

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Jelena Đ. Maksić

**KARAKTERIZACIJA SISTEMA
TEČNE HROMATOGRFIJE
HIDROFILNIH INTERAKCIJA SA UV I
MS/MS DETEKCIJOM U ANALITICI I
BIOANALITICI OLOPATADINA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Jelena Đ. Maksić

**CHARACTERIZATION OF
HYDROPHILIC INTERACTION LIQUID
CHROMATOGRAPHY SYSTEM WITH
UV AND MS/MS DETECTION IN
ANALYTICS AND BIOANALYTICS OF
OLOPATADINE**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Komisija

Dr Biljana Stojanović, *vanredni profesor, mentor*

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Katedra za analitiku lekova

Dr Miroslav Knežević, *vanredni profesor, mentor*

Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

Katedra oftalmologije

Dr Mirjana Medenica, *redovni profesor u penziji, član*

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Katedra za fizičku hemiju i instrumentalne metode

Datum odbrane

Beograd, _____

ZAHVALNICA

Doktorska disertacija urađena je na Katedri za analitiku lekova i Katedri za fizičku hemiju i instrumentalne metode Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Mentoru na doktorskim i specijalističkim studijama prof. dr Biljani Stojanović iskazujem neizmernu zahvalnost za nesebičnu stručnu pomoć i prijateljsku podršku tokom realizacije svih segmenata doktorske disertacije, kao i tokom mog celukopnog dosadašnjeg profesionalnog usavršavanja.

Srdačno se zahvaljujem prof. dr Miroslavu Kneževiću na neposrednom angažovanju i korisnim sugestijama prilikom sprovođenja farmakokinetičke kliničke studije u Klinici za oftalmologiju Kliničkog centra Srbije.

Prof. dr Mirjani Medenici želim iskreno da se zahvalim na zalaganju i dragocenim savetima koji su omogućili uspešno usmeravanje izrade i oblikovanja disertacije.

Doktorsku disertaciju posvećujem tati i mami, koji su svojim ličnim i profesionalnim primerom, bezuslovnom ljubavlju i podrškom doprineli postizanju svih mojih uspeha!

Karakterizacija sistema tečne hromatografije hidrofilnih interakcija sa UV i MS/MS detekcijom u analitici i bioanalitici olopatadina

Rezime

Cilj doktorske disertacije bio je da se kroz sveobuhvatnu karakterizaciju sistema tečne hromatografije hidrofilnih interakcija (eng. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* – HILIC) sa UV (eng. *Ultraviolet*) i MS/MS (eng. *Mass Spectrometry/Mass Spectrometry*) detekcijom unapredi analitika i bioanalitika olopatadina.

U dosadašnjoj naučnoj literaturi HILIC sistem je nedovoljno ispitivan primenom metodologije eksperimentalnog dizajna (eng. *Design of Experiments* – DoE). Takođe, mogućnost analize amfoternih jedinjenja sa cviterjonskom strukturom, kao i geometrijskih izomera pomoću HILIC tehnike još uvek je nedovoljno proučena. U prvom delu doktorske disertacije predstavljen je razvoj nove HILIC metode sa UV detekcijom za istovremeno određivanje olopatadina, njegove nečistoće *E* izomera i benzalkonijum-hlorida u kapima za oči uz podršku savremene hemometrijske strategije. Na osnovu podataka iz preliminarnih studija odabrana je cijanopropil silikagel kolona i definisani su kvantitativni faktori sa najvećim uticajem na hromatografsku analizu pomenutih jedinjenja. Zatim je, u cilju kompletne karakterizacije retencionog ponašanja ispitivanih jedinjenja u složenom HILIC sistemu i postavljanja robusnog optimuma metode, uspostavljena adekvatna matematička zavisnost kritičnih faktora od razmatranih odgovora sistema primenom *Box–Behnken* dizajna. Optimalni hromatografski uslovi razdvajanja identifikovani su korišćenjem unapređenog postupka pretrage čvorova mreže. Na kraju je predložena metoda uspešno validirana, čime je pokazana njena pogodnost za rutinsku kvantitativnu analizu geometrijskih izomera olopatadina i konzervansa u farmaceutskoj formulaciji.

U sledećoj fazi doktorske disertacije ispitana je mogućnost primene postavljene HILIC metode sa UV detekcijom za praćenje stepena degradacije olopatadina pod uticajem brojnih *stres* faktora, kao i za određivanje kinetike njegove razgradnje. Na osnovu rezultata sprovedenih *studija forsirane degradacije* zaključeno je da analit ne podleže termolizi i hidrolizi u baznoj sredini, ali da je relativno nestabilan u kiseloj sredini, kao i u prisustvu jakog oksidacionog sredstva. Ovim unapređenim postupkom za sagledavanje stabilnosti olopatadina obezbeđeno je adekvatno praćenje polarnijih degradacionih proizvoda i proširena su naučna saznanja o njegovoj osnovnoj hemijskoj stabilnosti u kratkom vremenskom intervalu. Pored toga, tumačenjem neophodnih parametara kinetike reakcije degradacije olakšano je razumevanje mehanizma razgradnje olopatadina i stečen je bolji uvid u njegov degradacioni profil.

U nastavku ovog naučnog istraživanja, povezivanjem HILIC-UHPLC (eng. *Ultra High Performance Liquid Chromatography*) sistema s tandem masenim detektorom sa ESI (eng. *Electrospray Ionization*) jonskim izvorom, postignut je razvoj prve veoma osetljive i selektivne metode namenjene za brzu kvalitativnu i kvantitativnu analizu olopatadina u malim zapreminama humanih suza. Najpre je testiran uticaj značajnih parametara masene detekcije i određene su njihove optimalne vrednosti u cilju dobijanja maksimalnog intenziteta signala praćenih tranzicija analita. Zatim je izvršena sveobuhvatna karakterizacija i predviđanje hromatografskog ponašanja olopatadina na BEH (eng. *Ethylene Bridged Hybrid*) amidnoj stacionarnoj fazi pomoću sistematičnog hemometrijskog pristupa. Primenjeni *Box-Benken* dizajn omogućio je građenje odgovarajućih empirijskih modela koji su obezbedili detaljnu kvantitativnu procenu efekta izabranih pojedinačnih faktora i njihovih interakcija na posmatrane odgovore sistema. Za pronalaženje globalnog optimuma odabrana je numerička tehnika multikriterijumskog pristupa optimizaciji. Relativno jednostavna metoda precipitacije proteina u prisustvu acetonitrila definisana je kao pogodna procedura pripreme uzoraka suza kojom je postignuta efikasna ekstrakcija ispitivanog leka, kao i uklanjanje svih potencijalno interferirajućih komponenti iz matriksa.

Konačno, dobijanje pouzdanih rezultata bioanalitičke HILIC metode sa MS/MS detekcijom potvrđeno je postupkom njene validacije u skladu sa zahtevima važeće FDA (eng. *Food and Drug Administration*) smernice.

U poslednjem delu doktorske disertacije prikazana je primena kreirane HILIC–ESI/MS/MS metode za praćenje malih koncentracija olopatadina u uzorcima suza prikupljenim od pacijenata *Klinike za očne bolesti Kliničkog centra Srbije*, kao i procena njegovog okularnog farmakokinetičkog profila. Detaljno planirana prospektivna klinička studija odobrena je od strane Etičkog komiteta *Kliničkog centra Srbije*. Kao tehnika izbora za validno uzorkovanje humanih suza upotrebljena je indirektna metoda pomoću Širmerovih test traka kojom je postignuto prikupljanje zadovoljavajuće zapremine uzoraka biološkog materijala na neinvanzivan način. Za određivanje okularne farmakokinetike korišćen je jednodimenzionalni matematički model prvog reda koji je adekvatno opisao zavisnost izmerene koncentracije analita od vremena uzorkovanja. Potvrđeno je da je postavljena HILIC metoda sa MS/MS detekcijom efikasna za pouzdano određivanje nivoa olopatadina u ograničenim zapreminama humanih suza za vreme kliničke upotrebe, kao i za tačno predviđanje i karakterizaciju njegovog farmakokinetičkog ponašanja u oku. Kako do sada nije istraživano u humanim suzama, stečeni su naučno relevantni rezultati koji su omogućili uvid u dužinu prisustva ispitivanog leka u očnoj vodici, kao i u proces njegove eliminacije iz tkivnih struktura oka. Na taj način, opravdana je učestalost predloženog režima doziranja 0,1% m/v oftalmološkog rastvora olopatadina, kao i njegova efikasnost i bezbednost u terapiji alergijskog konjuktivitisa.

Ključne reči: olopatadin; tačna hromatografija hidrofilnih interakcija; eksperimentalni dizajn; optimizacija; studije forsirane degradacije; tandem masena spektrometrija; humane suze; okularna farmakokinetika

Naučna oblast: Farmaceutska hemija

Uža naučna oblast: Analitika lekova

UDK broj: 615.457.011:543.544.122(043.3)

***Characterization of hydrophilic interaction liquid chromatography
system with UV and MS/MS detection in analytics
and bioanalytics of olopatadine***

Abstract

The goal of the doctoral dissertation was to improve analytics and bioanalytics of olopatadine through comprehensive characterization of hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) system with UV (ultraviolet) and MS/MS (mass spectrometry/mass spectrometry) detection.

In the previous scientific literature, HILIC system has been poorly examined by the application of Design of Experiments (DoE) methodology. Also, the possibility of analysis of amphoteric compounds with zwitterionic structure and geometric isomers by HILIC technique has been still insufficiently studied. In the first part of the doctoral thesis, it was presented the development of a new HILIC method with UV detection for the simultaneous determination of olopatadine, its impurity *E* isomer and benzalkonium chloride in the eye drops with the support of contemporary chemometrical strategy. On the basis of the data from the preliminary studies, cyanopropyl silica column was selected and quantitative factors with the greatest influence on chromatographic analysis of the mentioned compounds were defined. Then, it was established the adequate mathematical dependence of the critical factors on considered system responses by using Box–Behnken design in order to fully characterize retention behavior of the investigated compounds in complex HILIC system and set robust optimum of the method. The optimal chromatographic separation conditions were identified by employing an improved grid point search procedure. At the end, the proposed method was successfully validated thereby demonstrating its suitability for routine quantitative analysis of olopatadine geometric isomers and preservative in the pharmaceutical formulation.

In the next phase of the doctoral dissertation, it was investigated possibility of using the proposed HILIC method with UV detection for the monitoring of olopatadine degree of degradation under the influence of numerous stress factors, as well as for the determining kinetics of its degradation. Based on the results of the conducted forced degradation studies, it has been concluded that analyte was not subject to thermolysis and hydrolysis in alkaline medium, but that it was relatively unstable in acidic medium, as well as in the presence of a strong oxidation agent. Adequate monitoring of polar degradation products was ensured by this advanced procedure for reviewing stability of olopatadine and scientific cognitions of its basic chemical stability in a short time interval was expanded. In addition, by interpreting the necessary kinetic parameters of degradation reaction, it was facilitated the understanding of olopatadine degradation mechanism and better insight into its degradation profile was gained.

In the continuation of this scientific research, by coupling HILIC-UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography) system with tandem mass detector with ESI (Electrospray Ionization) ion source, the development of the first highly sensitive and selective method for rapid qualitative and quantitative analysis of olopatadine in small volumes of human tears was achieved. Firstly, the influence of significant parameters of mass detection was tested and their optimal values were determined in order to obtain maximal signal intensities of analyte followed transitions. Subsequently, the comprehensive characterization and prediction of the chromatographic behavior of olopatadine on BEH (Ethylene Bridged Hybrid) amide stationary phase was performed by utilization of systematic chemometric approach. The applied Box–Behken design enabled the construction of appropriate empirical models that provided detailed quantitative assessment of the effect of selected individual factors and their interactions on observed system responses. The numerical technique of multi-objective optimization approach was selected for locating the global optimum. The relatively simple protein precipitation method in the presence of acetonitrile was defined as a suitable procedure for the preparation of tear samples by which effective extraction of the tested drug and removing all potentially interfering matrix components was achieved.

Finally, obtaining reliable results of the bioanalytical HILIC method with MS/MS detection was confirmed by validation process in accordance with requirements of the FDA (Food and Drug Administration) guidelines.

