,5 \%$ (Merck, Nemčija)
- Klorovodikova kislina, HCl , $M = 36,46 \text{ g/mol}$, Titrisol[®] za pripravo 1 M raztopine (Merck, Nemčija)
- Metanol, CH_3OH , $M = 32,04 \text{ g/mol}$, HPLC grade (Sigma-Aldrich, Nemčija).
- MiliQ voda, Fakulteta za farmacijo
- Natrijev hidroksid, $NaOH$, $M = 40,00 \text{ g/mol}$, Titrisol[®] za pripravo 1 M raztopine (Merck, Nemčija)
- Prečiščena voda, Fakulteta za farmacijo

3.1.3 Naprave in pribor

- Analitska tehtnica Excellence Plus AG 245 (Mettler Toledo, Švica)
- Avtomatske pipete 20-200 μL , 100-1000 μL (Eppendorf, Nemčija)
- Hladilnik (Gorenje, Slovenija)
- Klimatska komora VC 4034 (Vötsch, Nemčija)
- Kolona Synergi Hydro $250 \times 4,60 \text{ mm}$, 4 μm (Phenomenex, ZDA)
- Kolona Kinetex XB-C18 $150 \times 4,60 \text{ mm}$, 5 μm (Phenomenex, ZDA)
- pH meter MP 220 basic (Mettler Toledo, Švica)
- Sistem za pripravo MiliQ vode A10 Advantage (Millipore Corporation, ZDA)
- Stekleni in ostali inventar (merilne bučke, čaše, viala, zamaški, epice, nastavki za pipete, spatule, Parafilm[®]M)
- Ultrazvočna kadička Sonis 4 (Iskra Pio, Slovenija)
- HPLC sistem 1100 (Agilent Technologies, ZDA)
 - o Kvarterna črpalka
 - o Avtomatski vzorčevalnik
 - o Termostat za kolono
 - o UV – VIS detektor
 - o ChemStation programska oprema

3.2 METODE

3.2.1 Razvoj in optimizacija analizne metode

V preglednici VIII so navedene pomembnejše metode, ki so nam služile za razvoj in optimizacijo končne metode. Volumen injiciranja (10 µL), opazovana valovna dolžina (220 nm) in pretok mobilne faze (1 mL/min) so bili pri vseh metodah enaki.

Preglednica VIII: Metode in kromatografski pogoji tekom razvoja metode

Metoda	Kolona	Gradientni program (delež ACN)	Vodni del MF	T _{kolone} (°C)
0	Luna C18	0-7 min: 50% ; 7- 20 min: 50- 62% ; 20-25 min: 62-95%	5 mM amonijev acetat, pH=3,8	25
1	Synergi Hydro	0-7 min: 50% ; 7-20 min: 50-62% ; 20-25 min: 62-95%	voda	40
2	Synergi Hydro	0-7 min: 40% ; 7-20 min: 40-62% ; 20-25 min: 62-95%	voda	40
3	Synergi Hydro	0-10 min: 40% ; 7-20 min: 40-50% ; 20-25 min: 50-95%	voda	40
4	Synergi Hydro	0-10 min: 40% ; 7-20 min: 40-50% ; 20-25 min: 50-95%	0,1 % H ₃ PO ₄	40
5	Kinetex XB-C18	0-10 min: 40% ; 10-17 min: 40-45% ; 17-20 min: 45-70% ; 20-25 min: 70-95%	0,1 % H ₃ PO ₄	40
6	Kinetex XB-C18	0-10 min: 30% ; 10-20 min: 30-40% ; 20-25 min: 40-95%	0,1 % H ₃ PO ₄	40
7	Kinetex XB-C18	0-10 min: 30% ; 10-15 min: 30-40% ; 15-20 min: 40-95%	0,1 % H ₃ PO ₄	40
8	Kinetex XB-C18	0-10 min: 30% ; 10-15 min: 30-40% ; 15-25 min: 40-95%	0,1 % H ₃ PO ₄	40
9	Kinetex XB-C18	0-15 min: 35% ; 15-20 min: 35-95%	0,1 % H ₃ PO ₄	40
10	Kinetex XB-C18	0-20 min: 30% ; 20-25 min: 30-90%	0,1 % H ₃ PO ₄	40
11	Kinetex XB-C18	0-20 min: 25% ; 20-25 min: 25-90%	0,1 % H ₃ PO ₄	40
12	Kinetex XB-C18	0-10 min: 25% ; 10-15 min: 25-45% ; 15-25 min: 45-95%	0,1 % H ₃ PO ₄	40
13	Kinetex XB-C18	0-10 min: 35% ; 10-15 min: 35-55% ; 15-20 min: 55-95%	0,1 % H ₃ PO ₄	40
14	Kinetex XB-C18	0-15 min: 33% ; 15-20 min: 33-95%	0,1 % H ₃ PO ₄	40
15	Kinetex XB-C18	0-15 min: 31% ; 15-20 min: 31-95%	0,1 % H ₃ PO ₄	40
16	Kinetex XB-C18	0-8 min: 33% ; 8-18 min: 33-76% ; 18-20 min: 76-95%	0,1 % H ₃ PO ₄	40
17	Kinetex XB-C18	0-9 min: 33% ; 9-19 min: 33-76% ; 19-20 min: 76-95%	0,1 % H ₃ PO ₄	40

Metoda	Kolona	Gradientni program (delež ACN)	Vodni del MF	T _{kolone} (°C)
18	Kinetex XB-C18	0-10 min: 33% ; 10-20 min: 33-76% ; 20-25 min: 76-95%	0,1 % H ₃ PO ₄	30
19	Kinetex XB-C18	0-10 min: 33% ; 10-20 min: 33-76% ; 20-25 min: 76-95%	0,1 % H ₃ PO ₄	35
20	Kinetex XB-C18	0-10 min: 33% ; 10-20 min: 33-76% ; 20-25 min: 76-95%	0,1 % H ₃ PO ₄	40
21	Kinetex XB-C18	0-10 min: 33% ; 10-17 min: 33-76%	0,1 % H ₃ PO ₄	40

Končni kromatografski pogoji HPLC za vrednotenje BD (Metoda 21, preglednica VIII):

- Kolona: Kinetex XB-C18 150 × 4,6 mm, 5 µm
- Gradientni program (delež ACN): 0-10 min: 33 % ; 10-17 min: 33-76 %. Vodni del mobilne faze (MF) je 0,1 % H₃PO₄
- Pretok MF: 1mL/min
- Temperatura kolone: 40 °C
- Valovna dolžina detekcije: 220 nm
- Volumen injiciranja: 10 µL
- Čas analize: 17 min
- Temperatura avtomatskega vzorčevalnika: 25 °C

3.2.2 Priprava vzorcev za razvoj in optimizacijo ter validacijo metode

3.2.2.1 RAZVOJ IN OPTIMIZACIJA ANALIZNE METODE

3.2.2.1.1 Priprava osnovnih raztopin BD in BF

Natehtali smo po 1 mg vsakega BD oz. BF, ga kvantitativno prenesli v 2 mL epico in raztopili v 1 mL metanola. Tako smo dobili osnovne raztopine s koncentracijo 1 mg/mL.

3.2.2.1.2 Priprava raztopin BD in BF za posamezno injiciranje

Raztopine za posamezno injiciranje smo pripravili z 10-kratnim redčenjem osnovnih raztopin (3.2.2.1.1) direktno v vialo. Kot topilo smo uporabili zmes metanol:voda = 1:1 (v/v). Tako smo dobili raztopine posameznih analitov s koncentracijo 0,1 mg/mL.

3.2.2.1.3 Priprava raztopine zmesi BD in BF

Raztopino zmesi BD in BF smo pripravili tako, da smo z avtomatsko pipeto odmerili 40 μL osnovne raztopine (3.2.2.1.1) enajstih različnih BD in šestih različnih BF direktno v vialo. Tako smo dobili zmes osnovnih raztopin z volumnom 680 μL . Nato smo zmes redčili z istim volumnom vode MiliQ do končnega volumna zmesi 1360 μL . Tako je bila koncentracija vsakega BD oz. BF v zmesi 29 mg/L.

3.2.2.1.4 Priprava 0,1 % H_3PO_4

0,1 % H_3PO_4 , ki nam je služila kot vodni del MF, smo pripravili tako, da smo v 1 L bučo z avtomatsko pipeto odmerili 1,176 mL 85 % H_3PO_4 in z vodo MiliQ dopolnili do oznake. Raztopino smo umerili na pH 2,3 s postopnim dodajanjem 85 % H_3PO_4 . Pripravljeno raztopino smo za 15 min postavili v ultrazvočno kadičko, da smo se znebili odvečnih plinov.

3.2.2.2 VALIDACIJA ANALIZNE METODE

3.2.2.2.1 Priprava pufra

50 mM pufer KH_2PO_4 smo pripravili tako, da smo natehtali 6,8 g KH_2PO_4 , ga kvantitativno prenesli v 1 L bučo in z vodo MiliQ dopolnili do oznake. Nato smo raztopino umerili na pH 7,0 z 1 M NaOH. Pufer smo uporabili za pripravo kalibracijskih in kontrolnih raztopin za validacijo metode in pri pripravi vzorcev za študijo stabilnosti.

3.2.2.2.2 Priprava osnovne raztopine za umeritveno premico (200 %)

Osnovno raztopino s koncentracijo posameznega analita 40 mg/L smo pripravili iz osnovnih raztopin BD tako, da smo z avtomatsko pipeto odmerili 200 μL osnovne raztopine vsakega od BD (3.2.2.1.1) v 5 mL epico in s pufrom dopolnili do 5 mL. Raztopina je 200 % glede na raztopine, ki smo jih uporabili v študiji stabilnosti (20 mg/L).

3.2.2.2.3 Priprava kalibracijskih in kontrolnih raztopin

Enajst kalibracijskih raztopin različnih koncentracij smo pripravili tako, da smo izhajali iz osnovne 200 % raztopine (3.2.2.2.2), ki smo jo ustrezno redčili s pufrom. Na enak način smo pripravili tudi kontrolne raztopine QCh, QCm in QCl, ki so nam služile za izračun ponovljivosti, točnosti in robustnosti analizne metode. Priprava raztopin je predstavljena v preglednici IX.

Preglednica IX: Postopek priprave kalibracijskih raztopin za umeritveno premico in kontrolnih raztopin

Raztopina [%]	C [mg/L]	Volumen 200 % raztopine [μ L]	Volumen pufra [μ L]
200	40	800	0
150	30	600	200
125	25	500	300
100	20	400	400
80 (QCh)	16	320	480
75	15	300	500
50	10	200	600
40 (QCm)	8	160	640
25	5	100	700
10	2	40	760
8 (QCl)	1,6	32	768
5	1	20	780
2,5	0,5	10	790
1	0,2	4	796

3.2.3 Validacija analizne metode

Validacija je postopek s katerim potrdimo, da je analizna metoda primerna in zanesljiva za predvideno analitsko uporabo. S pomočjo določenih statističnih parametrov lahko ovrednotimo ustreznost in zanesljivost rezultatov analize vzorcev z razvito analizno metodo. Za vrednotenje analizne metode smo uporabili smernice ICH za validacijo analiznih metod (48), obseg validacije pa je odvisen od izbrane analizne metode. Validacijo izvedemo delno ali v celoti ob vsaki spremembi analizne metode. V okviru našega dela smo ovrednotili naslednje parametre: selektivnost, linearnost, ponovljivost, točnost in robustnost (stabilnost v raztopini) metode.

3.2.3.1 SELEKTIVNOST

Selektivnost analizne metode zagotavlja pravilno in specifično vrednotenje izbrane spojine v prisotnosti ostalih komponent, ki jih lahko med študijo pričakujemo v vzorcu (nečistoče v vzorcu, razpadni produkti, ...). Mi smo selektivnost preverili z injiciranjem raztopin NaOH in HCl, ki smo ju uporabili v stresnih vzorcih in injiciranjem metanola, ki nam je služil kot topilo. S tem smo hoteli ugotoviti njihovo interferenco na retencijski čas (t_r) posameznih analitov. Selektivnost smo dodatno preverjali med stresno študijo, ko smo preverjali ali so vrhovi analitov in njihovih razpadnih produktov med seboj ustrezno ločeni.

3.2.3.2 LINEARNOST

Linearnost analizne metode je sposobnost, da v določenem območju zagotavlja rezultate, ki so premo sorazmerni koncentraciji (vsebnosti) analita v vzorcu. Linearnost smo preverili z injiciranjem enajstih raztopin v koncentracijskem območju 0,2 – 40 mg/L (preglednica IX). Z metodo najmanjših kvadratov smo izdelali umeritvene premice, izračunali pripadajoče enačbe umeritvenih premic in determinacijske koeficiente (R^2). Za mejo sprejemljivosti smo postavili $R^2 \geq 0,99$.

3.2.3.3 PONOVLJIVOST

Ponovljivost analizne metode spada v sklop natančnosti, ki pomeni razpršenost meritev pod istimi analiznimi pogoji. Za vrednotenje ponovljivosti smo pripravili po šest kontrolnih raztopin QCh, QCm in QCl (preglednica IX) in jih injicirali. Izračunali smo standardni odklon (SD) in relativni standardni odklon (RSD) meritev posameznih raztopin QCh, QCm in QCl. Kot rezultat ponovljivosti smo podali tudi povprečen RSD posameznih kontrolnih raztopin RSD s pripadajočim SD. Kot sprejemljivo mejo smo postavili $RSD \leq 5\%$.

3.2.3.4 TOČNOST

Točnost je merilo ujemanja eksperimentalnih rezultatov s pravo vrednostjo. Točnost metode smo izračunali na istih kontrolnih raztopinah kot v poglavju 3.2.3.3. Da smo lahko opredelili točnost, smo najprej izračunali koncentracije posameznih BD na osnovi odzivov kontrolnih raztopin iz umeritvenih premic. Pri tem smo uporabili enačbo 4.

$$C_i = \frac{(\bar{x}-a)}{k} \quad (\text{enačba 4})$$

Pri tem je C_i izračunana koncentracija kontrolnih raztopin QC, $\bar{x}$ povprečna vrednost šestih odzivov raztopin QC, a vrednost, kjer umeritvena premica seka ordinatno os in k naklon umeritvene premice.

Nato smo izračunali % odstopanja izračunane koncentracije od prave vrednosti z enačbo 5.

$$\% \text{ odstopanja} = \frac{(C_i)}{C} \times 100 \quad (\text{enačba 5})$$

Pri tem je C_i izračunana koncentracija kontrolnih raztopin QC in C dejanska vrednost koncentracije raztopin QC.

Rezultat smo podali kot ujemanje med izračunanimi in dejanskimi koncentracijami izraženimi v odstotkih. Podali smo tudi razpon točnosti, kjer sta skrajni vrednosti največja odstopa med ujemanjem izračunanih in dejanskih koncentracij kalibracijskih raztopin QCl, QCm in QCh. Ujemanje naj bo v območju med 90 in 110 %.

3.2.3.5 ROBUSTNOST

Robustnost analizne metode zagotavlja, da metoda ostane nespremenjena kljub majhnim, ampak pomembnim spremembam določenih parametrov analizne metode. V sklopu robustnosti smo preverjali stabilnost v raztopini. Pripravili smo vzorce QCh, QCm in QCl (preglednica IX) in jih ponovno analizirali po enem in po dveh dneh shranjenih pri 25 °C ter izračunali upad koncentracije analitov glede na vrednost ob času 0. Za mejo sprejemljivosti smo določili maksimalni upad začetne koncentracije za 10 %.