In the final part of the doctoral dissertation, it was presented the application of the created HILIC–ESI/MS/MS method for the monitoring of olopatadine small concentrations in the tear samples which were collected from patients of the Clinic for eye diseases of the Clinical Centre of Serbia, as well as for the assessment of its ocular pharmacokinetic profile. The detailed prospective clinical study was approved by the Ethics Committee of the Clinical Centre of Serbia. As a technique of choice for the sampling of human tears, it was utilized an indirect method using the Schirmer test strip which resulted in the collection of satisfactory volume of biological material samples in a non-invasive manner. For the determination of ocular pharmacokinetics, the one compartment first-order mathematical model was used that adequately described the dependence of the measured analyte concentration from the sampling time. It has been confirmed that the set HILIC method with MS/MS detection was efficient for reliable determination olopatadine level in limited volumes of human tears during clinical use, as well as for precise prediction and characterization of its pharmacokinetic behavior in eye. How it has not been investigated in human tears until now, scientifically relevant results were obtained which provided insight into the length of presence of the examined drug in aqueous humor and also in its elimination process from the eye tissue structures. In that manner, the frequency of the proposed dosage regimen of olopatadine 0.1% m/v ophthalmic solution has been justified, as well as its efficacy and safety in treatment of allergic conjunctivitis.

Keywords: olopatadine; hydrophilic interaction liquid chromatography; experimental design; optimization; forced degradation studies; tandem mass spectrometry; human tears; ocular pharmacokinetics

Research area: Pharmaceutical chemistry

Specific research area: Drug analysis

UDK number: 615.457.011:543.544.122(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Tečna hromatografija hidrofilnih interakcija	1
1.1.1. Retencioni mehanizmi razdvajanja u HILIC sistemu	6
1.1.2. Mobilne faze u HILIC sistemu.....	7
1.1.3. Stacionarne faze u HILIC sistemu	9
1.1.3.1. Silikagel stacionarne faze	10
1.1.3.2. Neutralne stacionarne faze.....	12
1.1.3.3. Naelektrisane stacionarne faze	14
1.1.4. Tečna hromatografija hidrofilnih interakcija–masena spektrometrija ...	15
1.2. Analiza lekova u uzorcima humanih suza	18
1.2.1. Tehnike za prikupljanje uzoraka suza.....	19
1.2.2. Metode za pripremu uzoraka suza	20
1.3. Analitika i farmakologija olopatadina	21
1.3.1. Struktura i fizičko-hemijske osobine olopatadina.....	21
1.3.2. Ispitivanje stepena čistoće olopatadina	22
1.3.3. Pregled literature	24
1.3.4. Farmakodinamske osobine i okularni farmakokinetički profil olopatadina	33
2. CILJ RADA	36
3. EKSPERIMENTALNI DEO	37
3.1. Aparati, laboratorijski pribor, reagensi i matematičko-softverski sistem	37
3.2. Standardne supstance i farmaceutski oblik	39
3.3. Optimizacija razdvajanja geometrijskih izomera olopatadina i benzalkonijum-hlorida u HILIC sistemu sa UV detekcijom	39
3.3.1. Priprema rastvora standarda za <i>Box–Benhken</i> dizajn	39
3.3.2. Priprema mobilnih faza za <i>Box–Benhken</i> dizajn.....	40
3.3.3. Hromatografski uslovi.....	40
3.3.4. Hromatografski postupak.....	40

3.4. Validacija HILIC metode sa UV detekcijom za analizu geometrijskih izomera olopatadina i benzalkonijum-hlorida u kapima za oči.....	42
3.4.1. Hromatografski uslovi.....	42
3.4.2. Priprema rastvora za procenu selektivnosti metode.....	42
3.4.3. Priprema rastvora standarda za određivanje LOD i LOQ vrednosti za olopatadin <i>E</i> izomer i konzervans benzalkonijum-hlorid.....	43
3.4.4. Priprema rastvora standarda za procenu linearnosti metode.....	43
3.4.5. Priprema rastvora za procenu tačnosti metode	44
3.4.6. Priprema rastvora za procenu preciznosti metode	45
3.4.7. Priprema rastvora uzoraka <i>Pana</i> [®] kapi za oči.....	46
3.4.8. Hromatografski postupak	46
3.5. Ispitivanje stabilnosti olopatadina pod uslovima forsirane degradacije primenom HILIC metode sa UV detekcijom.....	46
3.5.1. Hromatografski uslovi.....	46
3.5.2. Priprema rastvora standarda za izvođenje studija forsirane degradacije.....	47
3.5.3. Hromatografski postupak	47
3.6. Optimizacija HILIC sistema sa MS/MS detekcijom.....	48
3.6.1. Optimizacija uslova tandem masenog spektrometra.....	48
3.6.2. Optimizacija hromatografskih uslova u HILIC-UHPLC sistemu.....	49
3.6.2.1. Priprema rastvora standarda za <i>Box–Benhken</i> dizajn	49
3.6.2.2. Priprema mobilnih faza za <i>Box–Benhken</i> dizajn	49
3.6.2.3. Hromatografski uslovi	49
3.6.2.4. Hromatografski postupak	50
3.7. Optimizacija procedure pripreme uzoraka humanih suza	51
3.7.1. Priprema smeše za razvoj optimalne metode pripreme uzoraka suza....	51
3.7.2. Razvoj optimalne metode pripreme uzoraka suza	51
3.8. Priprema kalibracionih standarda i priprema uzoraka za proveru kvaliteta	52
3.9. Validacija HILIC metode sa MS/MS detekcijom za određivanje olopatadina u humanim suzama	53
3.9.1. Hromatografski uslovi.....	53

3.9.2. Uslovi tandem masenog spektrometra	53
3.9.3. Selektivnost.....	54
3.9.4. Osetljivost	54
3.9.5. Linearnost.....	55
3.9.6. Tačnost i preciznost	55
3.9.7. Prinos ekstrakcije	56
3.9.8. Efekat matriksa	56
3.9.9. Efekat prenošenja	56
3.9.10. Stabilnost.....	57
3.9.11. Hromatografski postupak.....	57
3.10. Primena HILIC–ESI/MS/MS metode u farmakokinetičkoj studiji za određivanje koncentracije olopatadina u humanim suzama.....	58
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	59
4.1. Razvoj HILIC metode UV detekcijom za određivanje geometrijskih izomera olopatadina i benzalkonijum-hlorida u kapima za oči.....	59
4.1.1. Karakterizacija retencionog ponašanja analita u HILIC sistemu sa UV detekcijom i izbor optimalnih hromatografskih uslova	59
4.1.1.1. Preliminarna faza istraživanja	61
4.1.1.2. Primena metodologije eksperimentalnog dizajna.....	64
4.1.1.3. Multikriterijumski pristup robusnoj optimizaciji hromatografskog razdvajanja	75
4.1.2. Validacija HILIC metode sa UV detekcijom za kvantitativnu analizu Z i E izomera olopatadina i benzalkonijum-hlorida u kapima za oči.....	79
4.2. Ispitivanje olopatadina pod stres uslovima primenom HILIC metode sa UV detekcijom.....	83
4.2.1. Rezultati studija forsirane degradacije na olopatadinu	85
4.2.2. Određivanje kinetike reakcije degradacije olopatadina	89
4.3. Postavljanje HILIC metode sa MS/MS detekcijom za bioanalitiku olopatadina u humanim suzama	94
4.3.1. Optimizacija parametara masene detekcije.....	94
4.3.2. Karakterizacija hromatografskog ponašanja olopatadina u HILIC- UHPLC sistemu i definisanje optimalnih uslova razdvajanja.....	100

4.3.2.1. Preliminarne studije.....	100
4.3.2.2. Primena hemometrijskog pristupa.....	103
4.3.2.3. Definisanje optimalnih UHPLC uslova razdvajanja	110
4.3.3. Određivanje postupka pripreme uzorka humanih suza.....	113
4.3.4. Validacija HILIC–ESI/MS/MS metode za kvantitativnu analizu olopatadina u uzorcima suza.....	117
4.4. Primena razvijene HILIC–ESI/MS/MS metode u farmakokinetičkoj studiji za praćenje nivoa olopatadina u humanim suzama	126
4.4.1. Organizacija kliničkog ispitivanja za analizu olopatadina u humanim suzama	126
4.4.2. Rezultati kliničkog ispitivanja za merenje olopatadina u humanim suzama.....	129
5. ZAKLJUČAK.....	135
6. LITERATURA	138
7. PRILOG	151
8. BIOGRAFIJA AUTORA.....	155

1. UVOD

1.1. Tečna hromatografija hidrofilnih interakcija

Tečna hromatografija hidrofilnih interakcija (eng. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* – HILIC) je tehnika koja omogućava efikasno razdvajanje polarnih jedinjenja [1]. U HILIC sistemima primenjuju se polarne stacionarne faze u kombinaciji sa eluentom koji sadrži veliki udeo organskog rastvarača i mali procenat vodene faze, koja uglavnom uključuje dodatak pufera [2]. Začeci razvoja HILIC hromatografije datiraju iz sredine prošlog veka kada su naučnici *Martin* i *Synge*, za razdvajanje aminokiselina u koloni od silikagela, predložili upotrebu mobilne faze sastavljene od hloroforma i vode. Ovi naučnici pretpostavili su da je retencioni mehanizam razdvajanja analita zasnovan na raspodeli između sloja vode na stacionarnoj fazi i hloroforma u mobilnoj fazi [3]. U prošlosti HILIC metoda se prevashodno koristila za analizu izuzetno hidrofilnih komponenti velikih molekulskih masa, kao što su ugljeni hidrati, peptidi i proteini. *Andrew Alpert* je u naučnom radu, publikovanom 1990. godine, predložio akronim HILIC i primetio da naelektrisane bazne grupe izrazite hidrofilnosti imaju produženo zadržavanje u ovom sistemu. Takođe, smatrao je da retencioni mehanizam razdvajanja uglavnom podrazumeva raspodelu između sloja mobilne faze koji je bogat vodom i delimično imobilisan na površini kolone i ostatka mobilne faze [4].

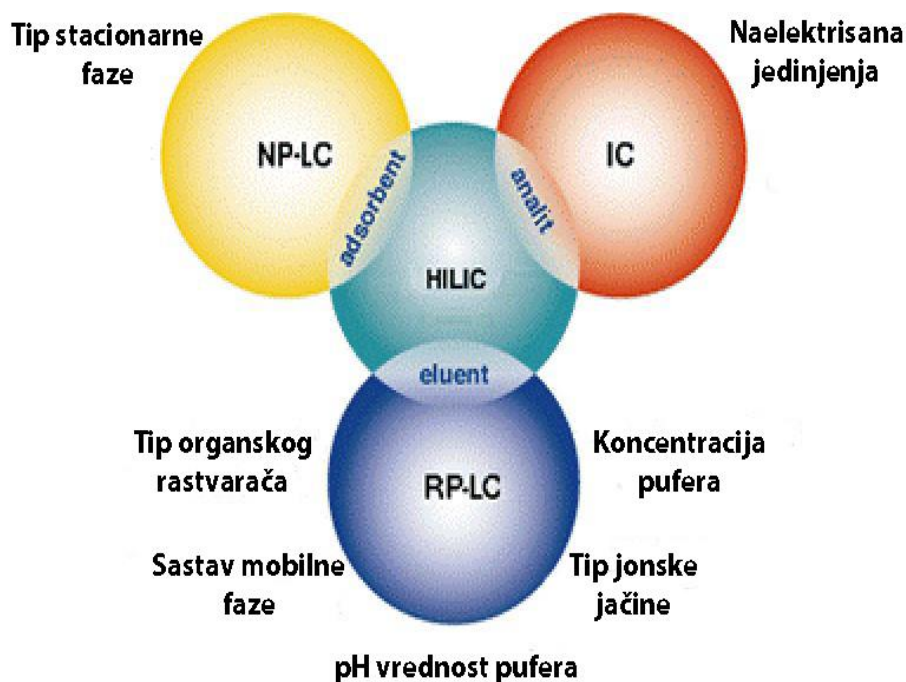
Klasične separacione tehnike, odnosno tečna hromatografija normalnih faza pod visokim pritiskom (eng. *Normal Phase High Performance Liquid Chromatography* – NP-HPLC) i reverzno-fazna tečna hromatografija pod visokim pritiskom (eng. *Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography* – RP-HPLC) nisu pružile zadovoljavajući uspeh u analizi brojnih polarnih jedinjenja. Naime, ispitivanje izuzetno polarnih molekula u NP-HPLC sistemu otežano je zbog njihovog snažnog vezivanja za površinu polarne stacionarne faze i slabe moći eluiranja nepolarnom mobilnom fazom. Dodatni problem vezan za ovaj tip hromatografije podrazumeva slabu rastvorljivost polarnih i jonizovanih jedinjenja u nepolarnim rastvaračima [5].

Takođe, rastvarači koji ulaze u sastav mobilne faze (npr. heksan, toluen, dihlormetan) otežavaju desolvataciju analita u jonskom izvoru sa elektrosprej jonizacijom (eng. *Electrospray Ionization* – ESI). Pored toga, neprihvatljivi su i sa ekološke tačke gledišta.

S druge strane, u RP-HPLC sistemu izrazito hidrofilne komponente (npr. ugljeni hidrati, mali polarni molekuli) pokazuju veoma slabo zadržavanje zbog velikog afiniteta za mobilnu fazu. Na taj način, polarne funkcionalne grupe ostvaruju dipol-dipol interakcije sa rastvaračem i postaju solvatisane. Kako nepolarna stacionarna faza ne može ostvariti sličan način vezivanja, analiti se eluiraju u blizini pika mobilne faze, tako da je njegovo međusobno razdvajanje praktično nemoguće [6]. Postoji nekoliko pristupa za analizu polarnih analita RP-HPLC tehnikom koji, i pored brojnih izmena u stacionarnoj i mobilnoj fazi, nisu dali značajne rezultate. U slučaju naelektrisanih polarnih supstanci, u RP mobilnu fazu mogu se dodati jon-par reagensi ili se može primeniti jonska hromatografija (eng. *Ion Chromatography* – IC). Međutim, jon-par reagensi, pre svega trifluorosirćetna kiselina, nisu kompatibilni sa masenim detektorom jer mogu smanjiti intenzitet ESI signala u pozitivnom modu (eng. *mode*), kao i u potpunosti suprimirati jonizaciju analita u negativnom modu [7]. U slučaju nanaelektrisanih veoma polarnih jedinjenja, upotrebom agenasa za derivatizaciju ova jedinjenja se mogu prevesti u hidrofobne molekule. Problemi koji se često javljaju prilikom ovog prilično zahtevnog procesa uključuju nastajanje neželjenih sporednih proizvoda, neadekvatno razdvajanje nastalih derivata, kao i značajnu nesigurnost u dobijene rezultate kvantitativne analize. Još jedan pristup za zadržavanje jedinjenja sa naelektrisanim funkcionalnim grupama i funkcionalnim grupama sa velikim afinitetom za građenje vodoničnih veza i dipol-dipol interakcija podrazumeva smanjenje udela organskog rastvarača. Međutim, mobilne faze sa velikim udelom vode obično daju nereproduktivna retencionna vremena, nedovoljnu efikasnost razdvajanja i značajno smanjuju intenzitet signala analita u masenom detektoru. Takođe, ovakvim pristupom "kvašenje" kolone postaje nezadovoljavajuće. Postoje brojni pokušaji modifikacije stacionarnih faza u cilju poboljšanja njihovog "kvašenja", ali do sada se nisu pokazali uspešnim [6].

Kroz brojna iskustva zaključeno je da najbolji način za ispitivanje polarnih jedinjenja predstavlja "obrnuta" reverzno-fazna hromatografija, odnosno tečna hromatografija hidrofилnih interakcija [1]. HILIC tehnika omogućava adekvatno zadržavanje veoma polarnih jedinjenja, a zbog većeg procenta organskog rastvarača u mobilnoj fazi i posledično njene manje viskoznosti, pokazuje bolju moć razdvajanja u poređenju sa RP-HPLC tehnikom.

HILIC tehnika sadrži određene karakteristike reverzno-fazne, normalno-fazne i jonske hromatografije i predstavlja značajnu alternativu pri izboru separacione tehnike u slučaju kada navedena tri tipa hromatografije poseduju određena ograničenja [6]. Šematski prikaz dat je na slici 1.



Slika 1. HILIC – kombinacija karakteristika tri glavne metode tečne hromatografije [1]

HILIC se može okarakterisati kao tip tečne hromatografije pod visokim pritiskom koji za razdvajanje koristi polarne i umereno polarne stacionarne faze (kolone od čistog ili hemijski modifikovanog silikagela), koje se takođe upotrebljavaju i u NP-HPLC tehnici [8]. Mobilna faza u HILIC sistemu podrazumeva smešu organskog rastvarača u koncentraciji većoj od 60% i najmanje 2,5% vode ili vodenog rastvora pufera.

Ova mobilna faza slična je eluentu kod RP-HPLC hromatografije, u pogledu organsko-vodenog karaktera i tipa organskog rastvarača (acetonitril, metanol) i pufera, a različita u pogledu sadržaja organskog rastvarača. Sličnost HILIC sistema sa IC ogleda se u činjenici da se i HILIC tehnikom uspešno mogu analizirati naelektrisana, odnosno jonizovana jedinjenja [1].

HILIC se danas smatra tehnikom izbora u ispitivanju nenaelektrisanih veoma polarnih farmaceutski aktivnih jedinjenja malih molekulskih masa koji predstavljaju veliki izazov u savremenoj farmaceutskoj analizi [9]. Nejonizovana polarna hidrofilna i amfifilna farmaceutska jedinjenja raspodeljuju se u sloj mobilne faze koji je bogat vodenom frakcijom i koji omogućava da se njihovo zadržavanje u koloni povećava bez nepoželjne derivatizacije ili dodatka jon-par reagenasa, karakterističnih za RP-HPLC tehniku. HILIC tehnika pokazala se uspešnom i u analizi baznih lekova, organskih kiselina malih molekulskih masa, kao i brojnih drugih naelektrisanih i neutralnih jedinjenja. Trend porasta naučnih publikacija koje proučavaju HILIC sistem u poslednjoj deceniji ukazuje da je značaj HILIC hromatografije u analizi farmaceutski aktivnih jedinjenja sve veći [10,11]. Pored praktičnog značaja u farmaceutskoj analizi, HILIC poseduje izuzetan potencijal i u oblasti bioanalitike, farmakokinetike, medicine, proteomike, glikomike, metabolomike, toksikologije, kao i tokom razvoja i ispitivanja novog leka. Pored lekova, drugi tipovi polarnih molekula koji su do sada bili analizirani u HILIC sistemima su aminokiseline, peptidi, proteini, monosaharidi, oligosaharidi, polisaharidi, nukleotidi, metaboliti, biomarkeri, alkaloidi i neki neorganski joni [12,13]. Mogućnost kombinovanja HILIC sistema s različitim tipovima detektora, kao što su ultravioletni (eng. *Ultraviolet* – UV), fotodiodni (eng. *Photodiode Array* – PDA), fluorescentni, refraktometrijski i maseni, dodatno proširuje spektar primene ove tehnike.

Prednosti i nedostaci HILIC tehnike, koji su uočeni u dosadašnjim naučnim istraživanjima, predstavljeni su u tabeli 1 [9].

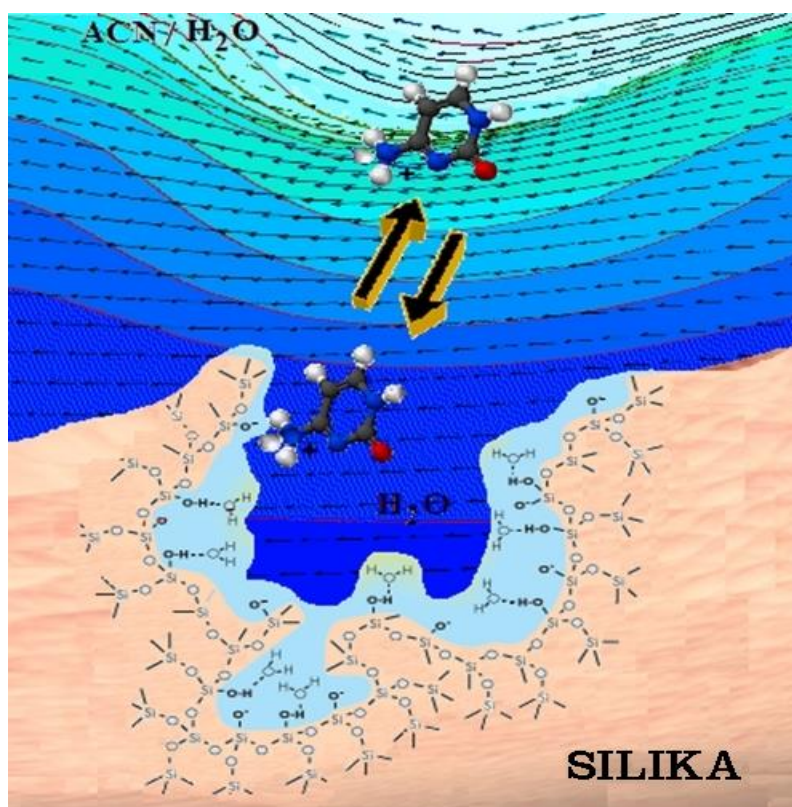
Tabela 1. Prednosti i nedostaci HILIC tehnike

<i>HILIC</i>	
<i>PREDNOSTI</i>	➤ Zadovoljavajući oblik pikova baznih jedinjenja
	➤ Povećana osetljivost u masenoj spektrometriji postignuta zahvaljujući velikom sadržaju organskog rastvarača u mobilnoj fazi, koji povećava efikasnost ESI izvora
	➤ Suprotan redosled eluiranja komponenata u poređenju sa RP-HPLC tehnikom, koji pruža dobru alternativu u pogledu selektivnosti
	➤ Mogućnost direktnog injektovanja ekstrakata pripremljenih metodom čvrsto-tečne ekstrakcije na C18 čvrstoj fazi, čime se sprečava gubitak uzorka i skraćuje vreme trajanja analize
	➤ Dobro zadržavanje polarnih jedinjenja, u odnosu na RP-HPLC tehniku
	➤ Zadovoljavajuća rastvorljivost polarnih jedinjenja u mobilnoj fazi, u odnosu na NP-HPLC tehniku
	➤ Razdvajanje i analiziranje različitih jona koji ulaze u sastav brojnih farmaceutskih preparata (npr. Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻ , Br ⁻)
	➤ Upotreba većeg protoka mobilne faze, a da pri tome pritisak i dalje ostane u dozvoljenim granicama
	➤ Mogućnost povezivanja sa RP-HPLC sistemom u cilju izvođenja 2-D separacija, što omogućava ispitivanje analita širokog spektra polarnosti
	<i>NEDOSTACI</i>
➤ Ekološki manje prihvatljiva mobilna faza u poređenju sa RP-HPLC tehnikom, ali značajno poželjnija u odnosu na NP-HPLC	
➤ Duže vreme potrebno za kondicioniranje kolona u poređenju sa RP-HPLC sistemom	
➤ Primena koja nije univerzalna kao u slučaju RP-HPLC (nepolarna i neutralna jedinjenja generalno pokazuju slabo zadržavanje u HILIC sistemu, kao i jonizovana kiselina jedinjenja zbog odvajanja jona od negativno naelektrisanih silanolnih grupa sa površine silikagela)	

1.1.1. Retencioni mehanizmi razdvajanja u HILIC sistemu

Retencioni mehanizmi razdvajanja u HILIC sistemu su veoma kompleksni i podrazumevaju kombinaciju raspodele, tj. rastvaranja i adsorpcije analita, kao i jonske interakcije analita sa negativno naelektrisanim silanilnim grupama na površini stacionarne faze silika kolone [14].

Prema *Alpertu*, u HILIC sistemu postoji sloj mobilne faze sačinjen pretežno od vodene frakcije i pri velikim koncentracijama organskog rastvarača, koji se adsorbuje na površinu stacionarne faze i ostaje imobilisan. Prvobitno predloženi retencioni mehanizam podrazumevao je da dolazi do raspodele jedinjenja između organskog dela mobilne faze i vodenog dela mobilne faze (slika 2). Kako bi se omogućila adekvatna zasićenost stacionarne faze, neophodno je da eluent sadrži minimum 2,5% vodene faze [4].



Slika 2. Ilustrovani prikaz raspodele jedinjenja između organskog dela mobilne faze i vodenog sloja na površini stacionarne faze [1]

Eluiranje jedinjenja usko je povezano sa debljinom vodenog sloja na površini silikagela. Sa povećanjem udela acetonitrila u mobilnoj fazi, smanjuje se debljina vodenog sloja na površini silikagela i produžava se zadržavanje polarnih jedinjenja. S druge strane, povećanjem udela vode u mobilnoj fazi, povećava se debljina vodenog sloja i smanjuje razlika u polarnosti organskog dela mobilne faze i vodenog sloja, pa se polarna jedinjenja brže eluiraju. Redosled eluiranja nepolarnih jedinjenja je obrnut [15].