3.2.4 Priprava vzorcev za študijo stabilnosti

3.2.4.1 Priprava 0,5, 0,2 in 0,1 M raztopine NaOH

Za pripravo 0,5, 0,2 in 0,1 M raztopin NaOH smo izhajali iz 1M raztopine NaOH (Titrisol®), ki je bila že pripravljena na Fakulteti za farmacijo. Raztopine smo pripravili v 100 mL bučke. Priprava raztopin je opisana v preglednici X.

Preglednica X: Priprava 0,5, 0,2 in 0,1 M raztopin NaOH

Raztopina [M]	Volumen 1 M NaOH [mL]	Volumen prečiščene vode [mL]
0,5	50	50
0,2	20	80
0,1	10	90

3.2.4.2 Priprava 0,5, 0,2 in 0,1 M raztopine HCl

Za pripravo 0,5, 0,2 in 0,1 M raztopin HCl smo izhajali iz 1M raztopine HCl (Titrisol®), ki je bila že pripravljena na Fakulteti za farmacijo. Raztopine smo pripravili v 100 mL bučke. Priprava raztopin je opisana v preglednici XI.

Preglednica XI: Priprava 0,5, 0,2 in 0,1 M raztopin HCl

Raztopina [M]	Volumen 1 M HCl [mL]	Volumen prečiščene vode [mL]
0,5	50	50
0,2	20	80
0,1	10	90

3.2.4.3 Priprava raztopin za študijo stabilnosti

Raztopine posameznih BD za študijo stabilnosti smo pripravili tako, da smo v vialo odmerili 100 μL osnovne raztopine BD koncentracije 1 mg/mL (3.2.1.1) in dodali 900 μL NaOH oz HCl koncentracij 1, 0,5, 0,2 in 0,1 M (preglednica X in XI). Raztopine za študijo stabilnosti smo za 14 dni izpostavili temperaturam 4, 25 in 40 $^{\circ}\text{C}$. Vzorčili smo ob času 0, 1, 2, 3, 7 in 14 dni. V vsaki časovni točki smo izvedli analizo vzorčnih raztopin z metodo HPLC. Vzorčne raztopine smo pripravili tik pred analizo tako, da smo z avtomatsko pipeto odmerili 100 μL raztopine za stabilnostno študijo v vialo in dodali 400 μL pufru.

3.2.5 Obdelava podatkov

Podatke iz študije stabilnosti in podatke za validacijo metode smo obdelali s pomočjo programske opreme Excel. V tem programu smo v sklopu validacije narisali umeritvene premice, izračunali SD, RSD in R^2 , v sklopu študije stabilnosti pa smo določili red reakcije razpada BD, izračunali upad koncentracije BD po določenem času in konstante hitrosti razpada. Enačbe 6, 7 in 8 predstavljajo enačbe ničtega, prvega in drugega reda reakcije, ki so nam bile v pomoč pri izračunu konstant hitrosti razpada BD.

$$C = C_0 - kt \quad (\text{enačba 6})$$

$$\ln C = \ln C_0 - kt \quad (\text{enačba 7})$$

$$\frac{1}{C} = \frac{1}{C_0} + kt \quad (\text{enačba 8})$$

Pri tem je C koncentracija BD ob času t, C_0 začetna koncentracija BD, k pa konstanta hitrosti razpada BD ustreznega reda reakcije.

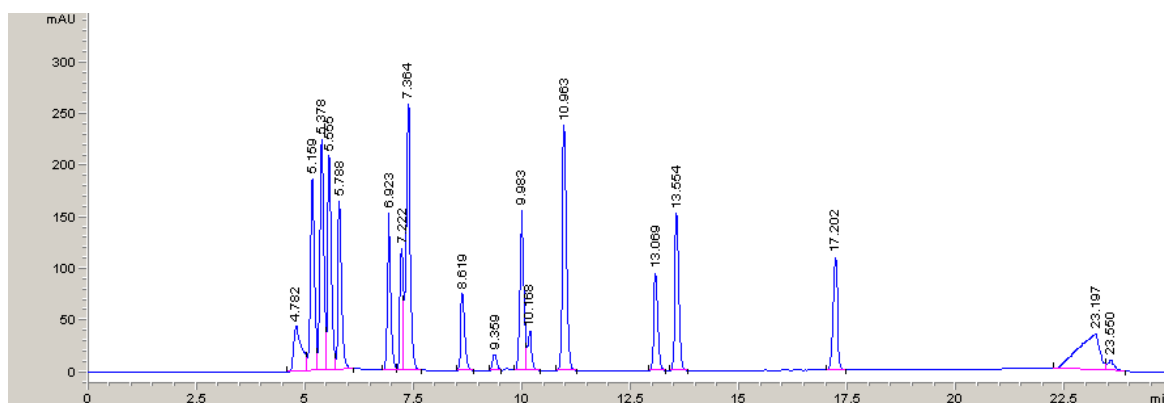
4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Naš osnovni cilj je bil raziskati stabilnost strukturno podobnih učinkovin – BD. V ta namen smo razvili in validirali metodo HPLC s katero smo lahko ustrezno in v čim krajšem času ločili 11 BD (podrobneje opisani v poglavju 3.1.1). Zaradi kasnejše stabilnostne študije BD smo v razvoj metode vključili tudi najpomembnejše pripadajoče razpadne produkte posameznih BD.

4.1 RAZVOJ IN VALIDACIJA ANALIZNE METODE

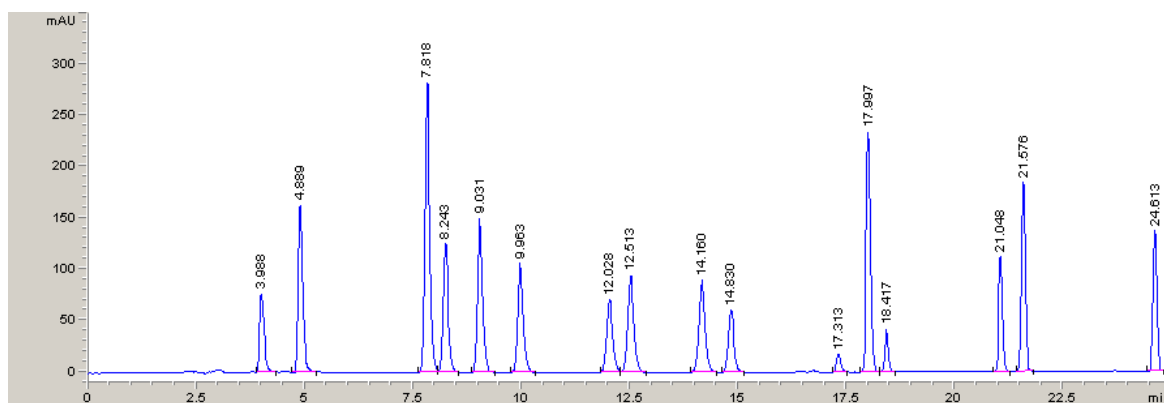
4.1.1 Razvoj metode HPLC

Izhodiščno metodo smo povzeli po literaturi (12) (metoda 0, preglednica VIII). V primerjavi s to metodo, ki je bila namenjena analizi 4 BD (DIA, LOR, KLO, BRO), smo v okviru našega dela ločevali večje število BD in njihovih razpadnih produktov. Zaradi tega smo že v izhodišču kolono Luna C-18 $250 \times 4,60$ mm zamenjali s kolono Synergi Hydro $250 \times 4,60$ mm (metoda 1, preglednica VIII). Kolona Synergi Hydro je namreč bolj primerna za ločevanje analitov s širokim razponom polarnosti (49). Z metodo 1 smo analizirali vsak BD in BF posebej, da smo ugotovili posamezne retencijske čase spojin, nato pa še zmes vseh BD in BF. Vrstni red spojin od spojine z najkrajšim t_r do spojine z najdaljšim je bil naslednji: BRO, OKS, LOR, NIT, KLO, FLU, NIM, NOR, BF BRO, BF NIT, DIA, BF KLO, PIN, BF NOR, BF LOR, BF DIA in MED (slika 7). Z metodo 1 se kromatografski vrhovi niso zadovoljivo ločili, gradient pa s kolone ni izpral MED (t_r 23 min).



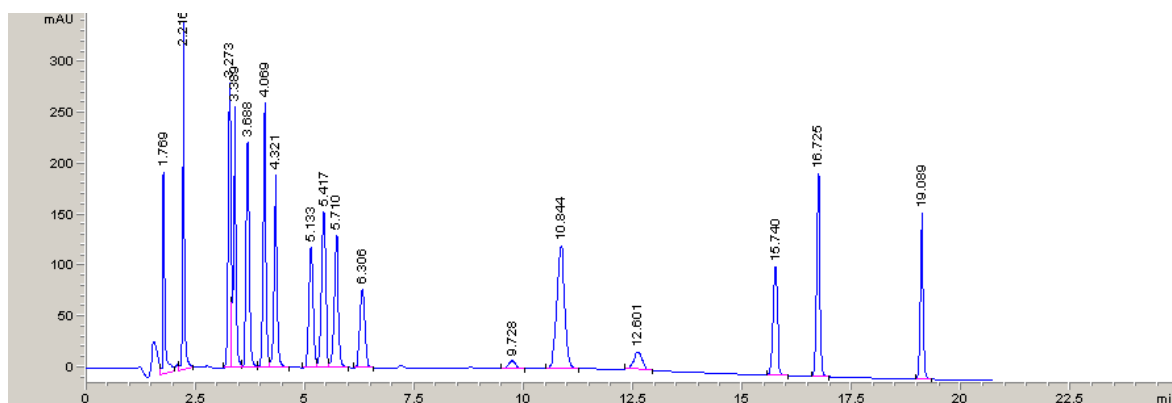
Slika 7: Kromatogram zmesi BD in BF z metodo 1

Nato smo znižali začetni odstotek organskega modifikatorja ACN (metoda 2, preglednica VIII). S tem smo hoteli doseči boljšo ločbo še zlasti začetnih vrhov. Tudi gradient s kolone ni izpral MED. DIA in BF KLO ter FLU, NIM in NOR pa se niso ločili med seboj. V nadaljevanju smo od sedme minute naprej izbrali položnejši gradient ACN (metoda 3, preglednica VIII). S tem smo uspeli ločiti vrhova DIA in BF KLO, vendar sta se v skupni kromatografski vrh še vedno združila NIM in NOR. Zaradi nesimetričnih vrhov in nezadovoljive ločbe spojin smo se v nadaljevanju odločili za zamenjavo vode (vodni del mobilne faze) z 0,1 % raztopino H_3PO_4 (metoda 4, preglednica VIII), saj H_3PO_4 vpliva na ionizacijo spojin, to pa posledično močno vpliva na njihovo retencijo. Ta zamenjava se je izkazala za uspešno, saj smo dobili bolj simetrične vrhove. Iz slike 8 je razvidno bistveno izboljšanje glede na prejšnje metode (slika 7). MED, kot najbolj problematičen analit, se je izpral prvi z lepim kromatografskim vrhom, vendar sta se NIT in NOR združila v tretjem kromatografskem vrhu. Z injiciranjem posameznih BD smo ponovno preverili zaporedje izpiranja, ki je bilo naslednje: MED, BRO, NIT, NOR, OKS, LOR, KLO, NIM, FLU, DIA, BF BRO, BF NIT, PIN, BF KLO, BF NOR, BF LOR in BF DIA.



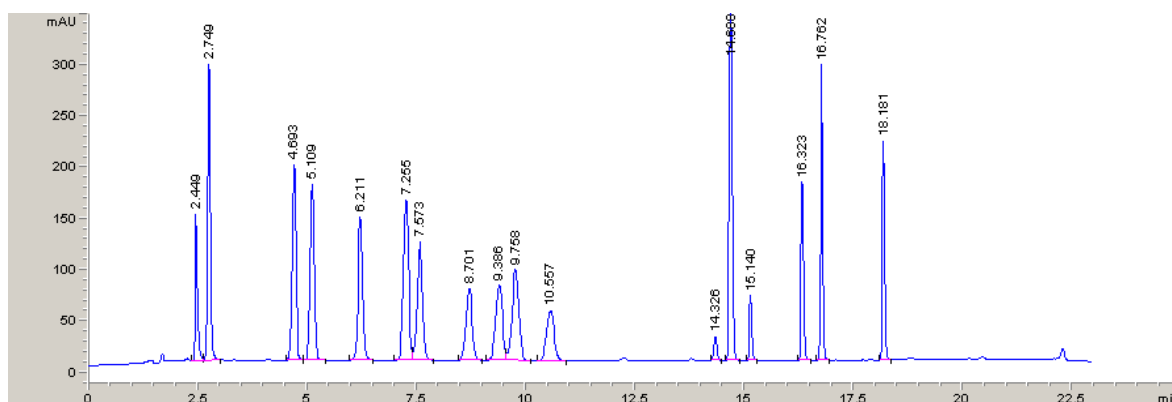
Slika 8: Kromatogram zmesi BD in BF z metodo 4

Metoda 4 je bila dobra osnova, morali pa smo še izboljšati selektivnost. To smo dosegli z zamenjavo kolone Synergi Hydro s kolono Kinetex XB-C18 $150 \times 4,60$ mm. Kolona Kinetex, ki je osnovana na posebni »core shell« tehnologiji, daje ožje in višje kromatografske vrhove, s čimer smo v nadaljevanju želeli vplivati na ločbo problematičnih analitov (49). S to kolono smo dobili naslednji vrstni red spojin: MED, BRO, NOR, NIT, OKS, LOR, KLO, NIM, DIA, FLU, BF BRO, BF NIT, PIN, BF KLO, BF NOR, BF LOR in BF DIA (metoda 5, preglednica VIII).



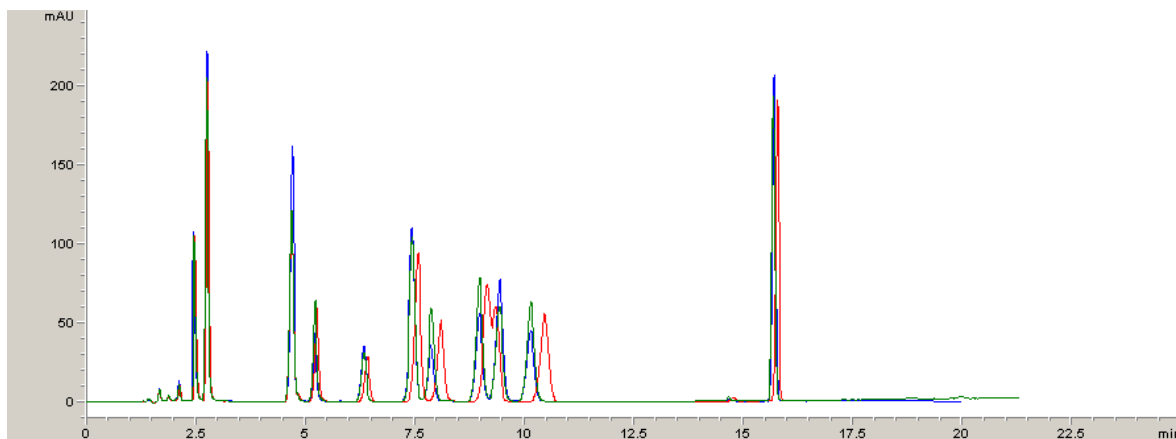
Slika 9: Kromatogram zmesi BD in BF z metodo 5

Dobili smo lepe in ostrejšje vrhove, vendar ločljivost še vedno ni bila zadovoljiva (slika 9). Z različnimi spremembami sestave mobilne faze smo v nadaljevanju hoteli doseči popolno ločitev spojin in skrajšati celotni čas analize. Spreminjali smo začetni delež ACN in gradientni program (metode 6 – 17, preglednica VIII) ter uspeli ločiti vse analite, kar je razvidno na sliki 10.