Međutim, novija naučna istraživanja pokazuju da je u retencioni mehanizam razdvajanja u HILIC sistemu uključen i proces adsorpcije analita za površinu stacionarne faze, kao i jonska izmena analita sa negativno naelektrisanim silanolnim grupama na površini silikagela [16]. Na taj način, došlo se do zaključka da brojne interakcije mogu igrati važnu ulogu prilikom razdvajanja analita: vodonične veze, jonske interakcije, dipol-dipol interakcije, a ponekad i hidrofobne interakcije [17]. Mehanizam razdvajanja i tipovi interakcija zavise od više faktora, odnosno od prirode stacionarne faze, hromatografskih uslova i karakteristika analita.

1.1.2. Mobilne faze u HILIC sistemu

Zbog izuzetno složenog mehanizma razdvajanja, veliki broj faktora može uticati na retenciono ponašanje analita u HILIC sistemu. Ovi faktori, pre svega, uključuju sastav mobilne faze i tip stacionarne faze.

Mobilna faza u HILIC hromatografiji sastoji se od velikog udela organskog rastvarača koji se meša sa vodom i malog udela vodene faze. Vodena faza uglavnom sadrži pufer (amonijum-formijat, amonijum-acetat) i njena pH vrednost podešava se odgovarajućom kiselinom [4].

Odabir odgovarajućeg organskog rastvarača ključan je za postizanje adekvatnog razdvajanja komponenti u HILIC hromatografiji. Kako raste polarnost organskog rastvarača, a time i sposobnost učestvovanja u proton-donorskim i proton-akceptorskim interakcijama, povećava se njegova moć eluiranja (acetonitril < tetrahidrofuran < 2-propanol < etanol < metanol).

Smatra se da je acetonitril organski rastvarač izbora u HILIC sistemima [1]. Naime, acetonitril je najpogodniji i najviše korišćen rastvarač u HILIC hromatografiji zbog toga što, u poređenju sa ostalim rastvaračima, jedini omogućava odgovarajuće zadržavanje analita u koloni, kao i simetričan oblik pikova. S druge strane, metanol kao najpolarniji od pomenutih rastvarača, dovodi do slabog ili potpunog izostanka zadržavanja analita. Molekuli ovog protonskog rastvarača i vode takmiče se za vezivanje za površinu silikagela i međusobno grade vodonične veze. Ostali navedeni alkoholi takođe mogu ostvariti ove vrste interakcija, ali u mnogo manjoj meri zbog svoje manje polarnosti. Jedino acetonitril, kao neprotanski rastvarač, ne poseduje sposobnost građenja vodoničnih veza, što ga čini idealnim za primenu u HILIC modu. Brojni pokušaji da se on zameni sa manje toksičnim rastvaračem završili su se neuspehom. Opšte pravilo u HILIC sistemu jeste da se povećanjem udela organskog rastvarača, odnosno smanjenjem polarnosti eluenta, produžava zadržavanje polarnih analita u koloni [18].

Preporuka proizvođača HILIC kolona je da mobilna faza sadrži pufer. Puferi smanjuju elektrostatičku interakciju između naelektrisanih analita i deprotonovanih silanolnih grupa na površini stacionarnih faza. U naučnoj literaturi se naročito preporučuju amonijumove soli mravlje i sirćetne kiseline zbog njihove velike rastvorljivosti u acetonitrilu, odgovarajućeg pH opsega za većinu HILIC separacija, kao i činjenice da, zahvaljujući velikoj isparljivosti, olakšavaju desolvataciju analita u masenom detektoru sa ESI jonskim izvorom [19]. Amonijum joni ovih pufera kompetitivno se vezuju za negativno naelektrisanu površinu silikagel kolone. Puferi trifluorosirćetne kiseline omogućavaju dobro zadržavanje kiselih jedinjenja, pa se njihova upotreba upravo i preporučuje u analizi ovih komponenti. Naime, ovi puferi obezbeđuju male pH vrednosti pri kojima je jonizacija silanolnih grupa suzbijena. pH vrednost i jonska jačina pufera značajno utiču na retenciono ponašanje i selektivnost jonizujućih komponenti. Povećanjem koncentracije pufera u mobilnoj fazi smanjuje se retenciono vreme baznih jedinjenja. S druge strane, povećava se retenciono vreme kiselih jedinjenja zbog smanjenja elektrostatičkog odbijanja sa površinom silikagela. Promena koncentracije pufera generalno ne utiče na zadržavanje nepolarnih jedinjenja [9]. Puferi se najčešće dodaju u koncentraciji od 5 mmol L⁻¹ do 100 mmol L⁻¹, izraženo na ukupnu mobilnu fazu.

Dodatkom većih koncentracija iz prikazanog opsega izbegava se širenje pikova, kao i pojava nepravilnog oblika ili cepanja pikova, koji se često mogu javiti u HILIC hromatografiji [15].

pH vrednost mobilne faze (3,0–8,0) najčešće se podešava mravljom i sirćetnom kiselinom zbog njihove kompatibilnosti sa masenim detektorom. pH vrednost se koriguje tako da analiti budu prisutni u jonizovanom obliku, jer im se na taj način povećava hidrofilnost i produžava zadržavanje u HILIC sistemima [15]. Bitno je istaći da pH eluenta treba da obezbedi hromatografske uslove da analiti budu samo u jonizovanom ili nejoničovanom obliku kako bi se izbegla pojava širenja, nepravilnog oblika ili cepanja pikova [1]. Povećanjem pH vrednosti mobilne faze produžava se vreme zadržavanja jako baznih i jonizovanih jedinjenja, a smanjuje zadržavanje kiselih. Naime, povećanjem pH vrednosti povećava se jonizacija silanolnih grupa i poslednično zadržavanje jako baznih jedinjenja. Međutim, uticaj povećanja pH na slabo bazna jedinjenja je kompleksan. Može se desiti da se povećanjem pH vrednosti eluenta smanji jonizacija analita i time neutrališe udeo elektrostatičkih interakcija u njegovom zadržavanju. Pri velikim pH vrednostima, kao što je $pH = 10$, kiseli analiti izlaze u "mrtvoj" zapremini kolone zbog jakog elektrostatičkog odbijanja na površini silikagela [9].

1.1.3. Stacionarne faze u HILIC sistemu

Do pre petnaest godina, polarne kolone za NP-HPLC hromatografiju koristile su se i za razdvajanje u HILIC sistemima. Usled velikog porasta primene ove metode, proizvođači kolona i istraživači usmerili su veliku pažnju na stacionarne faze namenjene prevashodno za HILIC tehniku. S obzirom na to da je danas na tržištu dostupan veliki broj polarnih i umereno polarnih stacionarnih faza predviđenih za izvođenje HILIC hromatografskih postupaka, od esencijalnog je značaja da se prikupe informacije o njihovoj selektivnosti i ostalim karakteristikama. Do ovih podataka je veoma teško doći samo na osnovu poznavanja funkcionalnih grupa koje se nalaze na površini stacionarne faze, tako da eksperimentalni pristup predstavlja jedino i najbolje rešenje.

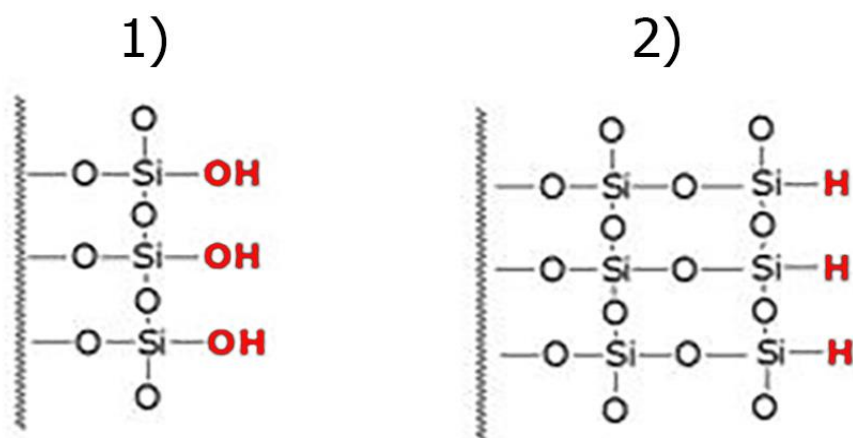
Kako se selektivnost različitih stacionarnih faza za pojedine tipove analita može prilično razlikovati, u cilju optimizacije hromatografskog ponašanja i postavljanja adekvatne HILIC metode neophodno je razmotriti tip stacionarne faze i odabrati odgovarajuću kolonu koja će omogućiti zadovoljavajuće razdvajanje.

Kolone za HILIC hromatografiju se grubo mogu podeliti na silikagel, neutralne, naelektrisane i cviterjonske. Opšte pravilo u HILIC sistemu jeste da se povećanjem polarosti stacionarne faze produžava zadržavanje analita u koloni [8].

1.1.3.1. Silikagel stacionarne faze

Nederivatizovani silikagel je najčešće upotrebljavana stacionarna faza kod kolona za HILIC hromatografiju. Kako je vodeni deo mobilne faze u bliskom kontaktu sa površinom silikagela, pri pH vrednostima eluenta većim od 4,0 dolazi do disocijacije slobodnih silanolnih grupa ($pK_a \sim 4$) i formiranja negativnog naelektrisanja na površini stacionarne faze [15]. U skladu s tim, pozitivno naelektrisana polarna jedinjenja, usled elektrostatičkog privlačenja, pokazuju povećano zadržavanje, odnosno silika kolone imaju veći afinitet za bazna jedinjenja [1]. Za razliku od silika kolona na kojima su hemijski vezane odgovarajuće funkcionalne grupe, kod nemodifikovanih kolona od čistog silikagela ne postoji opasnost od postepenog gubitka njihovih karakteristika usled disocijacije vezanih liganada. Iz navedenog razloga, ovaj tip kolona se smatra naročito pogodnim kod tandemskih hromatografskih sistema sa masenim detektorom. Ranija shvatanja podrazumevala su da je čist silikagel neadekvatan za analizu biološkog materijala i kompleksnih smeša polarnih jedinjenja. Međutim, ovakvo mišljenje važi za NP-HPLC sistem gde nepolaran eluent ne može adekvatno da zasiti stacionarnu fazu. Voda je jedan od najjačih deaktivirajućih agenasa i kada se doda u dovoljnoj količini u mobilnu fazu, čist silikagel je dovoljno deaktiviran i daje reproduktivne rezultate i nakon velikog broja ponovljenih injektovanja. S druge strane, u HILIC hromatografiji na silikagel stacionarnoj fazi primećena je pojava preklapanja i asimetrije pikova, posebno kada je mehanizam separacije zasnovan na particiji, odnosno u slučaju malog sadržaja vode u mobilnoj fazi. Zbog njene velike reaktivnosti, zapažena je i ireverzibilna adsorpcija analita koja se može smanjiti zamenom acetonitrila vodom ili metanolom [17].

Postoje tri tipa silikagel materijala: tip *A*, tip *B* i tip *C* (slika 3). Tip *A* je pretežno kontaminiran metalima, što predstavlja ograničavajući faktor za njegovo korišćenje u HILIC hromatografiji. Sferne čestice silikagela tipa *B* sadrže znatno manju količinu metala i relativno su stabilne na srednjim i velikim pH vrednostima koje se mogu kretati i do 9,0, što ih čini pogodnim za primenu u HILIC sistemima. U poslednje vreme, najpogodniji i najzastupljeniji tip silikagela koji se primenjuju u HILIC hromatografiji jeste tip *C*, odnosno hidrirane silika kolone. Kod ove vrste kolona, većina slobodnih silanolnih (Si–OH) grupa na površini silikagela zamenjena je Si–H grupama u procesu hidrogenizacije, što uslovljava njihovu manju polarnost. Na ovaj način, značajno se smanjuje jonizacioni potencijal površine silikagela, a samim tim i udeo elektrostatičkih interakcija u retencionom mehanizmu. Glavna prednost upotrebe ovih stacionarnih faza jeste postizanje bolje reproduktivnosti rezultata. Silika kolone kod kojih su čestice pakovanja manje od 2 μm (npr. *Acquity* 1,7 μm ; *Epic* 1,8 μm) dostupne su za izvođenje UHPLC (eng. *Ultra High Performance Liquid Chromatography*) razdvajanja i omogućavaju brže i jednostavnije sprovođenje analiza. Uvođenjem etilenskih grupa u strukturu nederivatizovanog silikagela, dobijene su hibridne organske silika kolone sa unakrsno povezanim etilenskim mostovima (eng. *Ethylene Bridged Hybrid* – BEH), koje su hemijski znatno otpornije u širokom opsegu pH vrednosti u odnosu na nederivatizovan silikagel. Površinski porozne silika kolone, dobijene korišćenjem tehnologije fuzionisanih jezgara (eng. *Fused-Core Technology*), dizajnirane su u cilju postizanja brzih razdvajanja i prevazilaženja problema ireverzibilne adsorpcije analita [8].



Slika 3. Strukture površina silikagel stacionarnih faza: 1) tip *A* i *B*; 2) tip *C*

Hemijske modifikacije silikagela polarnim grupama našle su značajnu primenu u HILIC sistemima. Umereno polarne stacionarne faze sa hemijski vezanim cijano, diolnim, amino, ciklodekstrinskim, polietilenglikolnim (PEG), amidnim, karbamatnim i drugim grupama prvobitno su bile namenjene za RP-HPLC hromatografiju, uz korišćenje eluenta sa velikim sadržajem vode [1]. Međutim, ustanovljeno je da se ove kolone mogu upotrebiti i u HILIC hromatografiji uz primenu mobilnih faza sa velikim procentom organskog rastvarača. Vezane grupe za površinu silikagela imaju za cilj da omoguće inkorporiranje vodenog sloja odgovarajuće debljine i time favorizuju proces raspodele. U najvećem broju slučajeva zadržavanje polarnih analita povećava se prema sledećem redosledu stacionarnih faza: cijano < diol < amino < silikagel. Međutim, treba imati u vidu da na zadržavanje komponenti značajno mogu uticati i selektivne interakcije između analita i stacionarne faze [8].

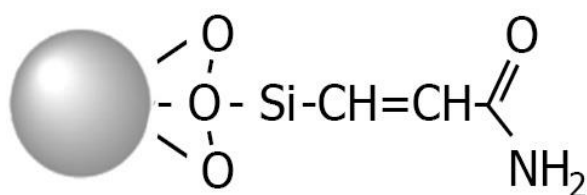
1.1.3.2. Neutralne stacionarne faze

Hemijski vezane funkcionalne grupe na površini neutralnih stacionarnih faza ne mogu jonizovati u uobičajenom pH rasponu mobilnih faza u HILIC sistemima [18]. Takođe, značajno je napomenuti da na površini nekih tipova kolona (amidna, cijano i diolna) pri pH vrednostima većim od 4,0 može biti prisutno negativno naelektrisanje usled deprotonovanja rezidualnih silanolnih grupa.

Amidne silikagel kolone

Silikagel modifikovan amidnim funkcionalnim grupama jeste neutralna stacionarna faza koja je u najširoj upotrebi. Ovaj tip stacionarnih faza sadrži karbamoil ili amidnu funkcionalnu grupu hemijski vezanu za trialkoksisilane preko kratkog alifatičnog lanca, najčešće propil. Za razliku od nederivatizovanih silikagel stacionarnih faza, kod amidnih kolona se izuzetno retko javlja problem ireverzibilne adsorpcije analita, zbog čega su stabilne u toku dugog vremenskog perioda. S obzirom na to da ne zahtevaju veliku koncentraciju pufera u mobilnoj fazi, znatno je smanjena interferencija sa jonizacijom uzorka na masenom detektoru.

U naučnoj literaturi zabeležena je njihova primena za razdvajanje peptida, oligosaharida, glikoproteina i različitih glikozida u HILIC sistemima. Kao i u slučaju nederivatizovanog silikagela, uvođenjem etilenskih grupa u strukturu amidne modifikacije silikagela dobijene su hibridne organske amidne kolone sa unakrsno povezanim etilenskim mostovima, veličine čestica 1,7 μm , na kojima se sprovode separacije pod HILIC-UHPLC uslovima (slika 4). Ovaj tip amidnih kolona komercijalno je dostupan pod nazivom *UPLC Acquity BEH amide (Waters)* [8].



Slika 4. Struktura površine hibridne amidne silikagel stacionarne faze sa unakrsno povezanim etilenskim mostovima

Cijanopropil silikagel kolone

Za razliku od NP-HPLC hromatografije, gde je upotreba cijanopropil kolona široko rasprostranjena, njihova primena u HILIC separacijama je prilično ograničena [19]. Struktura ovog tipa stacionarnih faza podrazumeva prisustvo cijano grupa koje su preko propil lanaca vezane za površinu silikagela (slika 5). Cijano grupe nemaju sposobnost građenja vodoničnih veza, što ih čini slabo polarnim. Iz navedenog razloga, javlja se nedovoljno zadržavanje polarnih analita u ovim kolonama. Takođe, sa rastvaračima umerene polarnosti cijanopropil kolone su mehanički nestabilne. Pomenuta osobina je verovatno razlog zbog čega ne postoji puno publikovanih naučnih radova u kojima su one korišćene. Naime, uspešnost sprovođenja razdvajanja u cijanopropil kolonama zabeležena je samo u pojedinim slučajevima [8].



Slika 5. Struktura površine cijanopropil silikagel stacionarne faze

Diolne silikagel kolone

Diolne modifikacije silikagela sadrže neutralne hidrofilne 2,3-dihidroksipropil ligande na svojoj površini. Ove stacionarne faze našle su značajnu primenu u HILIC hromatografiji zbog prisustva polarnih dihidroksilnih grupa koje su odgovorne za građenje vodoničnih veza. U tom smislu, diolni tip kolona je najbliži nederivatizovanim silika kolonama. Međutim, za razliku od silanolnih grupa na površini nederivatizovanih silika kolona, hidroksilne grupe na površini diolnih silika kolona ne mogu da jonizuju, tako da je prevaziđen problem ireverzibilne adsorpcije analita. Diolne kolone isključuju i neželjene jonske interakcije sa slobodnim silanolnim grupama koje se javljaju kod kolona sa čistim silikagelom. Njihove karakteristike, odnosno velika polarnost, vezivanje vodoničnim vezama i odsustvo grupa koje disosuju, smatraju se gotovo idealnim za izvođenje HILIC separacija. Primarno se koriste za analizu proteina i malih polarnih molekula [6].

1.1.3.3. Naelektrisane stacionarne faze

Funkcionalne grupe (npr. amino, polisukcinimidna, imidazolna, triazolna), koje su hemijski vezane za površinu ove grupe stacionarnih faza, naelektrisane su u opsegu pH vrednosti od 3,0 do 7,0, koji se najčešće koristi u HILIC separacijama [17].

Amino silikagel kolone

Hemijski vezane aminopropil silika kolone sa primarnim amino grupama predstavljaju najstariji tip amino stacionarnih faza koje se i dalje koriste za razdvajanje šećera, peptida, nukleotida i različitih lekova u HILIC hromatografiji. Zbog svoje pozitivno naelektrisane površine, aminopropil stacionarne faze pokazuju veći afinitet prema kiselim analitima. Problemi vezani za ovu vrstu kolona su neophodno dugotrajno kondicioniranje, ireverzibilna adsorpcija analita i odvajanje grupa sa površine silikagela, odnosno gubitak njihovih karakteristika. Dodatno ograničenje u primeni podrazumeva velika reaktivnost primarnih amino grupa koja uslovljava poteškoće prilikom analize šećera. Međutim, značajno produženje roka trajanja postignuto je pronalaskom kolona sa sekundarnim ili tercijarnim amino grupama koje ne učestvuju u građenju Šifovih baza sa aldehidima [8].

1.1.4. Tečna hromatografija hidrofилnih interakcija–masena spektrometrija

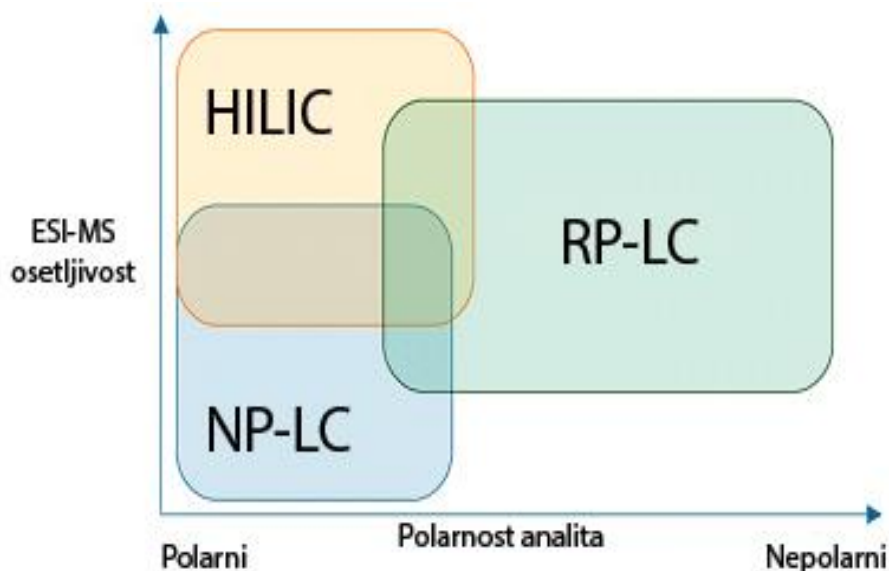
Masena spektrometrija (eng. *Mass Spectrometry* – MS) predstavlja jednu od instrumentalnih tehnika koja se zasniva na prevođenju ispitivanog uzorka u jonski oblik i razdvajanju na sastavne komponente na osnovu njihovog odnosa mase i naelektrisanja (m/z). Na taj način, MS omogućava određivanje molekulske mase jedinjenja i njegovu strukturnu karakterizaciju na osnovu fragmentnih jona, što se danas široko primenjuje za nedvosmisleni identifikaciju i kvantifikaciju poznatih/nepoznatih organskih jedinjenja [20]. Grafik zavisnosti količine jona od m/z vrednosti naziva se maseni spektar, koji je jedinstven za svako jedinjenje i upoređuje se sa otiskom prsta.

Brz razvoj MS poslednjih decenija doprineo je činjenici da je ova tehnika postala nezamenljiva u procesu razvoja novih lekova i analizi bioloških molekula (proteini, peptidi, ugljeni hidrati, steroidi, DNK). Takođe, MS je posebno pogodna za analitičku i bialitičku primenu zbog svoje velike osetljivosti (može detektovati pg i fg količine jedinjenja), izotopske specifičnosti, velike brzine detekcije i pružanja značajne količine podataka iz male količine uzorka (μg) [21]. Povezivanjem MS kao tandem masenu spektrometriju (eng. *Mass Spectrometry/Mass Spectrometry* – MS/MS) sa separacionim hromatografskim tehnikama, posebno sa tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom (eng. *High Performance Liquid Chromatography* – HPLC) i UHPLC tehnikom, stvorena je moćna metoda koja se široko primenjuje za praćenje koncentracije lekova u različitom biološkom materijalu i identifikaciju njihovih metabolita u cilju ispitivanja farmakokinetičkog profila. Takođe, ova spregnuta metoda omogućava analizu komponenti složenih smeša u farmaceutskim istraživanjima i razvoju, kao i strukturnu karakterizaciju nepoznatih nečistoća i proizvoda degradacije aktivne supstance *in bulk* i farmaceutskog oblika [20]. Inovativna UHPLC tehnika ima sve veću primenu i zasnovana je na upotrebi stacionarne faze sa manjom veličinom čestica u odnosu na HPLC tehniku koja obezbeđuje korišćenje znatno višeg pritiska (do 10.000 psi). Pomoću UHPLC postiže se velika rezolucija, kraće vreme trajanja analize i veliki odnos signal/šum (eng. *Signal to Noise ratio* – S/N).

Maseni spektrometar, u sprezi sa tečnim hromatografom, ima ulogu detektora. Kombinacijom odlične sposobnosti razdvajanja tečnom hromatografijom, kojom se omogućava uvođenje "čistih" jedinjenja u maseni detektor, i izvrsne osetljivosti i specifičnosti ovog detektora postiže se mnogo preciznija identifikacija i kvantifikacija jedinjenja sličnih ili identičnih retencionih karakteristika, koja se u potpunosti ne bi mogla odrediti hromatografski [21].

Osnovni razlog za porast interesovanja za HILIC tehniku u nekoliko poslednjih godina jeste njena kompatibilnost sa masenim i tandem masenim detektorom. Povezivanje HILIC sistema sa masenim spektrometrom sa ESI jonskim izvorom obezbeđuje veliku osetljivost ove spregnute tehnike, uz mogućnost određivanja veoma malih koncentracija analita [22]. Iz navedenog razloga, HILIC metoda sa masenom detekcijom sve se više koristi za efikasnu kvantitativnu analizu malih polarnih, baznih i jonizovanih farmaceutskih jedinjenja u kompleksnom biološkom materijalu. Takođe, HILIC u kombinaciji sa MS/MS detektorom pokazao je izuzetan potencijal u praćenju polarnih metabolita lekova [23]. Značaj praktične primene HILIC hromatografije u bioanalitici lekova potvrđen je velikim brojem publikovanih naučnih radova iz ove oblasti. Dodatni motiv za primenu HILIC tehnike jeste i jednostavna priprema uzoraka biološkog materijala [2].