Slika 10: Kromatogram zmesi BD in BF z metodo 17

Metodo 17 smo nato nekoliko priredili in uporabili le za zmes BD brez BF, saj so nas v osnovi bolj zanimale ZU kot pa njihovi razpadni produkti. Metodo smo še delno modificirali in za končno optimizacijo preverili tudi vpliv temperature na ločljivost in retencijske čase. Čeprav je temperatura dostikrat predlagana kot spremenljivka za spremembo selektivnosti, se ne uporablja pogosto, ker večina preiskovanih spojin izraža enake spremembe ob spremembi temperature. Ob izrazitejših spremembah temperature moramo biti previdni, saj lahko s tem slabo vplivamo na robustnost metode (50). Zato smo v nadaljevanju izvedli analize pri temperaturi kolone 30 °C, 35 °C ter 40 °C (metode 18 – 20, preglednica VIII) (slika 11).



Slika 11: Kromatogram zmesi BD z metodo 18 (rdeča, 30 °C), metodo 19 (zelena, 35 °C) in metodo 20 (modra, 40 °C)

Temperatura 30 °C ni primerna za analizo, ker se osmi in deveti vrh prekrivata. Pri temperaturi 35 °C sicer dobimo boljše rezultate, vendar najboljšo ločljivost dosežemo pri temperaturi 40 °C.

Metodo 20 smo končno optimizirali tako, da smo skrajšali čas analize na 17 minut (metoda 21, preglednica VIII). Metoda 21 (v nadaljevanju analizna metoda) je ustrezna za naš namen, zato smo jo validirali. V nadaljnje delo nismo vključili OKS zaradi pomanjkanja standarda te ZU.

4.1.2 Validacija analizne metode

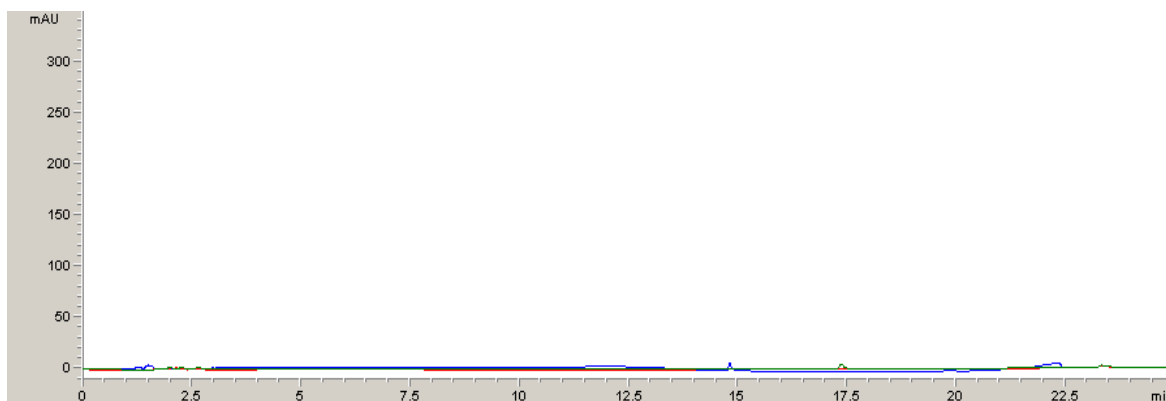
Validacija analizne metode je postopek, s katerim dokažemo, da metoda uspešno služi svojemu namenu. Validirati moramo metode, ki smo jih razvili sami in tudi tiste, katere smo našli v literaturi. Navodila za izvedbo validacije so podana v različnih smernicah.

Validacijo metode 21 smo izvedli v skladu s smernicami ICH (48), preverjali pa smo naslednje validacijske parametre: selektivnost, linearnost, ponovljivost, točnost, mejo določitve in robustnost (stabilnost v raztopini).

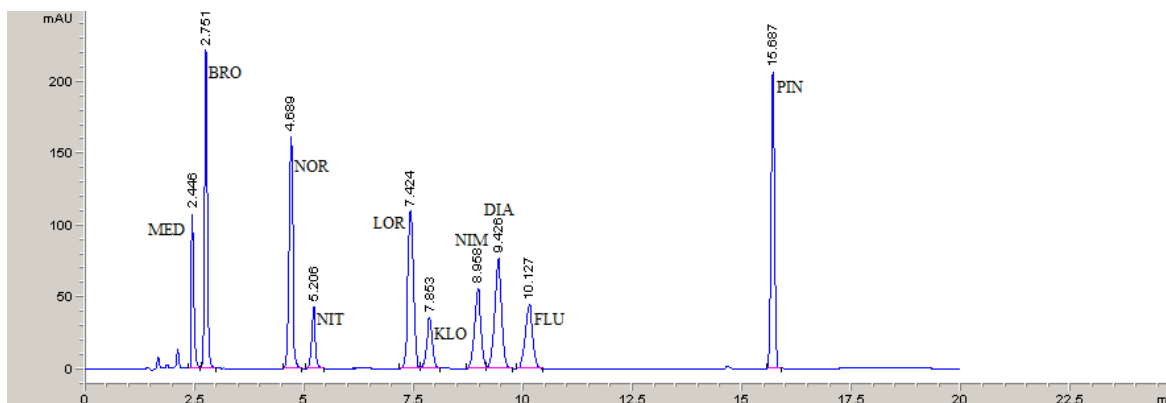
4.1.2.1 SELEKTIVNOST METODE

Selektivnost smo potrdili z injiciranjem raztopin NaOH in HCl, ki smo ju uporabili v stresnih vzorcih in z injiciranjem metanola, ki nam je služil kot topilo. Iz slike 12 je razvidno, da NaOH, HCl in metanol ne izkazujejo interferenc pri t_r posameznih analitov, iz slike 13 pa, da so vrhovi vseh 10 analitov med seboj ustrezno ločeni. Selektivnost metode

smo dodatno potrdili med študijo stabilnosti, saj so bili v vseh vzorcih BD in njihovi razpadni produkti med seboj ustrezno ločeni.



Slika 12: Kromatogram raztopin NaOH (zelena), HCl (rdeča) in metanola (modra)



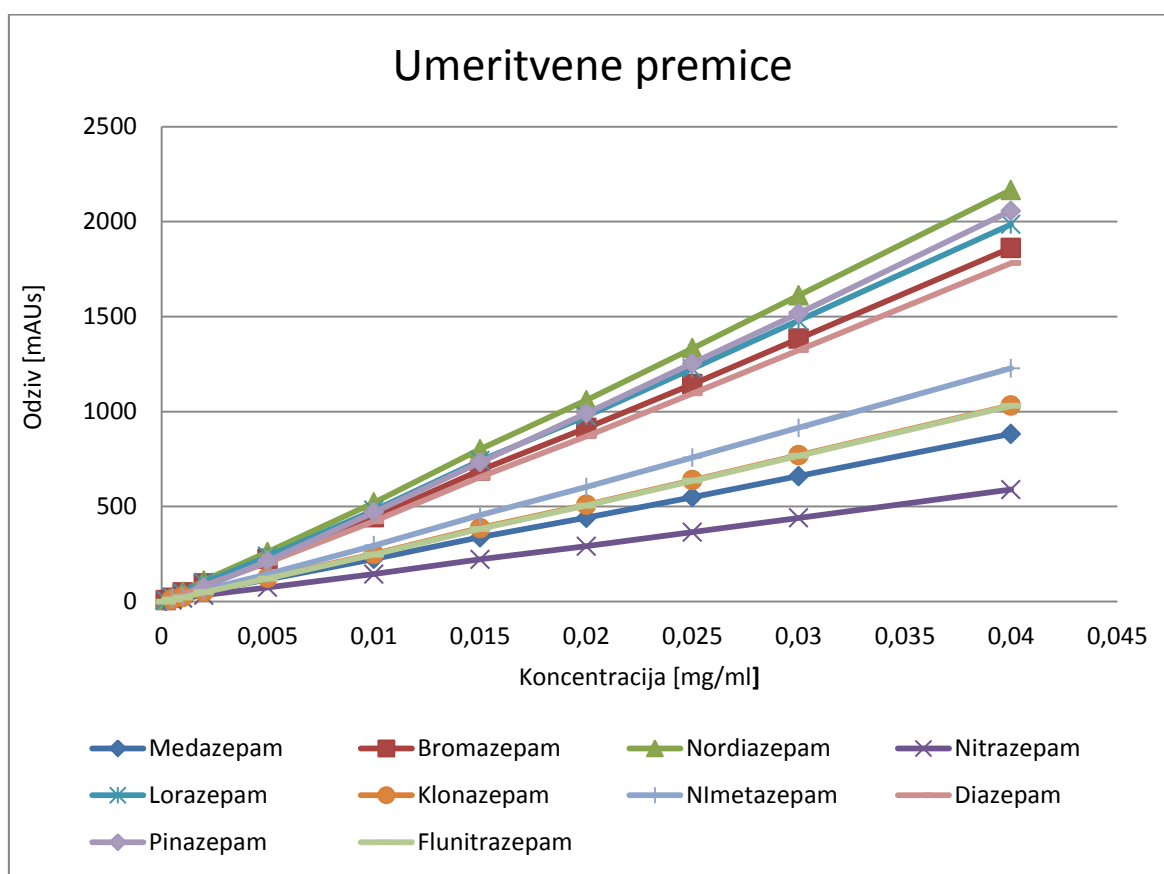
Slika 13: Kromatogram zmesi BD z analizno metodo (kalibracijska raztopina koncentracije 20 mg/L, preglednica IX)

4.1.2.2 LINEARNOST METODE

Linearnost metode smo preverili z injiciranjem kalibracijskih raztopin 11 različnih koncentracij (od 0,2 mg/L do 40 mg/L, preglednica IX). Dobljeni rezultati vrednotenja linearnosti so predstavljeni v preglednici XII in na sliki 14.

Preglednica XII: Linearnost analizne metode

Učinkovina	Enačba premice	R ²	Območje linearnosti [mg/L]	Točnost pri najnižji koncentraciji [%]
MED	$y = 21900x + 5,219$	0,9998	0,2 – 40	90,1
BRO	$y = 46348x - 5,2977$	0,9998	0,2 – 40	103,7
NOR	$y = 53955x - 6,4908$	0,9999	0,5 – 40	100,1
NIT	$y = 14650x + 1,1536$	0,9999	0,5 – 40	93,6
LOR	$y = 49522x - 5,2794$	0,9999	0,5 – 40	109,3
KLO	$y = 25793x - 2,6169$	0,9999	0,5 – 40	104,3
MIN	$y = 30692x - 5,575$	0,9999	0,5 – 40	108,7
DIA	$y = 44480x - 10,097$	0,9998	0,5 – 40	105,2
FLU	$y = 25776x - 5,5086$	0,9999	0,5 – 40	107,1
PIN	$y = 52237x - 45,34$	0,9998	0,5 – 40	103,4



Slika 14: Umeritvene premice za izbrane BD

Iz izmerjenih odzivov smo izračunali determinacijski koeficient R^2 za posamezen BD, ki je pri vseh analitih znašal več kot 0,999. S tem smo potrdili zelo dobro linearnost metode. Izračunana točnost pri najnižji koncentraciji območja linearnosti je bila v intervalu $\pm 10\%$, kar dodatno potrjuje območje linearnosti metode.

4.1.2.3 PONOVLJIVOST METODE

Ponovljivost metode smo preverili pri treh različnih koncentracijah (QCl, QCm in QCh). Iz rezultatov v preglednici XIII je razvidno, da je bila ponovljivost metode vseh analitov pri teh koncentracijah znotraj postavljenih mej, saj RSD niti pri najnižji koncentraciji BD ni presegal 5 %.

Preglednica XIII: Ponovljivost analizne metode izražena z RSD (%)

Učinkovina	QCl	QCm	QCh	Povprečni RSD ± SD
MED	1,85	0,73	0,20	0,93 ± 0,84
BRO	2,06	0,73	0,41	1,07 ± 0,88
NOR	0,91	0,41	0,30	0,54 ± 0,33
NIT	1,29	1,69	0,62	1,20 ± 0,54
LOR	0,73	0,20	0,13	0,35 ± 0,32
KLO	1,29	0,35	0,19	0,61 ± 0,60
NIM	1,25	0,32	0,12	0,56 ± 0,60
DIA	0,80	0,29	0,10	0,39 ± 0,36
FLU	2,11	0,20	0,18	0,83 ± 1,11
PIN	3,26	0,49	0,47	1,41 ± 1,61

4.1.2.4 TOČNOST METODE

Točnost metode smo prav tako preverili na treh koncentracijskih nivojih znotraj območja metode. Kot je razvidno v preglednici XIV, so bila največja odstopanja pri nižjih koncentracijah, vendar so vrednosti tega parametra odstopale manj kot 5 % za vse analite razen PIN. S tem smo potrdili točnost metode, saj so rezultati znotraj postavljenega kriterija 100 ± 10 %.

Preglednica XIV: Točnost analizne metode (%)

Učinkovina	QCl	QCm	QCh	Razpon točnosti metode (%)
MED	102,8	100,5	100,9	100,5 – 102,8
BRO	103,7	97,7	99,2	97,7 – 103,8
NOR	100,9	95,8	97,7	95,8 – 100,9
NIT	103,1	96,3	97,7	96,3 – 103,1
LOR	103,7	98,6	100,1	98,6 – 103,7
KLO	105,9	98,6	100,1	98,6 – 105,9
NIM	103,0	98,4	99,8	98,4 – 103,0
DIA	102,2	97,3	99,3	97,3 – 102,2
FLU	105,2	98,6	100,1	98,6 – 105,2
PIN	90,9	95,8	98,6	90,9 – 98,6

4.1.2.5 ROBUSTNOST METODE

V sklopu robustnosti smo izvedli test stabilnosti kontrolnih raztopin QCl, QCm in QCh. Raztopine smo analizirali ob času 0, po enem in po dveh dneh ter preko upada koncentracije posameznih analitov vrednotili stabilnost. Rezultati so razvidni v preglednici XV.