Prednosti HILIC sistema sa masenom detekcijom u bioanalizi polarnih jedinjenja u odnosu na RP-LC/MS i NP-LC/MS sisteme su velike i ogledaju se prvenstveno u povećanju efikasnosti jonizacije analita u ESI jonskom izvoru i posledično značajno većoj osetljivosti masenog detektora (slika 6). Takođe, HILIC se smatra pogodnom tehnikom u bioanalitici zbog toga što pokazuje veliku selektivnost i obezbeđuje odlično razdvajanje, kao i oblik pikova polarnih jedinjenja [2,23].



Slika 6. Poređenje osetljivosti HILIC, RP-LC i NP-LC sistema sa masenom detekcijom

Za povećanje intenziteta ESI/MS signala zaslužni su reagensi koji se koriste u HILIC tehnici, a koji su kompatibilni sa masenim detektorom [21]. Naime, mobilna faza koja sadrži veliki procenat organskog rastvarača i mali udeo vode predstavlja skoro idealan izbor za masenu detekciju [1]. Zbog svoje velike isparljivosti, mobilna faza doprinosi formiranju naelektrisanih kapljica manjeg dijametra koje zatim brže podležu procesu desolvatacije i jonizacije u ESI jonskom izvoru. Dodatno, zbog manje viskoznosti eluenta značajno je niži pritisak u koloni, što omogućava primenu znatno višeg protoka, kao i skraćivanje ukupnog vremena trajanja analize [23]. Zahvaljujući velikom udelu acetonitrila u mobilnoj fazi moguće je direktno injektovanje uzoraka koji su ekstrahovani organskim rastvaračem tokom njihove pripreme pomoću tehnike precipitacije proteina (eng. *Protein Precipitation* – PP), tečno-tečne ekstrakcije (eng. *Liquid-Liquid Extraction* – LLE) ili čvrsto-tečne ekstrakcije (eng. *Solid Phase Extraction* – SPE). Aditivi koji se dodaju u vodenu fazu takođe odgovaraju uslovima masenog detektora. Isparljivi pufri, odnosno amonijum-acetat i amonijum-formijat u optimalnoj koncentraciji od 5 mmol L^{-1} do 20 mmol L^{-1} , pogodni su zbog toga što ne kristališu u ESI jonskom izvoru i olakšavaju evaporaciju, tj. isparavanje rastvarača i jonizaciju analita. Zatim, mravlja i sirćetna kiselina, koje se koriste za korekciju pH vrednosti mobilne faze, doprinose povećavaju ESI signala [2].

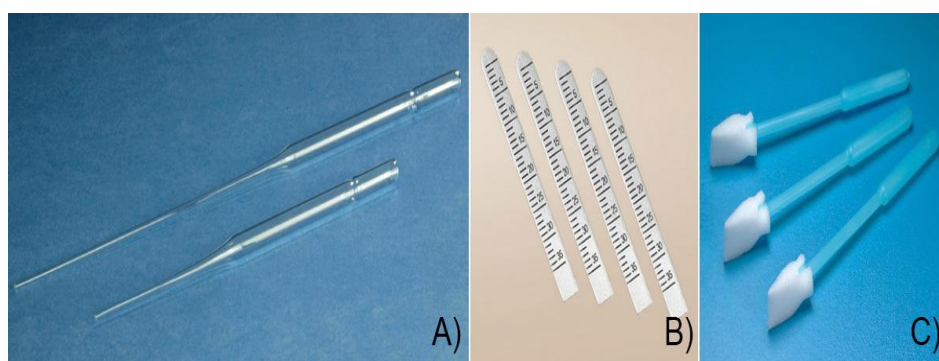
1.2. Analiza lekova u uzorcima humanih suza

Suze predstavljaju relativno jednostavan biološki materijal koji se nedovoljno koristi u bioanalitici za praćenje koncentracije i farmakokinetičkog profila lokalno aplikovanih lekova u oko. Pregledom naučne literature uočeno je da se u ovom biološkom materijalu prvenstveno vrši kvantitativna analiza antihistaminika, antibiotika i drugih antimikrobnih agenasa koji se primenjuje u terapiji konjuktivitisa i infekcija oka [24]. Problemi udruženi sa topikalnom aplikacijom lekova u konjuktivalnu vrećicu su slaba lokalna raspoloživost usled ispiranja leka (tzv. *wash out* efekat) suznom tečnošću i posledična brza eliminacija [25]. U cilju potvrde kliničke efikasnosti, neophodno je pratiti koncentraciju ovih lekova u suzama primenom veoma osetljivih i preciznih bioanalitičkih metoda. Za procenu njihove okularne farmakokinetike koriste se jednostavni linearni modeli koji opisuju zavisnost izmerene koncentracije analita od vremena uzorkovanja.

Humane suze su kompleksna smeša sastavljena od vode (98%), proteina, elektrolita, nejonizovanih difundujućih materija i lipida [26]. Od elektrolita u jonskom obliku u suzama su prisutni magnezijum, bakar, gvožđe, kalcijum, hloridi, fosfati, mlečna i limunska kiselina, kao i vitamini A, C i E. Nejonizujuće difundujuće materije zastupljene u suznoj tečnosti su urea i glukoza, dok je ukupna količina proteina konstantna i relativno velika i iznosi oko 1% (30% albumina, 40% globulina i 30% lizozima). Proteinske komponente koje se nalaze u ovom matriksu su mnogobrojne: specifični albumini (prealbumini, lipokalini), imunoglobulini klase IgA, IgG, IgD, IgE, metal-vezujući proteini, inflamatorni medijatori (histamin, prostaglandini, proteaze), antimikrobni proteini (lizozimi, β -lizin, laktoferin), matriks metaloproteinaze i aminokiseline koje učestvuju u lokalnoj sintezi/degradaciji proteina u suznom filmu. Prosečna pH vrednost suza je 7,45, osmolalitet 300 mOsm, a volumen prisutan u oku približno oko 10 μ L [27].

1.2.1. Tehnike za prikupljanje uzoraka suza

Glavno ograničenje upotrebe suza u bioanalizi jeste izuzetno mala zapremina koja se dobija uzorkovanjem. Iz ovog razloga, njihovo sakupljanje predstavlja poseban problem i kritičan korak u dobijanju preciznih i reproduktivnih bioanalitičkih rezultata [24]. Međutim, odabirom efikasne tehnike za uzorkovanje, selektivne procedure za pripremu uzorka i postavljanjem osetljive metode, kao što je LC u kombinaciji sa masenim detektorom, moguće je odrediti i veoma male koncentracije leka prisutnog u ovom biološkom materijalu. Kako bi se uzorkovanje izvelo na pravilan način, neophodno je poznavanje fizičko-hemijskih osobina i stabilnosti analita, kao i prirode suza. Takođe, pre sprovođenja uzorkovanja potrebno je standardizovati vreme sakupljanja i volumen uzorka u cilju dobijanja pouzdanih podataka. U literaturi su opisana dva osnovna načina za validno prikupljanje suza: direktno i indirektno uzorkovanje (slika 7).



Slika 7. Pribor za uzorkovanje suza: A) staklene mikrokapilarne cevčice, B) Širmerove test trake i C) hirurški celulozni sunđer

Tehnika direktnog uzorkovanja uključuje sakupljanje refleksnih suza pomoću staklenih mikrokapilarnih cevčica (slika 7A) i zahteva prethodnu hemijsku, fizičku ili fiziološku stimulaciju u cilju postizanja lakše sekrecije. Glavni nedostaci ove metode uzorkovanja su znatno razblaživanje uzorka usled prethodne stimulacije suzenja parama tečnih agenasa, zatim nemogućnost sakupljanja dovoljne zapremine suza u definisanim intervalima, kao i poteškoće koje se javljaju prilikom sakupljanja uzoraka sa specifičnih mesta, npr. ispod očnog kapka. Naime, direktnom tehnikom može se sakupiti svega 2–3 μL uzorka. Dodatno, može izazvati iritaciju oka i nije prijatna i komforna metoda za pacijenta, posebno za decu i osobe sa specijalnim potrebama [28,29].

Kod indirektnog uzorkovanja bazalnih suza koriste se određeni adsorbensi, kao što su Širmerove test trake i hiruški celulozni sunđeri (slika 7B i 7C). Širmerove test trake se tradicionalno primenjuju u dijagnostifikovanju sindroma suvog oka. Predstavljaju sterilne celulozne filter papire i poseduju karakteristike koje povećavaju nivo tolerancije kod pacijenta. Ovaj postupak uzorkovanja suza iz konjuktivalne vrećice danas se široko primenjuje jer omogućava brzo, jednostavno, tačno, precizno i bezbedno sakupljanje znatno većeg volumena uzorka u poređenju sa direktnom metodom (najmanje 10 μ L) [30]. Indirektnim uzorkovanjem pomoću hirurških sunđera postiže se prikupljanje zadovoljavajuće količine uzorka i obezbeđuje komplikjansa sa pacijentom [31].

Nakon opredeljivanja za određeni način prikupljanja, bitno je definisati način rukovanja uzorcima, uslove transporta i pogodnu temperaturu na kojoj će se uzorci čuvati do momenta izvođenja analize. Takođe, neophodno je da se uzorci skladište u kontejnere od pogodnog materijala i adekvatne zapremine, vodeći računa o potencijalnoj adsorpciji analita na staklo ili plastiku, kao i o uticaju sudova neadekvatne zapremine na homogenost i isparavanje uzoraka.

1.2.2. Metode za pripremu uzoraka suza

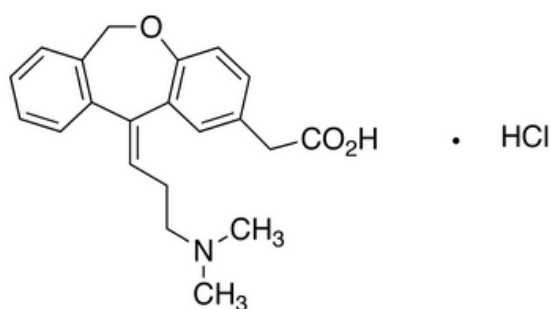
U cilju uklanjanja ili smanjenja uticaja interferirajućih jedinjenja iz matriksa i dobijanja što većeg prinosa ekstrakcije analita, neophodno je odabrati najpogodniju metodu pripreme uzoraka suza. S obzirom na to da koekstrahovane endogene komponente suza mogu značajno uticati na efikasnost jonizacije analita i intenzitet signala, postupak pripreme uzoraka može imati veliki efekat na specifičnost i osetljivost LC-MS metode. Iz navedenog razloga, potrebno je obratiti posebnu pažnju prilikom optimizacije procedure pripreme uzoraka suza. Literaturni podaci pokazuju da način pripreme uzoraka suza nije previše komplikovan i složen. Uzorci se mogu direktno injektovati nakon razblaženja pogodnim rastvaračem i vorteksovanja. Međutim, ovakvim pristupom postiže se minimalno prečišćavanje uzoraka i nije pogodan u slučaju ispitivanja analita koji su u uzorcima prisutni u tragovima. Većina naučnih publikacija kao najadekvatnije procedure preporučuje tehniku precipitacije proteina ili tečno-tečnu ekstrakciju [24,28].

Metoda precipitacije proteina podrazumeva uklanjanje proteina iz uzoraka suza njihovim denaturisanjem pomoću odgovarajućeg agensa za precipitaciju, najčešće acetonitrila, metanola ili perhlorne kiseline. Ograničavajući faktor ovog jednostavnog postupka je nezanemarljiv udeo interferirajućih jedinjenja koji ostaje u uzorcima nakon ekstrakcije analita i ometa analizu. Na taj način, precipitacija proteina ne smatra se pristupom prvog izbora za analizu kompleksnih jedinjenja velikih molekulskih masa. Metoda tečno-tečne ekstrakcije podrazumeva ekstrakciju analita pomoću organskog rastvarača koji se ne meša sa vodom. Najčešće upotrebljavani nepolarni rastvarači su hloroform, dietil-etar, dihlormetan i cikloheksan [32]. Iako se primenom ove tehnike dobijaju dobro prečišćeni uzorci, često se dešava da endogena interferirajuća jedinjenja koeluiraju i utiču na osetljivost metode. Drugi problem, koji se javlja kod tečno-tečne ekstrakcije, podrazumeva formiranje emulzije u toku izvođenja ekstrakcije.

1.3. Analitika i farmakologija olopatadina

1.3.1. Struktura i fizičko-hemijske osobine olopatadina

Strukturna formula olopatadin-hidrohlorida prikazana je na slici 8.



Slika 8. Strukturna formula olopatadin-hidrohlorida

CAS broj: [140462-76-6]

ATC kod: S01GX09

Molekulska formula: $C_{21}H_{23}NO_3 \cdot HCl$

Molekulska masa: $373,87 \text{ g mol}^{-1}$

Hemijski naziv: 11-[(Z)-3-(dimetilamino) propiliden]-6,11-dihidrobenz [b,e] oxepin-2-sirćetna kiselina, hidrohlorid

Olopatadin-hidrohlorid oficinalan je u Američkoj farmakopeji i nacionalnim formulama (USP38/NF33), izdanje iz 2015. godine [33] i Japanskoj farmakopeji (JP XVII), izdanje iz 2016. godine [34]. Takođe, u USP38/NF33 oficinalan je rastvor za oči olopatadin-hidrohlorida [33], dok su u JP XVII oficinalne tablete [34].

Izgled i rastvorljivost: Olopatadin-hidrohlorid je beo ili skoro beo kristalan prašak, veoma lako rastvorljiv u mravljoj kiselini, umereno rastvorljiv u vodi i teško rastvorljiv u metanolu i hloroformu. Temperatura topljenja je 248°C [33].

pH vrednost 1%-tnog vodenog rastvora: 2,0–4,0 [33]

Gubitak sušenjem: $\leq 0,3\%$ (105°C; 3 h) [33]

Ostatak nakon žarenja: $\leq 0,1\%$ [33]

Teški metali: ≤ 10 ppm (metoda II) [33]

Particioni koeficijent n-oktanol/voda: $\log P = 3,23$ [35]

Izoelektrična tačka: pH = 6,77 [35]

Konstante disocijacije na sobnoj temperaturi: pK_a (tercijarna amino grupa) = 9,76 [35]

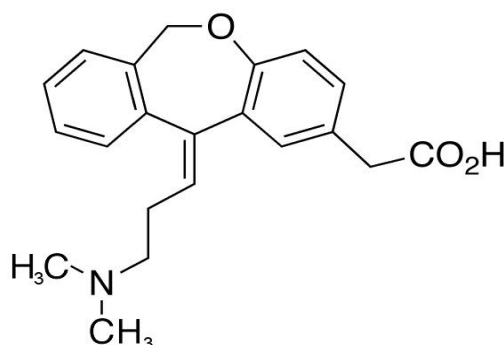
pK_a (fenilacetatna grupa) = 2,58 [35]

1.3.2. Ispitivanje stepena čistoće olopatadina

Potencijalne nečistoće, prisutne u farmaceutskom jedinjenju olopatadin-hidrohlorid, mogu poticati od polaznih sirovina koje se koriste u procesu njegove sinteze, zatim mogu nastati tokom procesa sinteze ili kao posledica degradacije molekula.

Olopatadin je lipofilno jedinjenje sa amfoternim osobinama, odnosno derivat dibenzoksepina koji je supstituisan acetatnom i dimetilamino propilidenskom grupom. Kod ovog jedinjenja izražena je geometrijska *cis-trans* izomerija, pri čemu je *Z* izomer farmakološki aktivan, a *E* izomer jedna od glavnih nečistoća (slika 9). Vrednost particionog koeficijenta ($\log P = 2,97$) ukazuje da je *E* izomer olopatadina malo manje lipofilan u odnosu na *Z* izomer [35]. Tercijarni amini su veoma osetljivi na oksidaciju pri čemu se u reakciji elektrofilne supstitucije formira N-oksid (srodna supstanca B prema USP farmakopeji).

Takođe, moguća je i oksidacija u α -položaju sirćetne kiseline olopatadina do odgovarajućeg α -hidroksi derivata, kao i oksidacija supstituisane propilidenske grupe do 11-okso derivata (srodna supstanca C prema USP farmakopeji). Prisustvo svetlosti je često uzročnik započinjanja reakcija redukcije, N-dealkilovanja, hidrolize i oksidacije. Može se pretpostaviti da kod olopatadina dolazi do reakcije dealkilovanja, pri čemu nastaju odgovarajući N-demetil i N-didemetil degradacioni proizvodi, kao i do reakcije redukcije karboksilne grupe do karbaldehida.



Slika 9. Hemijska struktura olopatadin *E* izomera

Za identifikaciju olopatadin-hidrohlorida, USP38/NF33 [33] propisuje metodu infracrvene apsorpcione spektroskopije (eng. *Infrared Absorption Spectroscopy – IR*) i reakciju za identifikaciju hlorida. S druge strane, za određivanje sadržaja olopatadin-hidrohlorida i njegovih nečistoća Američka farmakopeja predlaže RP-HPLC metodu uz izokratski način eluiranja mobilne faze. Eluent predstavlja smešu acetonitrila i fosfatnog pufera (7:18 V/V) i njegova pH vrednost podešena je na 3,0 pomoću fosforne kiseline. Protok mobilne faze je 1 mL min^{-1} , a detekcija se prati na talasnoj dužini od 299 nm. Razdvajanje se vrši u oktill silikagel koloni dimenzija 150 mm x 4,6 mm, 5 μm veličine čestica. Provera pogodnosti hromatografskog sistema podrazumeva da vrednost faktora rezolucije između olopatadin-hidrohlorida i nečistoće B bude najmanje 2,0, faktor simetrije olopatadina najviše 2,0, relativni faktor odgovora α -hidroksi olopatadina 1,0, kao i relativni faktor odgovora olopatadin *E* izomera 1,3. Na hromatogramu ispitivanog uzorka, površina pika α -hidroksi olopatadina ne sme biti veća od 0,2%, dok površine pikova olopatadin *E* izomera i bilo koje druge nečistoće mogu biti najviše 0,1%. Ukupan sadržaj nečistoća maksimalno može iznositi 0,25%.

U farmaceutskom obliku rastvora za oči olopatadin-hidrohlorida, prisustvo nečistoća određuje se prethodno opisanom RP-HPLC metodom [33]. Sadržaj ranije eluiranih nečistoća ne sme biti veći od 0,5% za olopatadin *E* izomer, 2,0% za nečistoću B, 0,5% za olopatadin-karbaldehid i 0,5% za pojedinačne nespecificirane nečistoće. Sadržaj kasnije eluirane nečistoće C može biti najviše 1,0%. Ukupan sadržaj svih ranije i kasnije eluiranih nečistoća u ispitivanom rastvoru za oči mora biti $\leq 3,0\%$.

1.3.3. Pregled literature

U ovom delu doktorske disertacije, istaknuti su najvažniji rezultati istraživanja dostupni u dosadašnjoj naučnoj literaturi iz oblasti određivanja olopatadina *in bulk* i u farmaceutskim doziranim oblicima primenom različitih instrumentalnih tehnika. Takođe, prikazani su pregledni radovi u kojima je proučavana stabilnost olopatadina, nakon izlaganja brojnim *stres* agensima, upotrebom hromatografskih metoda sa UV i masenom detekcijom. Pregledom literaturnih podataka, uočen je i određeni broj naučnih publikacija koje se bave merenjem koncentracije olopatadina u uzorcima biološkog materijala korišćenjem RP-HPLC tehnike u kombinaciji sa MS/MS detekcijom.

Olopatadin u farmaceutskoj formulaciji kapi za oči određen je pomoću dve UV-VIS (eng. *Ultraviolet-Visible*) spektroskopske metode. Prva metoda zasnovana je na primeni 0,1 N natrijum-hidroksida kao rastvarača i određivanju na talasnoj dužini od 220 nm. U drugoj metodi korišćen je 5 mmol L⁻¹ amonijum-formijat kao rastvarač, dok je apsorbancija merena na $\lambda_{\max} = 206$ nm. Vrednosti regresionih parametara (nagib, odsečak i koeficijent korelacije) ukazale su da su ove jednostavne i brze spektrofotometrijske metode linearne u definisanom opsegu koncentracija. Takođe, definisane su odgovarajuće optičke karakteristike, odnosno molarna apsorptivnost i *Sandel*-ova osetljivost [36].

Annapurta i saradnici opisali su i dve specifične UV-VIS derivativne spektroskopske metode za rutinsku analizu olopatadina u kapima za oči. Prva metoda omogućila je merenje prvog izvoda odgovora analita u 0,1 N natrijum-hidroksidu na $\lambda_{\min} = 227,7$ nm, a druga metoda u 5 mmol L⁻¹ amonijum-formijatu na $\lambda_{\min} = 221,5$ nm. Pogodnost predloženih metoda potvrđena je postupkom validacije, odnosno ispitani su parametri linearnosti, tačnosti i preciznosti. *Intra-* i *inter-day* preciznost procenjene su na osnovu vrednosti relativnih standardnih devijacija (eng. *Relative Standard Deviation – RSD*) [37].

Određivanje olopatadina u kapima za oči izvršeno je i primenom metode hromatografije na tankom sloju pod visokim pritiskom (eng. *High Performance Thin Layer Chromatography – HPTLC*). Hromatografsko razdvajanje vršeno je na aluminijumskim pločama presvučenim silikagelom 60 F₂₅₄ uz mobilnu fazu koja se sastojala od smeše metanola, vode i glacijalne sirćetne kiseline (8:2:0,2 V/V/V). Jasna mrlja olopatadina, koja se javljala na vrednosti retencionog faktora $0,37 \pm 0,01$, analizirana je denzitometrijski na 247 nm. Postavljena jednostavna i ekonomična metoda validirana je u pogledu linearnosti, tačnosti, preciznosti i robusnosti [38].

Takođe, HPTLC metoda postavljena je za brzo određivanje sadržaja olopatadina u tabletama. Kao stacionarna faza upotrebljena je aluminijumska ploča presvučena silikagelom 60 F₂₅₄, dok je kao mobilna faza korišćena smeša metanola, hloroforma i amonijaka u odnosu 8:2:0,1 V/V/V. Detekcija mrlje analita vršena je na talasnoj dužini od 301 nm. U ovom radu, opisana je i izokratska RP-HPLC metoda za određivanje olopatadina u formulaciji tableta. Hromatografska analiza izvršena je u oktadecil silika koloni uz mobilnu fazu sačinjenu od acetonitrila i 0,1% ortofosforne kiseline u odnosu 25:75 V/V i pri protoku mobilne faze od 1 mL min⁻¹. pH vrednost vodene faze podešena je na 4,5 pomoću trietilamina. Paracetamol je odabran kao interni standard [39].

Istovremena analiza olopatadina i montelukasta *in bulk* i u preparatu za *per os* primenu postignuta je primenom HPTLC metode. Za razdvajanje upotrebljena je Merck-ova silikagel G60 F₂₅₄ aluminijumska ploča uz mobilnu fazu sastavljenu od hloroforma, etilacetata, metanola i trietanolamina (6:4,5:2,5:0,8 V/V/V/V). Densitometrijsko merenje izvedeno je na talasnoj dužini detekcije od 254 nm. Retenciona vrednost olopatadina bila je $0,39 \pm 0,01$, dok je retenciona vrednost montelukasta bila $0,66 \pm 0,01$. Definisane su vrednosti limita detekcije (eng. *Limit of Detection* – LOD) i limita kvantifikacije (eng. *Limit of Quantification* – LOQ) za oba ispitivana leka, a procenjena je i robusnost metode pri neznatnim promenama u sastavu mobilne faze ($\pm 5\%$ za svaku komponentu) [40].

Za određivanje olopatadina u kapima za oči optimizirana je RP-HPLC metoda u koloni *Chromatopak Peerless Basic C18* dimenzija 50 mm \times 4,6 mm, 3 μ m veličine čestica. Mobilna faza sastojala se od fosfatnog pufera (čija je pH vrednost podešena ortofosfornom kiselinom na 3,3) i acetonitrila u odnosu 70:30 V/V. Protok mobilne faze bio je 1 mL min⁻¹, a detekcija je izvršena na talasnoj dužini od 220 nm. Retenciono vreme analita bilo je 6,67 min. Razvijena metoda je validirana, odnosno testirani su sledeći parametri validacije: specifičnost, linearnost, tačnost, preciznost i reproduktivnost [41].