Preglednica XV: Stabilnost v raztopini glede na vrednost ob času $t = 0$

Učinkovina	Vsebnost po enem dnevu [%]			Vsebnost po dveh dneh [%]		
	QCl	QCm	QCh	QCl	QCm	QCh
MED	98,7	100,4	100,6	98,8	94,3	97,9
BRO	97,0	99,6	99,4	79,4	95,3	97,1
NOR	100,3	100,2	100,5	88,6	97,1	98,9
NIT	97,7	99,2	100,3	77,3	92,1	96,4
LOR	101,1	99,9	100,2	96,7	98,6	99,1
KLO	99,6	99,5	100,2	92,4	96,1	97,2
NIM	99,0	99,9	100,1	99,7	100,6	100,5
DIA	100,9	99,7	100,1	101,3	100,9	100,6
FLU	99,1	99,8	99,8	99,9	101,1	100,1
PIN	99,1	100,7	99,9	87,4	93,6	97,0

Ugotovili smo, da je bil po enem dnevu upad koncentracije pri vseh analitih pri vseh koncentracijah relativno majhen (do 3 %). Po dveh dneh je bil upad koncentracije pri nekaterih analitih pričakovano večji, še posebej pri nižjih koncentracijah je bil opazen velik upad koncentracije (več kot 10 %), zlasti pri BRO, NOR, NIT in PIN. Na osnovi teh rezultatov lahko sklepamo na nestabilnost nekaterih BD v raztopinah. Za samo analizo je priporočljivo, da se raztopine BD analizirajo v čim krajšem času oz. najkasneje po enem dnevu shranjevanja pri 25 °C.

Iz dobljenih rezultatov smo lahko zaključili, da je metoda primerna za vrednotenje stabilnosti teh BD v stresnih vzorcih, saj so bili vsi validirani parametri v okviru postavljenih kriterijev.

4.2 ŠTUDIJA STRESNE STABILNOSTI BD

Študijo stabilnosti BD v raztopinah smo izvajali pod stresnimi pogoji pri treh različnih temperaturah (4, 25 in 40 °C) in štirih različnih koncentracijah NaOH oz. HCl (0,1, 0,2, 0,5, in 1 M). Priprava raztopin je opisana v poglavju 3.2.4.3. Vzorce smo analizirali v naslednjih časovnih točkah: 0, 1, 2, 3, 7 in 14 dni. Na osnovi dobljenih rezultatov stresne

študije smo najprej določili red reakcije razpada BD, s pomočjo katerega smo kasneje izračunali hitrosti razpada posameznih BD in tako medsebojno primerjali njihovo stabilnost. V nadaljevanju smo kvalitativno preverili vpliv različnih pogojev na upad vsebnosti BD in s tem dobili osnovni pregled stabilnosti posameznih BD. Hkrati smo opazovali tudi organoleptične lastnosti teh raztopin BD. V nadaljevanju smo ugotavljali kvantitativno povezavo med stabilnostjo BD in vplivom temperature ter vplivom pH, kjer smo hoteli preveriti ali morda obstajajo linearne povezave med temperaturo, koncentracijami raztopin NaOH oz. HCl in konstantami hitrosti razpada BD.

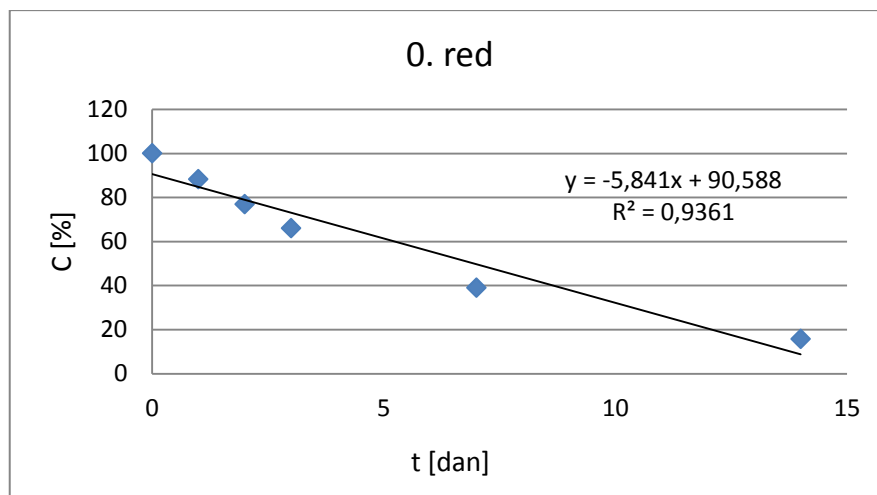
4.2.1 Določitev reda reakcij

Red reakcije lahko določimo na tri načine: s substitucijsko metodo, z metodo polčasov in z grafično metodo. Najpogostejše se uporablja grafična metoda, katero smo uporabili tudi mi. Z grafično metodo se red reakcije vrednoti s korelacijo podatkov, kar se odraža v vrednosti determinacijskega koeficienta R^2 . Večji kot je R^2 , boljša je korelacija. Kot primer so predstavljeni grafi ničtega, prvega in drugega reda reakcije razpada BRO v 0,1 M raztopini NaOH pri 25 °C, saj so to najpogostejši redi, ki opisujejo razpad učinkovin. V preglednici XVI so podatki, na osnovi katerih smo določili red reakcije.

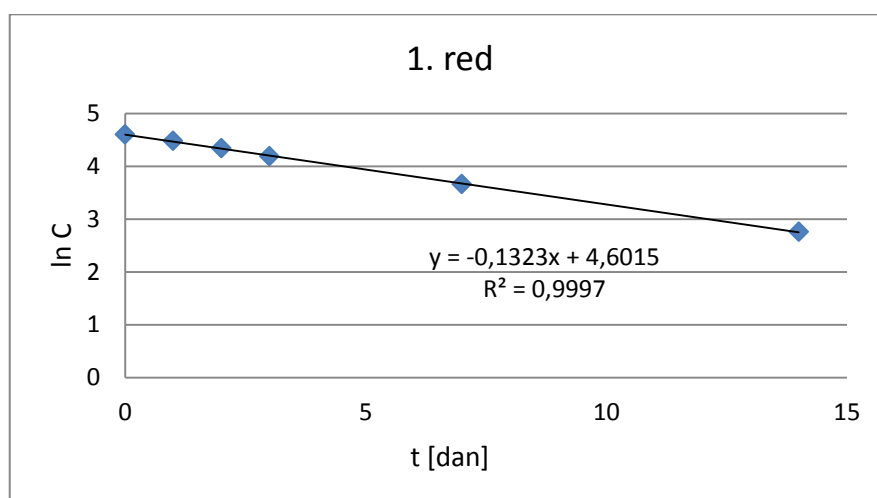
Preglednica XVI: Podatki, na osnovi katerih smo določili red reakcije za BRO

t [dan]	Odziv [mAU]	C [%]	ln C	1/C
0	881,7	100,000	4,60517	0,01000
1	778,2	88,261	4,48030	0,01133
2	678,1	76,908	4,34261	0,01300
3	581,8	65,986	4,18945	0,01516
7	343,0	38,902	3,66105	0,02571
14	139,0	15,765	2,75780	0,06343

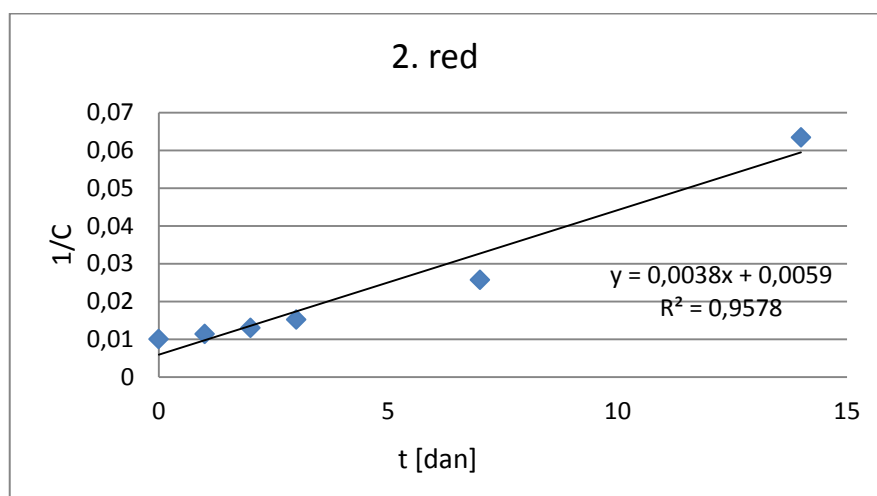
Na slikah 15, 16 in 17 so predstavljeni grafi ničtega, prvega in drugega reda reakcije razpada BRO v 0,1 M raztopini NaOH pri 25 °C.



Slika 15: Prikaz 0. reda reakcije upada koncentracije BRO s časom



Slika 16: Prikaz 1. reda reakcije upada koncentracije BRO s časom



Slika 17: Prikaz 2. reda reakcije upada koncentracije BRO s časom

Največji determinacijski koeficient in s tem najboljšo linearnost za BRO smo potrdili za 1. red reakcije, kjer je $R^2 \geq 0,999$. Ugotovili smo, da tudi razpad ostalih BD sledi kinetiki 1. reda. V preglednici XVII so podani determinacijski koeficienti za različne rede reakcij, ki opisujejo upad koncentracije nekaterih BD v 0,1 M NaOH pri 4 °C.

Preglednica XVII: R^2 različnih redov reakcij, ki opisujejo upad koncentracije nekaterih BD

Učinkovina \ R^2	0. red	1. red	2. red
DIA	0,982	0,998	0,983
LOR	0,937	0,992	0,985
BRO	0,988	0,999	0,989
NIT	0,936	0,999	0,947
KLO	0,976	0,999	0,979
LOR	0,987	0,999	0,988

4.2.2 Stabilnost BD pri različnih stresnih pogojih

V sklopu naše stresne študije stabilnosti sta nas zanimala dva osnovna dejavnika, ki vplivata na stabilnost ZU v raztopinah, ki so podvržene reakcijam hidroliz. Tako smo preverjali vpliv temperature in pH na razpad različnih BD v raztopinah NaOH oz. HCl različnih koncentracij. Najprej smo kvalitativno preverili vpliv različnih pogojev. V preglednici XVIII so predstavljeni deleži nespremenjenih BD po enem dnevu pri 25 °C v raztopinah NaOH oz. HCl različnih koncentracij. Temperaturo 25 °C smo izbrali zato, ker je bil razpad BD pri 40 °C prehiter in smo zato imeli na razpolago pomanjkljive podatke za primerjavo stabilnosti različnih BD. Pri temperaturi 4 °C pa smo zaradi tehničnih težav izgubili set podatkov za HCl in smo med seboj lahko primerjali le rezultate razpada BD v raztopinah NaOH.

Preglednica XVIII: % preostalega BD po enem dnevu glede na čas $t = 0$ pri 25 °C

BD [%] \ C [M]	1 M NaOH	0,5 M NaOH	0,2 M NaOH	0,1 M NaOH	1 M HCl	0,5 M HCl	0,2 M HCl	0,1 M HCl
DIA	10	7	2	77	87	84	84	99
LOR	31	27	33	39	55	67	74	77
BRO	6	31	65	88	0	12	24	35
NIT	0	0	0	0	13	15	20	30
FLU	0	0	0	0	77	91	95	99
NIM	0	0	0	0	62	79	95	95
MED	46	66	80	93	94	98	94	94
KLO	0	0	3	3	19	12	25	42
NOR	11	38	72	84	78	72	/	58
PIN	0	0	0	0	60	66	78	89

/ - ni podatka zaradi tehničnih težav

Iz rezultatov v preglednici XVIII je razvidno, da so BD na splošno stabilnejši v raztopinah HCl. NIT, FLU, NIM in PIN v raztopinah NaOH popolnoma razpadejo že po enem dnevu. V 0,1 M raztopini NaOH so DIA, BRO, MED in NOR relativno obstojni ($> 75\%$). V raztopinah HCl so najmanj stabilni BRO, NIT in KLO, vendar nobeden po enem dnevu ne razpade popolnoma. Relativno zelo obstojni so v kislem okolju DIA, FLU, NIM in MED. BRO je med vsemi testiranimi BD izjema, saj edini hitreje razpada v kislem kot v bazičnem okolju. Najbolj obstojen BD tako v alkalnih kot tudi v kislih pogojih je MED. Med koncentracijo raztopin NaOH oz. HCl in stabilnostjo BD obstaja trend, saj višja kot je koncentracija raztopine, večji je obseg razpada BD.

Opazili smo tudi organoleptične spremembe med pripravo vzorcev, saj je prišlo do spremembe barve in tvorbe »nitkam« podobnih struktur v nekaterih raztopinah. Do spremembe barve je prišlo pri NIM, PIN in NIT v raztopinah NaOH, kar je v skladu z nestabilnostjo omenjenih BD (preglednica XVIII). Te raztopine so se obarvale rumeno, kar nakazuje na takojšnjo tvorbo hidrolitičnih produktov - BF, saj so tudi standardi BF rumene barve. V raztopinah NIT in PIN so nastale tudi rumene nitaste tvorbe.

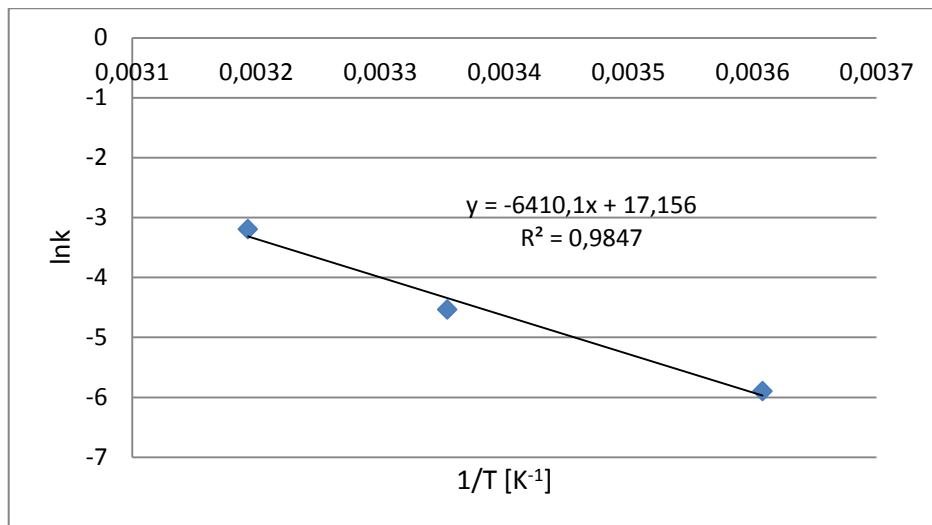
V nadaljevanju smo ugotavljali kvantitativno povezavo med stabilnostjo BD in temperaturo ter pH raztopin.

4.2.3 Vpliv temperature

Znano je, da kemijske reakcije potekajo hitreje pri višjih temperaturah. Povišana temperatura je tudi osnova stresnih testov in pospešenih testov stabilnosti (37). Stabilnost BD v raztopinah smo spremljali pri temperaturah 4, 25 in 40 °C. S primerjavo konstant hitrosti razpada smo potrdili da BD pri višjih temperaturah razpadajo hitreje, saj so bile konstante razpada pri višjih temperaturah za nekaj krat večje kot pri nižjih temperaturah (tudi do 22-krat večje).

Zanimalo nas je, ali obstaja linearen odnos med temperaturo in konstantami hitrosti razpada. Odnos med recipročno vrednostjo temperature in hitrostjo reakcije podaja Arrheniusov model. V našem primeru smo imeli dovolj podatkov za izris Arrheniusove premice le za nekaj BD v 0,1 in 0,2 M NaOH, kajti v 0,5 in 1 M NaOH so BD pri višjih temperaturah prehitro razpadali, zato posledično ni bilo mogoče izračunati konstant hitrosti razpada. Arrheniusove premice za vzorce v HCl nismo ovrednotili zaradi tehničnih težav

priprave vzorcev shranjenih pri 4 °C. Na sliki 18 je primer Arrheniusove premice za DIA v 0,1 M NaOH. Podatki za ovrednotene BD so zajeti v preglednici XIX in preglednici XX.



Slika 18: Arrheniusova premica za DIA v 0,1 M NaOH

Iz naklona premice smo izračunali aktivacijske energije (E_a) po naslednji enačbi, ki je izpeljana iz Arrheniusove enačbe (enačba 1, poglavje 1.2.2.2):

$$-E_a = \text{naklon premice} \times R \quad (\text{enačba 9})$$

Pri tem je R splošna plinska konstanta, ki znaša 8,3145 J/molK.

Preglednica XIX: Konstante hitrosti razpada pri treh različnih temperaturah, enačbe Arrheniusovih premic, R^2 in aktivacijske energije za DIA, LOR, BRO in NOR v 0,1 M NaOH

Učinkovina T [°C]	DIA	LOR	BRO	NOR
k pri 4 °C [h ⁻¹]	0,002742	0,003738	0,00115	0,001038
k pri 25 °C [h ⁻¹]	0,010725	0,038333	0,00551	0,004308
k pri 40 °C [h ⁻¹]	0,040875	0,043758	0,02565	0,016900
Enačba Arrheniusove premice	$y = -6410,1x + 17,156$	$y = -6223,5x + 17,074$	$y = -7365,8x + 19,724$	$y = -6625,5x + 16,962$
R^2	0,9847	0,8847	0,9847	0,9862
E_a [kJ/mol]	53,3	51,7	61,2	55,1

Preglednica XX: Konstante hitrosti razpada pri treh različnih temperaturah, enačbe Arrheniusovih premic, R^2 in aktivacijske energije za BRO in NOR v 0,2 M NaOH

Učinkovina	BRO	NOR
T [°C]		
k pri 4 °C [h ⁻¹]	0,002925	0,002021
k pri 25 °C [h ⁻¹]	0,015267	0,011196
k pri 40 °C [h ⁻¹]	0,060475	0,048763
Enačba Arrheniusove premice	$y = -7229,8x + 20,2$	$y = -7589,8x + 21,12$
R^2	0,9941	0,9927
E_a [kJ/mol]	60,1	63,1

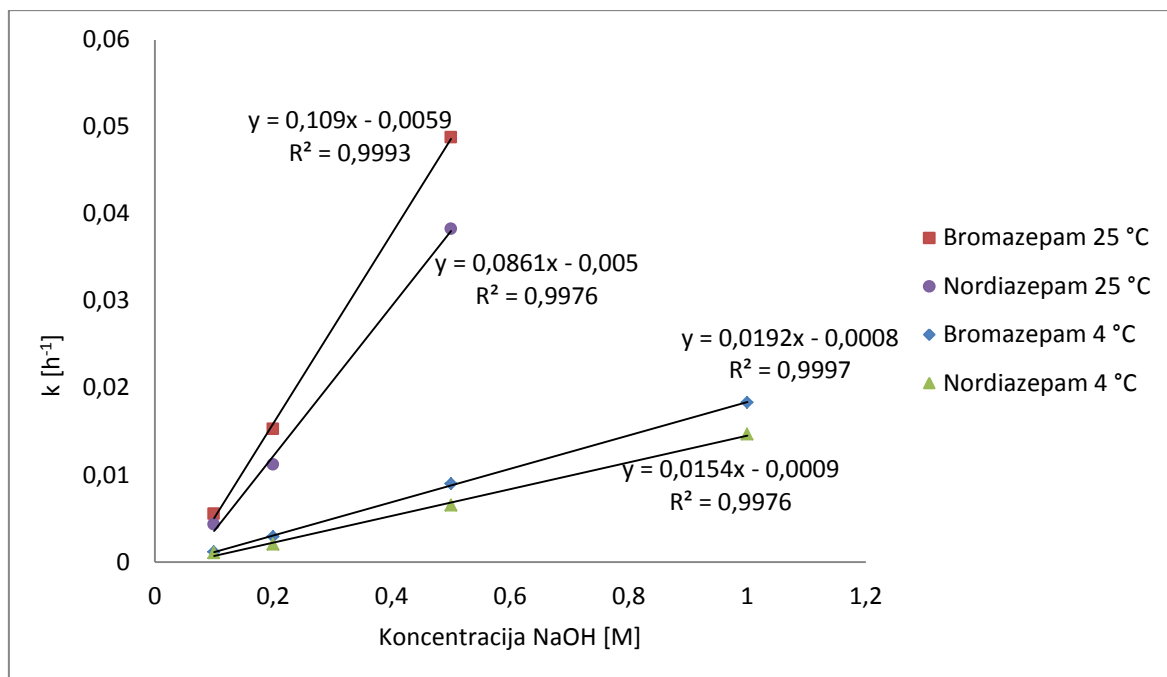
Iz podatkov zbranih v preglednicah XIX in XX lahko potrdimo linearno povezavo med temperaturo in hitrostjo reakcije razpada, saj imamo determinacijske koeficiente $R^2 > 0,98$ pri vseh BD razen LOR. Na podlagi izračunanih podobnih aktivacijskih energij E_a lahko sklepamo o enakih mehanizmih razpada ovrednotenih BD: DIA, LOR, BRO in NOR.

4.2.4 Vpliv pH

Vpliv pH smo raziskali v širokem pH območju, kjer smo pričakovali hidrolizo BD v raztopinah. Hidroliza je značilna za molekule z določenimi funkcionalnimi skupinami. Tudi vpliv pH v širokem območju spada v sklop stresnega testiranja. Predpostavili smo, da bolj kot je ekstremen pH, hitreje poteka razpad BD. Po obdelavi podatkov smo ugotovili, da pri nekaterih BD obstaja linearna povezava med koncentracijo NaOH oz. HCl in konstantami hitrosti razpada ter potrdili predpostavko, da je hitrost razpada pri višjih koncentracijah NaOH oz. HCl večja. Kvantitativni odnos smo lahko primerjali le pri določenih pogojih, kjer ni prišlo do prehitrega razpada BD.

4.2.4.1 RAZISKAVE V BAZIČNEM OKOLJU

Med stabilnostno študijo smo ugotovili, da je večina BD v raztopinah NaOH zelo nestabilnih. Na sliki 19 je razvidna linearna povezava med koncentracijo NaOH in konstantami hitrosti razpada BRO in NOR pri 4 °C in 25 °C, ki sta se zraven MED izkazala kot najbolj stabilna v NaOH. MED nismo vključili v obravnavo, ker zaradi njegove stabilnosti ni bilo mogoče izračunati relevantnih konstant hitrosti razpada v izbranem časovnem oknu testiranja.

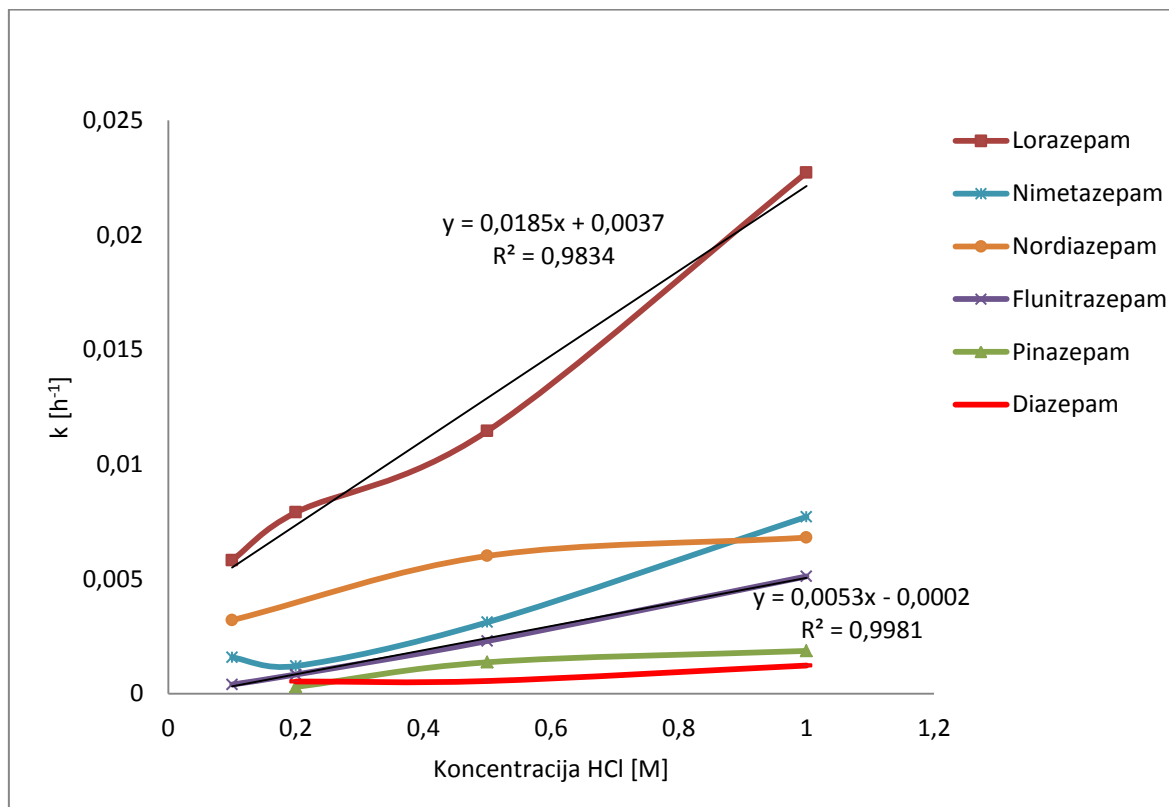


Slika 19: Konstante hitrosti razpada BRO in NOR v odvisnosti od koncentracije NaOH pri 4 in 25 °C

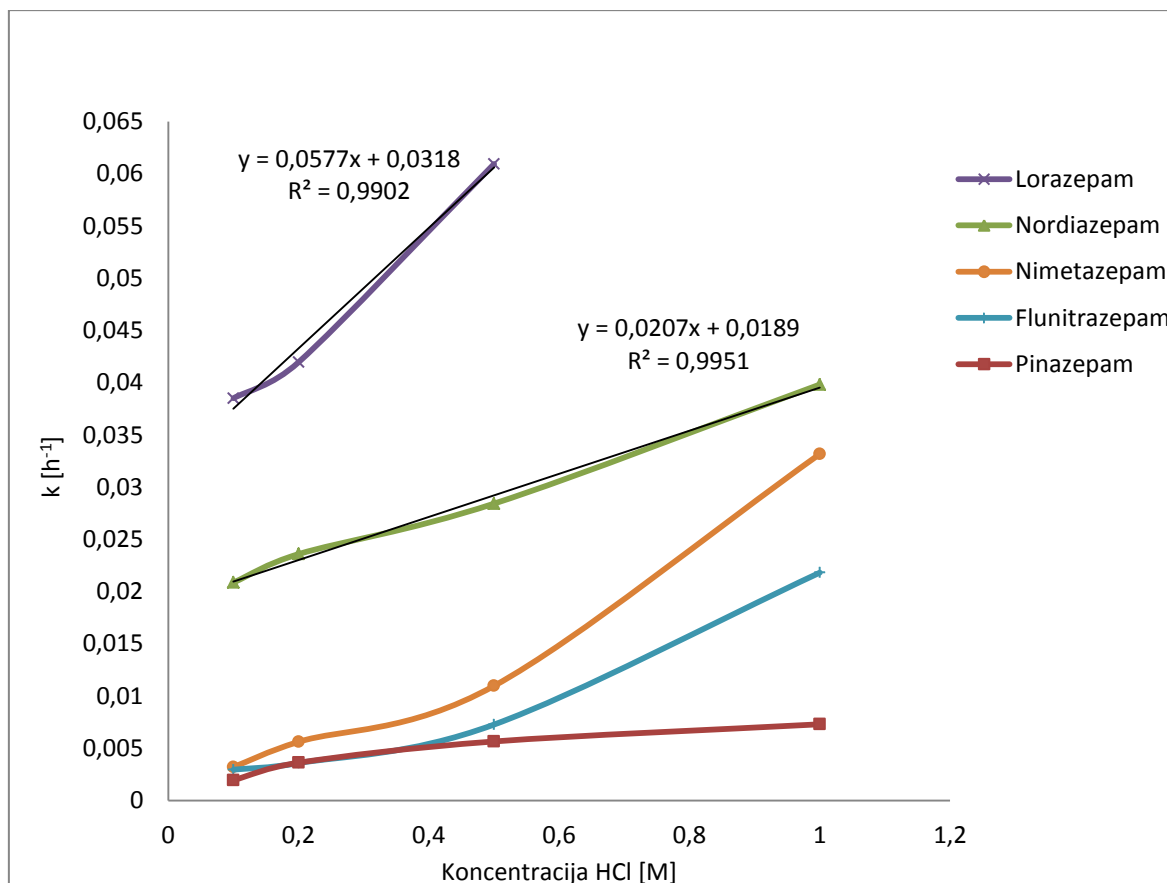
Visoki determinacijski koeficienti R^2 , ki pri vseh primerih dosegajo vrednosti nad 0,99 potrjuje linearen odnos med koncentracijo NaOH in konstantami hitrosti razpada BRO in NOR. Pri višjih koncentracijah NaOH so večje tudi konstante hitrosti razpada.

4.2.4.2 RAZISKAVE V KISLEM OKOLJU

Razpad BD v raztopinah s HCl je pospešen, vendar ne v tolikšni meri kot v raztopinah z NaOH, zato so na razpolago rezultati stabilnosti za večino BD. Na slikah 20 in 21 je predstavljena povezava med koncentracijo HCl in konstantami hitrosti razpada nekaterih BD pri 25 °C in pri 40 °C.



Slika 20: Konstante hitrosti razpada BD v odvisnosti od koncentracije HCl pri 25 °C

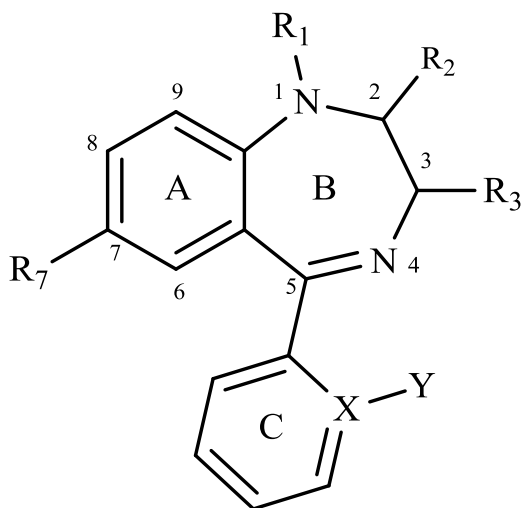


Slika 21: Konstante hitrosti razpada BD v odvisnosti od koncentracije HCl pri 40 °C

Pri vzorcih BD v HCl je odnos med koncentracijo in konstantami hitrosti razpada nekoliko drugačen kot pri NaOH, vendar je v obeh primer trend enak – višja kot je koncentracija NaOH oz. HCl, večje so konstante hitrosti razpada. V primeru LOR in NOR pri 40 °C lahko opazimo linearen odnos. Za LOR velja enako tudi pri 25 °C, pri ostalih BD pa ne gre za linearno zvezo. V primeru PIN opazimo pri obeh temperaturah podoben vzorec, pri čemer hitrost razpada doseže nekakšen plato pri višjih koncentracijah HCl. Podobno opazimo tudi za NOR pri 25 °C.

4.2.5 Primerjava in vpliv funkcionalnih skupin na stabilnost BD v raztopinah

Po obdelavi podatkov pridobljenih v študiji stabilnosti in izračunanih konstantah hitrosti razpada posameznih BD v raztopinah, smo lahko primerjali vpliv posameznih funkcionalnih skupin na stabilnost BD v raztopinah NaOH in HCl. Na sliki 22 je osnovna struktura 1,4-benzodiazepinov. V preglednici XXI so predstavljene funkcionalne skupine, ki jih vsebujejo BD, vključeni v študijo stabilnosti.



Slika 22: Osnovna struktura 1,4-benzodiazepinov, povzeto po (5)

Preglednica XXI: Funkcionalne skupine, posameznih BD vključenih v študijo stabilnosti

Funkcionalne skupine Učinkovina	R ₁	R ₂	R ₃	R ₇	X	Y
DIAZEPAM	-CH ₃	=O	-H	-Cl	C	-H
NORDIAZEPAM	-H	=O	-H	-Cl	C	-H
LORAZEPAM	-H	=O	-OH	-Cl	C	-Cl
NITRAZEPAM	-H	=O	-H	-NO ₂	C	-H
BROMAZEPAM	-H	=O	-H	-Br	N	/
PINAZEPAM	-CH ₂ C≡CH	=O	-H	-Cl	C	-H
FLUNITRAZEPAM	-CH ₃	=O	-H	-NO ₂	C	-F
NIMETAZEPAM	-CH ₃	=O	-H	-NO ₂	C	-H
MEDAZEPAM	-CH ₃	-H	-H	-Cl	C	-H
KLONAZEPAM	-H	=O	-H	-NO ₂	C	-Cl

V nadaljevanju je opisan vpliv posameznih funkcionalnih skupin na mestih R₁, R₂, R₃, R₇, X in Y na stabilnost BD v raztopinah, kar se odraža v njihovih konstantah hitrosti razpada. Vpliv posameznih funkcionalnih skupin smo ugotavljali s primerjavo konstant hitrosti razpada parov različnih BD, ki se razlikujejo le v eni funkcionalni skupini.

V nekaterih primerih nismo imeli dovolj podatkov za izračun konstant hitrosti razpada, ker so BD prehitro razpadli. V teh primerih smo za namene primerjave podali odstotek preostalega BD po enem dnevu glede na čas $t = 0$.

4.2.5.1 VPLIV FUNKCIONALNIH SKUPIN NA MESTU R_1

Vpliv funkcionalnih skupin na mestu R_1 na hitrosti razpada smo lahko primerjali med DIA, NOR in PIN, ki se razlikujejo le na tem mestu. V preglednici XXII so predstavljene konstante hitrosti razpada teh BD pri različnih kislih pogojih. V preglednici XXIII je prikazan odstotek preostalega BD po enem dnevu v 0,1 M NaOH pri temperaturi 4, 25 in 40 °C.

Preglednica XXII: Primerjava vpliva funkcionalnih skupin na mestu R_1 med NOR, DIA in PIN v kislem okolju

$k [h^{-1}]$ BD (R_1)	1 M HCl pri 25 °C	0,5 M HCl pri 25 °C	1 M HCl pri 40 °C	0,5 M HCl pri 40 °C
DIA (-CH ₃)	0,0012	0,0006	0,0061	0,0058
NOR (-H)	0,0068	0,0060	0,0398	0,0284
PIN (-CH ₂ C≡CH)	0,0019	0,0014	0,0073	0,0057

Iz rezultatov je razvidno, da je konstanta hitrosti razpada DIA pri navedenih kislih pogojih najnižja, a primerljiva s PIN. Sklepamo lahko, da skupina -CH₃ in alkilna veriga s trojno vezjo na mestu R_1 bolj stabilizira molekulo kot -H.

Preglednica XXIII: Primerjava vpliva funkcionalnih skupin na mestu R_1 med NOR, DIA in PIN v bazičnem okolju

% po t = 1 dan BD (R_1)	0,1 M NaOH pri 4 °C	0,1 M NaOH pri 25 °C	0,1 M NaOH pri 40 °C
DIA (-CH ₃)	95	77	35
NOR (-H)	98	84	62
PIN (-CH ₂ C≡CH)	0	0	0

V bazičnih pogojih alkilna veriga s trojno vezjo močno destabilizira molekulo, saj PIN popolnoma razpade že v enem dnevu, kar pa se zelo razlikuje od vpliva alkilne verige PIN v kislem. Ob primerjavi DIA in NOR v bazičnem okolju lahko zaključimo, da -H v primerjavi s -CH₃ nekoliko stabilizira molekulo BD.

Med seboj smo lahko primerjali tudi NIM in NIT, ki se prav tako razlikujeta le na mestu R_1 . Rezultate smo predstavili v preglednici XXIV za različne kisle pogoje.

Preglednica XXIV: Primerjava vpliva funkcionalnih skupin na mestu R₁ med NIT in NIM kislem okolju

BD (R₁) \ % po t = 1 dan	0,5 M HCl pri 25 °C	0,2 M HCl pri 25 °C	0,1 M HCl pri 25 °C	0,2 M HCl pri 40 °C	0,1 M HCl pri 40 °C
NIT (-H)	15	20	30	10	13
NIM (-CH₃)	79	95	95	90	96

Po primerjavi stabilnosti po enem dnevu lahko enako kot v primeru DIA/NOR potrdimo, da skupina -CH₃ na mestu R₁ od 5 do 10-krat bolj stabilizira osnovno molekulo. Primerjava v bazičnih pogojih ni mogoča, ker sta oba BD preveč nestabilna v raztopinah NaOH, saj pri vseh koncentracij in vseh temperaturah popolnoma razpadeta že po enem dnevu.

Skupina -CH₃ je v primerjavi s -H bogatejša z elektroni in se obnaša kot elektron donor. S pozitivnim induktivnim učinkom poveča elektronsko gostoto na mestu 2 (slika 22) in s tem zmanjša obseg nukleofilnih napadov in posledično obseg reakcije hidrolize.

4.2.5.2 VPLIV FUNKCIONALNIH SKUPIN NA MESTU R₂

Vpliv funkcionalnih skupin na mestu R₂ smo primerjali med DIA in MED, ki se razlikujeta le na tem mestu. Rezultate smo predstavili v preglednici XXV in XXVI v raztopinah HCl in NaOH različnih koncentracij pri 40 °C.

Preglednica XXV: Primerjava vpliva funkcionalnih skupin na mestu R₂ med DIA in MED v kislem okolju

BD (R₂) \ % po t = 1 dan	1 M HCl pri 40 °C	0,5 M HCl pri 40 °C	0,2 M HCl pri 40 °C	0,1 M HCl pri 40 °C
DIA (=O)	68	79	94	100
MED (-H)	94	97	98	100

Preglednica XXVI: Primerjava vpliva funkcionalnih skupin na mestu R₂ med DIA in MED v bazičnem okolju

BD (R₂) \ % po t = 1 dan	1 M NaOH pri 40 °C	0,5 M NaOH pri 40 °C	0,2 M NaOH pri 40 °C	0,1 M NaOH pri 40 °C
DIA (=O)	0	0	0	35
MED (-H)	25	39	79	99

V obeh medijih odsotnost skupine =O na mestu R₂ (MED) močno stabilizira molekulo, saj je ta skupina ključna za reakcijo hidrolize 1,2-amidne vezi. Obe spojini sta izrazito manj stabilni v bazičnih kot pa v kislih pogojih.

4.2.5.3 VPLIV FUNKCIONALNIH SKUPIN NA MESTU R₃

Vpliv funkcionalnih skupin na mestu R₃ na hitrosti razpada smo lahko primerjali med NOR in LOR. V preglednici XXVII so predstavljene konstante hitrosti razpada teh dveh BD pri različnih pogojih.

Preglednica XXVII: Primerjava vpliva funkcionalnih skupin na mestu R₃ med NOR in LOR

$k [h^{-1}]$ BD (R ₃)	0,2 M NaOH pri 4 °C	0,1 M NaOH pri 4 °C	0,1 M HCl pri 25 °C	0,2 M HCl pri 40 °C
NOR (-H)	0,0020	0,0010	0,0032	0,0236
LOR (-OH)	0,0046	0,0037	0,0058	0,0420

Konstante hitrosti razpada LOR so v vseh primerih do približno 4-krat večje od konstant NOR, kar pomeni, da skupina –OH na mestu R₃ pri vseh pogojih destabilizira molekulo. NOR in LOR se razlikujeta tudi na mestu Y, kjer ima NOR skupino –H, LOR pa –Cl. Ugotovili smo, da skupina –Cl na tem mestu stabilizira osnovno molekulo (slika 22). S tem lahko potrdimo še bolj izraziti vpliv skupine –OH na destabilizacijo osnovne molekule.

–OH skupina na mestu R₃ deluje kot elektron akceptor. Z negativnim induktivnim učinkom zmanjša elektronsko gostoto na mestu 2 (slika 22) in s tem poveča možnost nukleofilnih napadov. Na ta način se obseg reakcije hidrolize poveča.

4.2.5.4 VPLIV FUNKCIONALNIH SKUPIN NA MESTU R₇

Vpliv funkcionalnih skupin na mestu R₇ na hitrosti razpada smo lahko primerjali med DIA in NIM, ki se razlikujeta le na tem mestu. V preglednici XXVIII so predstavljene konstante hitrosti razpada teh dveh BD pri različnih pogojih.

Preglednica XXVIII: Primerjava vpliva funkcionalnih skupin na mestu R₇ med DIA in NIM v kislem okolju

$k [h^{-1}]$ BD (R ₇)	1 M HCl pri 25 °C	0,5 M HCl pri 25 °C	1 M HCl pri 40 °C	0,5 M HCl pri 40 °C
DIA (-Cl)	0,0012	0,0006	0,0061	0,0058
NIM (-NO ₂)	0,0077	0,0031	0,0332	0,0110

S primerjavo konstant hitrosti razpada pri obravnavanih pogojih lahko predpostavimo, da skupina $-\text{NO}_2$ na mestu R_7 zelo destabilizira molekulo, saj so konstante do 7-krat večje za NIM. NIM v bazičnem okolju v vseh koncentracijah pri vseh temperaturah razpade že po enem dnevu, medtem ko je DIA v raztopinah NaOH nižjih koncentracij relativno stabilen. To še dodatno potrди predpostavko, da skupina $-\text{NO}_2$ na mestu R_7 destabilizira molekulo. Ta destabilizacija je torej še bolj izrazita v bazičnem okolju.

Vpliv funkcionalnih skupin na mestu R_7 smo lahko primerjali tudi za par NOR in NIT (Preglednica XXIX).

Preglednica XXIX: Primerjava vpliva funkcionalnih skupin na mestu R_7 med NOR in NIT v kislih pogojih

BD (R_7) \ % po t = 1 dan	1 M HCl pri 40 °C	0,5 M HCl pri 40 °C	0,2 M HCl pri 40 °C	0,1 M HCl pri 40 °C
NOR (-Cl)	38	45	44	42
NIT ($-\text{NO}_2$)	0	6	22	42

Enako kot v primeru za par DIA/NIM smo ugotovili, da skupina $-\text{NO}_2$ na mestu R_7 zelo destabilizira molekulo. V bazičnem okolju je razlika še bolj izrazita. NIT v bazičnih raztopinah v vseh koncentracijah pri vseh temperaturah razpade že po enem dnevu, medtem ko je NOR pri nižjih koncentracijah relativno stabilen. To še dodatno potrди predpostavko, da skupina $-\text{NO}_2$ na mestu R_7 izredno destabilizira osnovno molekulo.

Skupina $-\text{NO}_2$ v primerjavi s skupino $-\text{Cl}$ bolj privlači elektrone. S tem zmanjša elektronsko gostoto celotnega sistema in tako poveča možnost nukleofilnih napadov na mestu 2 (slika 22).

4.3.5.5 VPLIV FUNKCIONALNIH SKUPIN NA MESTU X

Vpliv funkcionalnih skupin na mestu X na hitrosti razpada smo lahko primerjali med NOR in BRO. Oba predstavnika se zraven mesta X razlikujeta še na mestu R_7 , kjer ima NOR skupino $-\text{Cl}$, BRO pa $-\text{Br}$, vendar ta razlika ne vpliva značilno na stabilnost, saj obe funkcionalni skupini spadata med halogene elemente. V preglednici XXX so predstavljene konstante hitrosti razpada teh dveh BD v raztopinah NaOH različnih koncentracij pri temperaturi 4 °C, v preglednici XXXI pa je podana primerjava stabilnosti NOR in BRO v kislem okolju pri 40 °C.

Preglednica XXX: Primerjava vpliva funkcionalnih skupin na mestu X med NOR in BRO v bazičnih pogojih

$k [h^{-1}]$ BD (X)	1 M NaOH pri 4 °C	0,5 M NaOH pri 4 °C	0,2 M NaOH pri 4 °C	0,1 M NaOH pri 4 °C
NOR (C)	0,0147	0,0065	0,0020	0,0010
BRO (N)	0,0183	0,0090	0,0030	0,0012

Preglednica XXXI: Primerjava vpliva funkcionalnih skupin na mestu X med NOR in BRO v kisljih pogojih

$\% \text{ po } t = 1 \text{ dan}$ BD (X)	1 M HCl pri 40 °C	0,5 M HCl pri 40 °C	0,2 M HCl pri 40 °C	0,1 M HCl pri 40 °C
NOR (C)	38	45	44	42
BRO (N)	3	7	16	21

Po primerjavi konstant NOR in BRO lahko sklepamo, da dušik na mestu X nekoliko destabilizira molekulo v bazičnem okolju (za manj kot 50 %). Ugotovili smo tudi, da je BRO z dušikom na mestu X zelo nestabilen v primerjavi z NOR v kislem. Dušik na mestu X torej najbolj destabilizira molekulo v kislem. Zanimivo je tudi dejstvo, da so vsi BD razen BRO stabilnejši v kislem, BRO pa je izrazito bolj stabilen v bazičnem.

Zaradi dušikovega atoma v piridinskem obroču se po obroču polarizira pozitiven naboj, kar vodi do povečanja pozitivnega naboja na ogljikovem atomu na mestu 5. S tem se povečajo možnosti za nukleofilni napad na tem mestu, posledično pa se 4,5-azometinska vez destabilizira.

4.2.5.6 VPLIV FUNKCIONALNIH SKUPIN NA MESTU Y

Vpliv funkcionalnih skupin na mestu Y smo lahko primerjali med FLU in NIM. V preglednici XXXII so predstavljene konstante hitrosti razpada teh dveh BD pri različnih kisljih pogojih.

Preglednica XXXII: Primerjava vpliva funkcionalnih skupin na mestu Y med FLU in NIM v kisljih pogojih

$k [h^{-1}]$ BD (-Y)	1 M HCl pri 25 °C	0,5 M HCl pri 25 °C	1 M HCl pri 40 °C	0,5 M HCl pri 40 °C
FLU (-F)	0,0051	0,0023	0,0218	0,0073
NIM (-H)	0,0077	0,0031	0,0331	0,0110

Konstante hitrosti razpada FLU so pri navedenih pogojih nižje (za manj kot 2-krat), tako lahko sklepamo, da skupina –F na mestu Y stabilizira molekulo. Primerjava teh dveh funkcionalnih skupin v raztopinah NaOH ni mogoča, saj sta obe spojini preveč nestabilni in razpadata že po enem dnevu.

Med seboj smo lahko primerjali dodatni par NIT in KLO, ki se prav tako razlikujeta le na tem mestu (Preglednica XXXIII).

Preglednica XXXIII: Primerjava vpliva funkcionalnih skupin na mestu Y med NIT in KLO

% po t = 1 dan	1 M HCl pri 25 °C	0,5 M HCl pri 25 °C	0,2 M HCl pri 25 °C	0,1 M HCl pri 25 °C	0,2 M NaOH pri 25 °C	0,1 M NaOH pri 25 °C
BD (-Y)						
NIT (-H)	13	15	20	30	0	0
KLO (-Cl)	19	12	25	42	3	3

Po enem dnevu pri navedenih pogojih razpade manj KLO, zato sklepamo, da podobno kot skupina –F tudi –Cl na mestu Y stabilizira molekulo. V bazičnem sta obe spojini zelo nestabilni, a vendar obstaja razlika, saj NIT po enem dnevu popolnoma razpade, medtem ko ostane 3 % KLO nespremenjenega.

Skupina –Cl na mestu Y z elektrondonorskim resonančnim učinkom polarizira negativen naboj po benzenovem obroču. S tem se nekoliko zmanjša pozitiven naboj na mestu 5 (slika 22) in tako težje pride do nukleofilnega napada na tem mestu. Na tak način se poveča stabilnost 4,5-azometinske vezi.

4.2.5.7 KORELACIJSKA ANALIZA

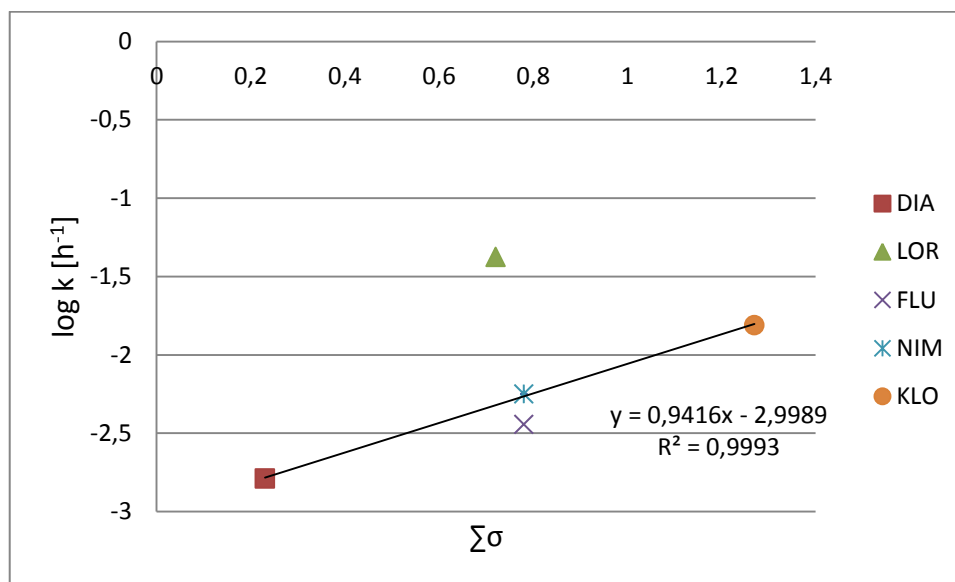
V nadaljevanju nas je zanimalo, ali lahko Hammettovo in Taftovi teorijo, ki sta bili razviti za analoge benzojske kisline (1.3.2 in 1.3.3), prenesemo na BD. Za seštevke prispevkov posameznih funkcionalnih skupin smo uporabili Hammettovo in Taftovo metodologijo. Prispevki funkcionalnih skupin za vsakega izmed BD so predstavljeni v preglednici XXXIV.

Preglednica XXXIV: Polarne konstante funkcionalnih skupin in njihov seštevek, povzeto po (44)

Funkcionalne skupine Učinkovina	R₁	σ*	R₇	σ	Σσ
DIAZEPAM	-CH ₃	0	-Cl	0,23	0,23
NORDIAZEPAM	-H	0,49	-Cl	0,23	0,72
LORAZEPAM	-H	0,49	-Cl	0,23	0,72
NITRAZEPAM	-H	0,49	-NO ₂	0,78	1,27
BROMAZEPAM	-H	0,49	-Br	0,22	0,71
PINAZEPAM	-CH ₂ C≡CH	/	-Cl	0,23	/
FLUNITRAZEPAM	-CH ₃	0	-NO ₂	0,78	0,78
NIMETAZEPAM	-CH ₃	0	-NO ₂	0,78	0,78
MEDAZEPAM	-CH ₃	0	-Cl	0,23	0,23
KLONAZEPAM	-H	0,49	-NO ₂	0,78	1,27

σ* = polarna konstanta funkcionalne skupine na mestu R₁, σ = polarna konstanta funkcionalne skupine na mestu R₇, / - ni podatka

Pričakovali smo, da bodo BD s podobnim prispevkom funkcionalnih skupin imeli podobne konstante hitrosti razpada. Na sliki 23 je predstavljena povezava med prispevki funkcionalnih skupin (Σσ) in logaritmskimi vrednostmi konstant hitrosti razpada BD (log k) v 0,2 M raztopini HCl pri 40 °C.



Slika 23: Konstante hitrosti razpada BD v odvisnosti od Σσ v 0,2 M raztopini HCl pri 40 °C

Iz grafa na sliki 23 je razvidno, da med nekaterimi BD obstaja linearna zveza med prispevki funkcionalnih skupin in njihovimi konstantami hitrosti razpada. Opazimo lahko

veliko odstopanje LOR in majhno odstopanje FLU, čeprav bi glede na skoraj identične prispevke skupin pričakovali podobne konstante hitrosti kot za NIM. Odstopanje LOR lahko pojasnimo s prisotnostjo skupine $-OH$ na mestu R_3 , ki pri ostalih BD ni prisotna. Prispevek funkcionalnih skupin na mestu R_3 ni definiran, zato ga ni mogoče upoštevati pri izračunu $\sum\sigma$, zagotovo pa lahko trdimo, da skupina $-OH$ na mestu R_3 prispeva k hitrejšemu razpadu molekule. Na podoben način lahko pojasnimo odstopanje FLU, ki ima na mestu Y skupino $-F$, medtem ko imajo NIM in ostali vključeni BD na mestu Y $-H$. Prispevek funkcionalnih skupin na mestu Y prav tako ni definiran, iz interpretacije rezultatov (Vpliv funkcionalnih skupin na mestu Y) pa lahko zaključimo, da skupini $-F$ in $-Cl$ na mestu Y stabilizirata molekulo in sta posledično konstanti hitrosti razpada manjši. To potrjujejo tudi rezultati iz slike 23.

Uporaba te metodologije ima določene omejitve. Omejeni smo samo na prispevke skupin na mestih R_1 in R_7 , saj prispevki na mestih R_2 , R_3 , X in Y niso definirani, čeprav je njihov vpliv na stabilnost v nekaterih primerih ključen (MED, LOR, BRO). Tudi prispevki nekaterih funkcionalnih skupin na mestu R_1 , še niso raziskani (PIN). Pri širši obravnavi korelacijske analize nas je omejevalo tudi število vključenih BD, saj so bili nekateri pri izbranih pogojih izredno nestabilni. Zato nismo mogli izračunati njihovih konstant hitrosti razpada in jih posledično nismo mogli vključiti v korelacijsko analizo. Visok R^2 premice na sliki 23 dobimo v primeru vključitve BD, za katere ne veljajo zgoraj omenjene omejitve.

4.2.6 Mehanizem razpada BD

Mehanizem razpada smo lahko natančneje opredelili pri BD, za katere smo imeli standarde pripadajočih BF, saj ena od glavnih poti razpada BD vodi do nastanka BF (slika 2). Standarde BF smo imeli za naslednje BD: DIA, NOR, LOR, BRO, NIT in KLO. Za te predstavnike smo ugotavljali kolikšen del celokupnega razpada BD predstavlja nastanek BF. V preglednici XXXV in XXXVI so izračunani deleži nastanka BF glede na celoten obseg razpada BD pri 25 °C v NaOH oz. HCl. Kot dodatno informacijo smo podali preostanek BD glede na začetno koncentracijo BD v raztopini. Rezultatov za NOR v 0,2 M HCl zaradi tehničnih težav nimamo.

Preglednica XXXV: Delež nastanka BF glede na celoten obseg razpada BD in delež preostalega BD v raztopinah NaOH

C [M]	1 M NaOH		0,5 M NaOH		0,2 M NaOH		0,1 M NaOH	
BF (%), BD (%)	BF (%)	% BD	BF (%)	% BD	BF (%)	% BD	BF (%)	% BD
DIA	7	6	11	7	29	2	84	89
NOR	31	1	35	15	97	15	100	23
LOR	0	0	0	0	0	0	0	0
BRO	78	0	97	3	101	7	100	16
NIT	20	0	28	0	90	0	99	0
KLO	0	0	6	0	100	2	100	2

Preglednica XXXVI: Delež nastanka BF glede na celoten obseg razpada BD in delež preostalega BD v raztopinah HCl

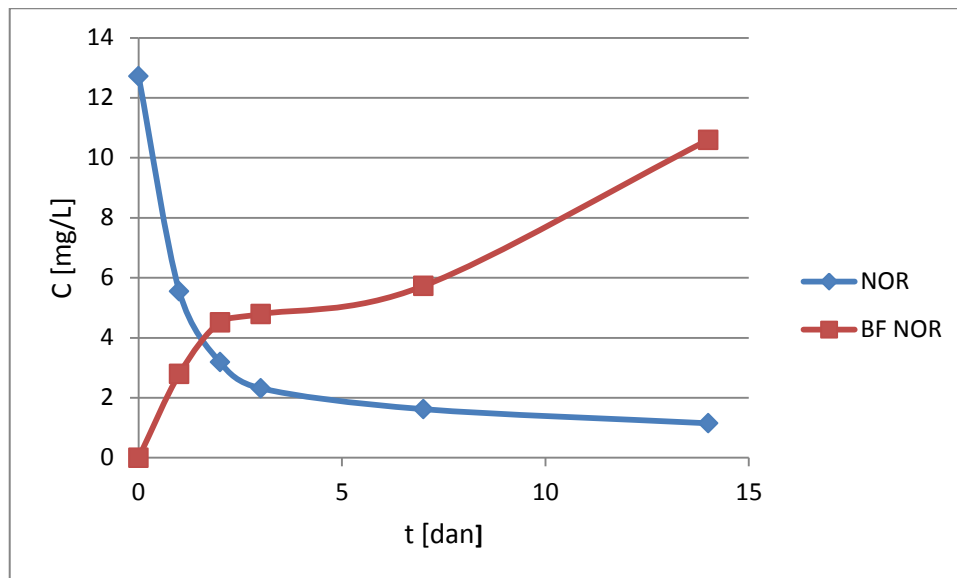
C [M]	1 M HCl		0,5 M HCl		0,2 M HCl		0,1 M HCl	
BF (%), BD (%)	% BF	% BD	% BF	% BD	% BF	% BD	% BF	% BD
DIA	59	59	63	71	55	85	55	97
NOR	100	9	78	12	/	/	37	22
LOR	50	0	37	12	16	25	13	36
BRO	40	4	35	9	32	18	30	27
NIT	80	6	46	5	21	4	20	7
KLO	102	8	62	4	87	4	100	32

/ - ni podatka zaradi tehničnih težav

Pri večini BD v raztopinah NaOH oz. HCl različnih koncentracij opazimo vsaj majhen delež razpada preko poti BF. Za NOR, NIT in KLO je to prevladujoča pot razpada pri nižjih koncentracijah NaOH, za BRO pa tudi pri višjih koncentracijah NaOH. DIA, NOR, in KLO v HCl razpadajo v velikem obsegu preko poti BF. LOR v NaOH razpada po drugi poti, saj smo zaznali razpadne produkte, ki po t_r niso ustrezali BF LOR. DIA in KLO v velikem obsegu razpadata preko poti BF v kislem okolju in v raztopinah NaOH nižjih koncentracij (0,1 in 0,2 M). BRO v bazičnem okolju razpada izključno preko BF poti, v kislem pa le do 40 %. Za NIT je težko opredeliti v katerem mediju razpad poteka obsežneje preko poti BF. Vsekakor je prevladujoča pot razpada NIT preko BF pri nižjih koncentracijah NaOH. Morda je enako pri višjih koncentracijah NaOH, vendar so pogoji preostri in pride do zelo hitrega razpada BF NIT do sekundarnih razpadnih produktov in posledično do navideznega manjšega obsega razpada preko poti BF.

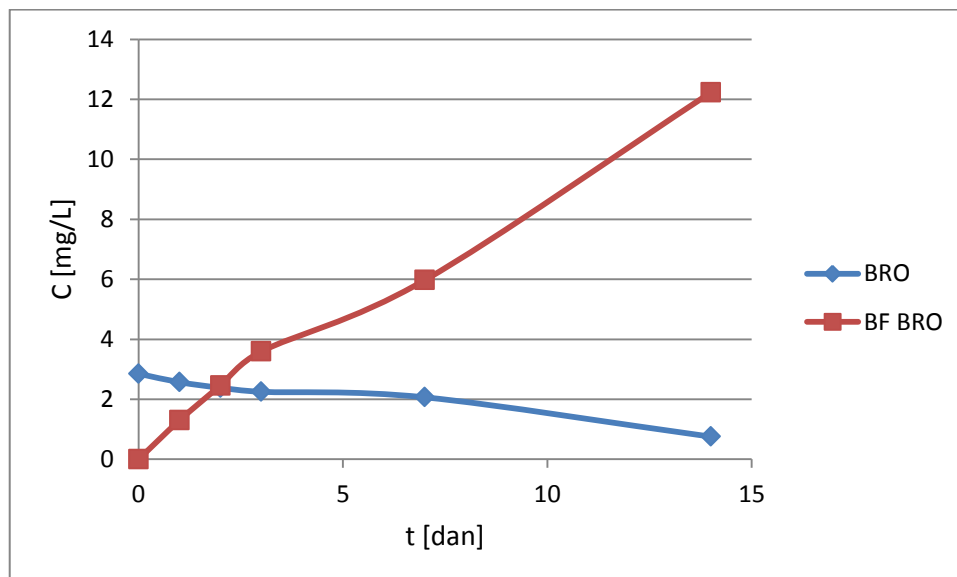
Na slikah 24, 25 in 26 je predstavljen razpad NOR, BRO in NIT ter nastanek pripadajočih BF v 0,2 M raztopini HCl pri 40 °C. S slikami smo prikazali različne trende upada koncentracije BD in vzporednega nastanka pripadajočih BF skozi časovno obdobje 14 dni.

Za NIM nismo imeli standarda pripadajočega BF, zato je rezultat podan kot upad odziva namesto upada koncentracije.



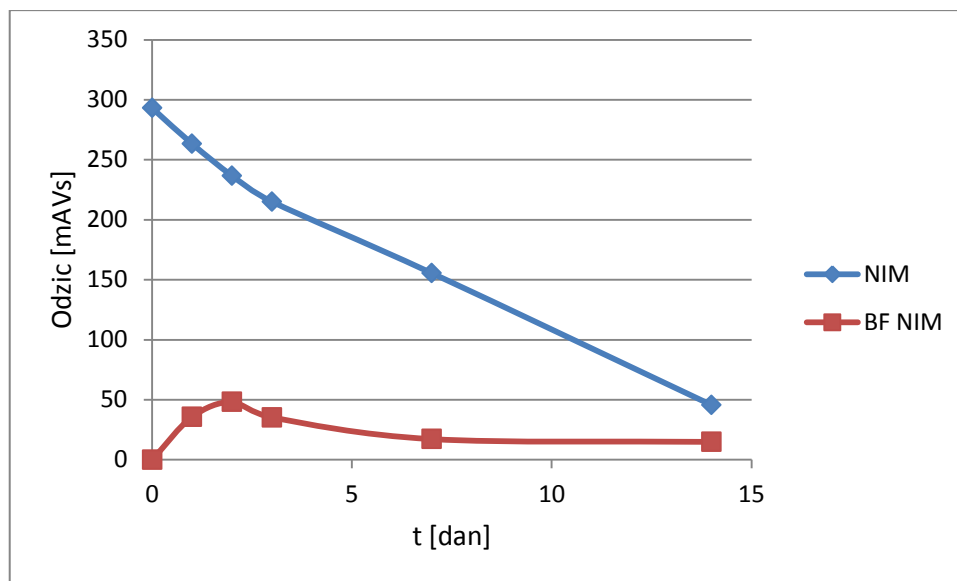
Slika 24: Upad koncentracije NOR in nastanek BF NOR v 0,2 M raztopini HCl pri 40 °C

Iz slike 24 je razvidno, da takoj po upadu koncentracije NOR pride do hkratnega nastanka BF NOR, ki se po treh dneh nekoliko upočasni. Podobno se obnaša tudi DIA.



Slika 25: Upad koncentracije BRO in nastanek BF BRO v 0,2 M raztopini HCl pri 40 °C

BRO v kislih pogojih razpade zelo hitro že ob času $t = 0$, saj je bila dejanska začetna koncentracija BRO v raztopini 20 mg/L. Nato se razpad BRO nekoliko upočasni. Koncentracija pripadajočega BF narašča skoraj linearno.



Slika 26: Upad koncentracije NIM in glavnega razpadnega produkta v 0,2 M raztopini HCl pri 40 °C

V primeru NIM lahko na sliki 26 opazimo, da po dveh dneh nastane največ glavnega razpadnega produkta, nato pa se zmanjšuje. Podobno se obnašajo NIT, FLU in KLO, vendar je v primeru KLO največ pripadajočega BF ob času $t = 0$. Zato sklepamo na nestabilnost nastalega razpadnega produkta. Razlog za tovrstno nestabilnost BF je posledica prisotnosti skupine $-\text{NO}_2$ na mestu R_7 pripadajočih BD, ki ne vpliva samo na njihovo (ne)stabilnost ampak tudi na (ne)stabilnost BF, kar potrjujejo tudi rezultati iz preglednic XXXV in XXXVI, kjer je pri visokih koncentracijah NaOH oz. HCl izračunan delež poti razpada preko BF značilno nižji za NIT in KLO.

5 SKLEPI

V sklopu magistrskega dela smo razvili in optimizirali metodo HPLC za sočasno kvantitativno vrednotenje enajstih BD in šestih pripadajočih BF:

- Analizno metodo smo validirali v skladu s smernicami ICH in potrdili njeno selektivnost, linearnost, ponovljivost, točnost in robustnost.
- Selektivnost metode smo dodatno potrdili med študijo stabilnosti, saj so bili kromatografski vrhovi BD ustrezno ločeni od kromatografskih vrhov njihovih razpadnih produktov.
- Metoda omogoča vrednotenje BD v stresnih vzorcih raztopin NaOH oz. HCl različnih koncentracij (od 0,1 do 1 M).

Ugotovitve stresne študije stabilnosti BD:

- Upad koncentracije vseh BD najboljše opisuje kinetika 1. reda.
- Ugotovili smo linearno zvezo med temperaturo in konstantami hitrosti razpada za DIA, BRO in NOR (R^2 Arrheniusovih premic $> 0,98$).
- Na podlagi podobnih aktivacijskih energij lahko sklepamo na enake mehanizme razpada DIA, LOR, BRO in NOR.
- Za BRO in NOR obstaja linearna povezava med konstantami hitrosti razpada BD in koncentracijami raztopin NaOH ($R^2 > 0,99$).
- Za NOR, LOR in FLU obstaja linearna povezava med konstantami hitrosti razpada in koncentracijami raztopin HCl ($R^2 > 0,98$).
- Vsi BD razen BRO so izrazito stabilnejši v kislem kot v bazičnem okolju.
- Najstabilnejši BD v obeh medijih je MED.
- Najmanj stabilni BD so NIT, FLU, NIM in KLO.

S primerjavo konstant hitrosti razpada oz. upadom koncentracije BD, ki se razlikujejo samo v eni funkcionalni skupini, smo opredelili vpliv posameznih funkcionalnih skupin na stabilnost BD:

- Skupina $-CH_3$ na mestu R_1 stabilizira molekulo zaradi pozitivnega induktivnega učinka.
- Odsotnost skupine $=O$ na mestu R_2 (MED) močno stabilizira molekulo, saj je skupina $=O$ ključna za hidrolizo 1,2-amidne vezi.

- Skupina -OH na mestu R_3 destabilizira molekulo zaradi negativnega induktivnega učinka.
- Skupina -NO_2 v primerjavi s halogeni na mestu R_7 zelo destabilizira molekulo, saj zelo privlači elektrone in tako zmanjša elektronsko gostoto celotnega sistema. Na ta način se poveča možnost nukleofilnih napadov na mestu 2.
- Dušik na mestu X poveča obseg hidrolize 4,5-azometinske vezi, saj polarizira pozitiven naboj po piridinskem obroču in zato poveča možnost nukleofilnih napadov na mestu 5. Ta vpliv je zelo izrazit v kislem okolju.
- Halogeni na mestu Y stabilizirajo 4,5-azometinsko vez, saj z resonančnim efektom polarizirajo negativen naboj na benzenovem obroču.
- Z uporabo Hammettove in Taftove metodologije smo ugotovili linearno povezavo med prispevki funkcionalnih skupin nekaterih BD in njihovimi konstantami hitrosti razpada ($R^2 > 0,99$).

Pri opredelitvi mehanizma razpada smo obravnavali BD za katere smo imeli pripadajoče standarde BF ter prišli do naslednjih ugotovitev:

- Za NOR, NIT in KLO je prevladujoča pot razpada do pripadajočih BF pri nižjih koncentracijah NaOH, za BRO pa tudi pri višjih koncentracijah NaOH;
- BRO v bazičnem okolju razpada izključno preko poti BF, v kislem pa le do 40 %.
- DIA in KLO v velikem obsegu razpadata preko poti BF v kislem okolju in v raztopina NaOH nižjih koncentracij (0,1 in 0,2 M).
- LOR v NaOH razpada po drugi poti, saj smo zaznali razpadne produkte, ki niso ustrezali BF LOR.
- Poleg BD so tudi pripadajoči BF s skupino -NO_2 na mestu R_7 zelo nestabilni (predvsem v bazičnem), kar vpliva na oceno mehanizma razpada.

6 LITERATURA

- 1) López-Muños F, Álamo C, García-García P: The discovery of chlórdiazepoxide and the clinical introduction of benzodiazepines: Half a century of anxiolytic drugs. *Journal of anxiety disorders* 2011; 25: 554-62.
- 2) Siegel JG, Agranoff WB, Albers WR, Fisher KS, Uhler DM: *Basic neurochemistry*, 6th edition, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1999.
- 3) Sigel E, Steinmann ME: Structure, function and modulation of GABA(A) receptors. *The journal of biological chemistry* 2012.
- 4) University of Pittsburgh, Department of pharmacology and chemical biology <http://www.pharmacology.us/Faculty/TijaJacob> (dostop oktober 2015)
- 5) Lemke LT, Williams AD, Roche FV, Zito SW: *Foye's principles of medicinal chemistry*, 7th edition, Wolters Kluwer Health in Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2012: 448-85.
- 6) Griffin EC, Kaye MA, Bueno RF, Kaye DA: Benzodiazepine pharmacology and central nervous system-mediated effects. *The Ochsner journal* 2013; 13: 214-23.
- 7) Offermanns S, Rosenthal W: *Encyclopedia of molecular pharmacy*, 2nd edition, Springer, New York, 2008: 251-54.
- 8) Johnson AB: *Addiction medicine*, Springer, New York, 2011: 319-23.
- 9) Pandi-Permul SR, Monti JM: *Clinical pharmacology of sleep*, BirghäuseVerlag, Basel, 2006: 211-13.
- 10) Vanin JR, Helsley JD: *Anxiety disorders*, Humana Press, New Jersey, 2008: 84-9.
- 11) Ashton H: Benzodiazepine dependence and withdrawal: an update. *Northern regional health authority drug newsletter* 1985; 31.
- 12) Remiaš N: *Uporaba LC-MS pri identifikaciji benzodiazepinov*. Diplomaska naloga, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2007.
- 13) Dale MM, Haylett DG: *Pharmacology condensed*, 2nd edition, Churchill Livingstone, Edinburgh, 2009: 88-90.
- 14) Holbrook AM, Crowther R, Lotter A: The role of benzodiazepines in the treatment of insomnia. *Journal of the American geriatrics society* 2001; 49: 824-26.
- 15) Morin CM, Bélanger L, Bernier F: Correlates of benzodiazepine use in individuals with insomnia. *Sleep medicine* 2004; 5: 457-62.

- 16) Vasile RG, Bruce SE, Goisman RM, Pagano M, Keller MB: Results of a naturalistic longitudinal study of benzodiazepines and SSRI use in the treatment of generalized anxiety disorder and social phobia. *Depression and anxiety* 2005; 22: 59-67.
- 17) Berkowitz R, Koyfman A: What is the best first-line agent for benzodiazepine-resistant convulsive status epilepticus. *Annals of emergency medicine* 2014; 64: 656-67.
- 18) Rosenberg HC: Differential expression of benzodiazepine anticonvulsant cross-tolerance according to time following flurazepam or diazepam treatment. *Pharmacology biochemistry and behavior* 1995; 51: 363-68.
- 19) Chou R: Pharmacological management of lower back pain. *Drugs* 2010; 70: 387-402.
- 20) Carstensen JT, Rhodes C: *Drug stability Principles and practices*, Third edition, Marcel Dekker, New York, 2000.
- 21) Bajaj S, Singla D, Sakhuja N: Stability testing of pharmaceutical products. *Journal of applied pharmaceutical science* 2012; 2: 129-38.
- 22) Yoshioka S, Valentino JS: *Stability of drugs and dosage forms*, Springer, New York, 2000.
- 23) Specifications: test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances Q6A, dostopno preko http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q6A/Step4/Q6Astep4.pdf (dostop oktober 2015).
- 24) Huynh-Ba K: *Handbook of stability testing in pharmaceutical development*, Springer, New York, 2009.
- 25) US Pharmacopeia, Volume number 29, Ch. 05, dostopano preko http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c1191.html (dostop oktober 2015).
- 26) Roškar R: *Vaje iz stabilnosti zdravil. Skripta za vaje*, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2013.
- 27) *Europeina Pharmacopoeia*, 6th edition, Council of Europe, Strasbourg, 2007.
- 28) Huynh-BA K: *Pharmaceutical stability testing to support global markets*, Springer, New York, 2010.
- 29) Ahuja S, Scypinski S: *Handbook of modern pharmaceutical analysis*, Academic Press, San Diego, 2001.
- 30) Singh R, Renham Z: Current trends in forced degradation study for pharmaceutical product development. *J Pharm Educ Res* 2012; 1: 54-63.

- 31) Khan MS, Akhtar N: Regulation of stability studies to enhance the efficiency of drug registration to regulatory authorities. Archives of Pharmacy Practice 2015; 3: 48-57.
- 32) ICH climatic zones, dostopano preko <http://q1scientific.com/stability-storage-services/ich-climatic-zones/#> (dostop oktober 2015).
- 33) Guidance for industry Q1A(R2) stability testing, dostopano preko <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm073369.pdf> (dostop oktober 2015).
- 34) SADC guideline for stability testing, dostopano preko http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ABOUT_ICH/Organisation/SADC/Guideline_for_Stability_Studies.pdf (dostop oktober 2015).
- 35) Klick S, Muijselaar PG, Waterval J: Toward a generic approach for stress testing of drug substances and drug products. Pharmaceutical technology 2005: 48-66.
- 36) Blessy M, Patel RD, Prajapati PN, Agrawal YK: Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs. Journal of pharmaceutical analysis 2014; 4: 159-65.
- 37) Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2), dostopano preko http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2_Guideline.pdf (dostop oktober 2015).
- 38) Monajjemzadeh F, Farjami A: Common problems in stress testing of pharmaceutical preparations. Journal of molecular pharmaceuticals & organic process research 2014; 3: 1-2.
- 39) Photostability testing of new drug substances and products Q1B, dostopano preko http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1B/Step4/Q1B_Guideline.pdf (dostop oktober 2015).
- 40) Baertschi SW: Pharmaceutical stress testing, Taylor and Francis group, Boca Raton, 2005.
- 41) Chen B, Zhang T, Bond T, Gan Y: Development of quantitative structure activity relationship (QSAR) model for disinfection byproduct (DBP) research: A review of methods and resources. Journal of hazardous materials 2015; 299: 260-62.
- 42) Puzyn T, Leszczynski J, Cronin MTD: Recent advances in QSAR studies, Springer, New York, 2010: 3-6.
- 43) DeRuiter J: GABA receptor ligands and the benzodiazepines. Principles of drug action 2004; 2: 1-27.

- 44) Shorter J: Correlation analysis of organic reactivity, Research study press a division of John Wiley & Sons ltd., Chichester, 1982.
- 45) Kunal R, Sengupta C, De AU: Theoretical aspect of rational drug design. Journal of scientific & industrial research 2001; 60: 699-716.
- 46) Tišler M: Organska kemija, Državna založba Slovenije, Ljubljana, 1991.
- 47) Michigan state university, Department of chemistry, dostopano preko <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/enrgtop.htm> (dostop oktober 2015).
- 48) Validation of analytical procedures Q2(R1), dostopano preko http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf (dostop oktober 2015).
- 49) The ultimate guide to HPLC/UHPLC reversed phased selectivity, dostopano preko <https://www.phenomenex.com/Info/WebDocumentServe/reversedguide.pdf> (dostop oktober 2015).
- 50) Kazakevich Y, Lobrutto R: HPLC for pharmaceutical scientists, John Wiley & Sons, New Jersey, 2007.