U radovima [42,43], određivanje olopatadina *in bulk* i u tabletama je takođe izvršeno brзом i osetljivom RP-HPLC tehnikom. U radu [42], hromatografsko razdvajanje postignuto je u *Symmetry* oktadecil silika koloni koristeći jednostavnu smešu metanola i vode (70:30 V/V) pod izokratskim uslovima i pri protoku mobilne faze od 1 mL min⁻¹. Detekcija je sprovedena na talasnoj dužini od 246 nm. Retenciono vreme olopatadina bilo je 2,745 min. Od parametara validacije ispitani su linearnost, preciznost i tačnost. U radu [43], upotrebljena je *Zorbax Eclipse Plus* oktadecil silika kolona dimenzija 250 mm \times 4,6 mm, 5 μ m veličine čestica. Mobilna faza pripremljena je od metanola i 0,1% rastvora mravlje kiseline u vodi (65:35 V/V). Protok mobilne faze bio je 1 mL min⁻¹, a detekcija je praćena pomoću PDA detektora na 300 nm. Retenciono vreme olopatadina bilo je 3,77 min. sa prihvatljivim faktorom asimetrije. Velika osetljivost metode potvrđena je na osnovu LOD (0,5 ng mL⁻¹) i LOQ vrednosti (5 ng mL⁻¹).

U radu [44] predstavljena je jednostavna UV-VIS spektrofotometrijska metoda za određivanje olopatadina u kapima za oči i analizu njegove stabilnosti nakon izlaganja brojnim *stres* uslovima. *Studije forsirane degradacije* izvedene su na farmaceutskom jedinjenju tretiranjem 3 N hlorovodoničnom kiselinom, 0,1 N natrijum-hidroksidom, 30% vodonik-peroksidom, UV svetlošću i temperaturom od 80°C. Kao rastvarač upotrebljena je smeša metanola i 0,1 N hlorovodonične kiseline u odnosu 50:50, a apsorbcija je izmerena na $\lambda_{\max} = 206$ nm. Metoda je validirana u pogledu specifičnosti, linearnosti, tačnosti, preciznosti, a određene su i LOD i LOQ vrednosti. Rezultati *stres studija* pokazali su da olopatadin podleže razgradnji nakon izlaganja toploti u vremenskom intervalu od dva dana (36% degradacija) i fotolitičkim uslovima u toku 3 h (23% degradacija), dok ostaje relativno stabilan u baznoj sredini (~ 5% degradacija).

Kvantitativna analiza olopatadina u tabletama i *studije forsirane degradacije* izvedene su primenom RP-HPLC metode za praćenje stabilnosti (eng. *Stability Indicating Method – SIM*). *Stres studije* sprovedene su izlaganjem jedinjenja *in bulk* i formulacije kiseloj i baznoj hidrolizi, kao i oksidativnoj, fotolitičkoj i termičkoj degradaciji. Hromatografsko razdvajanje analita i proizvoda razgradnje vršeno je u *Intersil C18* koloni (dimenzije 150 mm × 4,6 mm, 5 µm veličina čestica) na sobnoj temperaturi uz smešu fosfatni pufer–metanol–trietilamin (55:45:0,1 V/V/V) kao mobilnu fazu i protok od 2 mL min⁻¹. pH vrednost eluenta podešena je na 3,0 pomoću ortofosforne kiseline. Eluirane komponente praćene su na talasnoj dužini od 299 nm pomoću PDA detektora. Nastala četiri degradaciona proizvoda u prisustvu kiseline (5 N hlorovodonična kiselina), baze (5 N natrijum-hidroksid) i 10% vodonik-peroksida nisu identifikovana, ali su adekvatno razdvojena od glavnog pika farmaceutskog jedinjenja sa značajnim razlikama u vrednostima retencionih vremena. Statističkom procenom parametara validacije pokazan je zadovoljavajući stepen preciznosti i tačnosti metode. Potvrđena je i robusnost metode namernim variranjem sledećih parametara: protok (± 10%), temperatura kolone (± 5°C), udeo metanola (± 2%) i pH vrednost eluenta (± 0,2) [45].

Osetljiva i reproduktivna UHPLC tehnika sa UV detekcijom postavljena je za definisanje degradacionog profila olopatadina u kapima za oči pod uticajem dve različite metode sterilizacije, toplotom (121°C, 15 min.) i filtracijom (0,2 µm membranski filteri). Uspešno razdvajanje izvršeno je u *Waters CHS C18* koloni uz gradijentno eluiranje mobilnom fazom sačinjenjom od acetonitrila i 6 mmol L⁻¹ fosfatnog pufera čija je pH vrednosti podešena na 2,4 ortofosfornom kiselinom i pri protoku mobilne faze od 0,3 mL min⁻¹. Detekcija je izvedena na talasnoj dužini od 220 nm. *Studije forsirane degradacije* sprovedene su tretiranjem formulacije različitim *stres* agensima: kiselina, baza, UV svetlost, oksidaciono sredstvo i povišena temperatura. Autori su nakon oba načina sterilizacije kapi za oči identifikovali sledeće poznate nečistoće: α-hidroksi olopatadin, olopatadin *E* izomer i USP srodne supstance B (olopatadin N-oksidi) i C (11-okso olopatadin). Takođe, zaključili su da sterilizacijom toplotom nastaje mnogo veći procenat proizvoda degradacije u poređenju sa sterilizacijom filtracijom, koja je i preporučena kao metoda izbora. Na osnovu rezultata *stres studija* predviđeni su mogući putevi degradacije. Olopatadin je pokazao značajnu degradaciju u prisustvu 3% vodonik-peroksida (17%) i umereno razlaganje u fotolitičkoj sredini, pri čemu je N-oksidi detektovan kao glavni proizvod degradacije [46].

Razdvajanje, identifikacija i sistematična karakterizacija glavnih proizvoda degradacije olopatadina, dobijenih pod ICH (eng. *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) *Q1A* preporučenim *stres* uslovima, postignuti su primenom veoma osetljive i brze LC-MS/TOF (eng. *Time of Flight*) metode. Hromatografsko razdvajanje postignuto je u *Intersil C18* koloni dimenzija 250 mm × 4,6 mm, 5 µm veličine čestica koristeći gradijentni program eluiranja. Mobilna faza predstavljala je smešu acetonitrila i amonijum-formijata (pH = 2,5). Protok mobilne faze bio je 1 mL min⁻¹. Olopatadin je podložan transformaciji pod dejstvom kisele i bazne hidrolize, kao i nakon izlaganja UV svetlosti. S druge strane, ostao je stabilan pod oksidativnim uslovima (30% vodonik-peroksid u toku 24 h) i termičkim *stres* uslovima (80°C u toku tri dana).

Četiri proizvoda koja su formirana u toku *studija forsirane degradacije* identifikovana su kao olopatadin *E* izomer, 2-((*Z*)-9-(3-(dimetilamino) propiliden)-9H-fluoren-7-il) sirćetna kiselina, 11-[(*E*)-3-(dimetilamino) propiliden]-6,11-dihidro-dibenz [b,e] oksepin-2-sirćetna kiselina metil estar i 11-[(*Z*)-3-(dimetilamino) propiliden]-6,11-dihidro-dibenz [b,e] oksepin-2-sirćetna kiselina metil estar. Takođe, prikazan je kompletan degradacioni put i mehanizam fragmentacije olopatadina. Razvijena i validirana SIM metoda uspešno je upotrebljena i za analizu olopatadina u formulaciji kapi za oči [47].

Istovremeno određivanje olopatadina i njegovih aktivnih metabolita (N-demetil olopatadin, N-didemetil olopatadin, olopatadin N-oksida) u humanoj plazmi izvršeno je RP-HPLC metodom u kombinaciji sa MS/MS detekcijom. Najpre je sprovedena čvrsto-tečna ekstrakcija olopatadina, metabolita i internog standarda (11-[(*Z*)-3-(dimetilamino) propiliden]-6,11-dihidro-dibenz [b,e] oksepin-2-propionska kiselina) iz biološke tečnosti pomoću *Bond Elut C18* čvrste faze. Zatim je eluat uparen do suva, rekonstituisan u mobilnoj fazi i analiziran LC-ESI/MS/MS tehnikom. Analiti su razdvojeni u C8 koloni dimenzija 50 mm × 2 mm, 5 μm veličine čestica na sobnoj temperaturi i uz izokratski način eluiranja. Mobilna faza predstavljala je smešu 10 mmol L⁻¹ sirćetne kiseline i metanola u odnosu 55:45 V/V. Detekcija i određivanje analita vršeno je u pozitivnom ESI modu MRM (eng. *Multiple Reaction Monitoring*) metodom. Argon je upotrebljen kao kolizionni gas, a vrednost kolizionne energije bila je 20 eV. Praćene tranzicije prekursor jona u odgovarajuće fragmentne jone su bile sledeće: *m/z* 338→165 za olopatadin, *m/z* 324→165 za N-demetil olopatadin, *m/z* 310→165 za N-didemetil olopatadin, *m/z* 354→165 za olopatadin N-oksida, odnosno *m/z* 352→179 i *m/z* 352→247 za interni standard. Vreme trajanja analize bilo je 5 min, tako da je ova metoda pogodna za ispitivanje velikog broja uzoraka plazme u toku jednog dana. Postavljena metoda uspešno je primenjena za analizu olopatadina i njegovih metabolita u uzorcima plazme nakon *per os* primene za vreme prve faze kliničkog ispitivanja leka. Zaključeno je da se lek u plazmi dominantno nalazi u nepromenjenoj formi, odnosno da je farmakološki doprinos njegovih metabolita neznatan. Takođe, rezultati iz opisanog određivanja pokazali su se pouzdanijim u odnosu na rezultate dobijene primenom radioimunološke (eng. *Radioimmunoassay* – RIA) metode, koja se rutinski koristila za određivanje olopatadina u plazmi [48].

U publikovanim radovima [49–51], takođe je prikazano određivanje olopatadina u humanoj plazmi brzom i osetljivom LC–MS/MS tehnikom.

U radu *Ping Zhu*-a i saradnika [49], uzorci plazme prečišćeni su procedurom precipitacije proteina acetonitrilom, koja je praćena metodom tečno-tečne ekstrakcije sa etilacetatom i dihlormetanom. Hromatografsko razdvajanje olopatadina i internog standarda amitriptilina postignuto je u *Agilent Eclipse plus C18* koloni (dimenzije 150 mm × 4,6 mm, 3,5 µm veličina čestica) koristeći smešu 100 mmol L⁻¹ amonijum-formijatnog pufera i acetonitrila (5:95 V/V) pod izokratskim uslovima i pri protoku mobilne faze od 0,5 mL min⁻¹. Upotrebljena je pozitivna ESI, a detekcija je ostvarena sa trostrukim kvadripolnim masenim detektorom u MRM modu. Optimizirane tranzicije bile su m/z 338,3→165,2 za olopatadin i m/z 278,1→91,0 za interni standard. Donji limit kvantifikacije (eng. *Lower Limit of Quantification* – LLOQ) bio je 0,2 ng mL⁻¹. Potvrđeno je da je olopatadin stabilan u biološkom materijalu pod različitim uslovima čuvanja, kao i da koeluirajuće komponente iz matriksa ne utiču bitno na intenzitet signala. Validirana metoda upotrebljena je za praćenje olopatadina u plazmi u farmakokinetičkoj studiji koja je podrazumevala aplikaciju pojedinačne doze tableta od 5 mg zdravim dobrovoljcima.

U radu *Liang Wei*-a i saradnika [50], uzorci su pripremani na automatskom *Tomtec* uređaju za čvrsto-tečnu ekstrakciju, a zatim je razdvajanje olopatadina i internog standarda desloratadina izvedeno u *Alltima C18* koloni sa mobilnom fazom metanol:0,05% mravlja kiselina (50:50 V/V). Detekcija je takođe sprovedena na tandem masenom spektrometru koristeći pozitivan ESI mod i MRM metodu. Praćene tranzicije bile su m/z 338,2→165,2 za olopatadin i m/z 311,1→259,1 za interni standard. Potvrđena je linearnost metode, a *intra-day* i *inter-day* tačnost i preciznost bili su u okviru zadatih kriterijuma. Velika specifičnost, osetljivost i reproduktivnost predložene metode ukazali su da je pogodna za praćenje farmakokinetike olopatadina za vreme kliničke upotrebe.

U radu *Soo–Wan Choi*-a i saradnika [51], ispitivani lek i interni standard loratadin izolovani su iz biološkog materijala čvrsto-tečnom ekstrakcijom. Potom je izvršena hromatografska analiza u RP *Capcell Pak* koloni izokratskim eluiranjem sa mobilnom fazom koja se sastojala od 70% acetonitrila i 30% 10 mmol L⁻¹ amonijum-acetata. Kvantitativna analiza je vršena MRM metodom sa tranzicijama m/z 337,9→164,8 za olopatadin i m/z 383,2→336,9 za interni standard. Opisana metoda uspešno je validirana i uključena u studije bioekvivalencije dve komercijalno dostupne formulacije tableta olopatadin-hidrohlorida.

Direktna analiza olopatadina i drugih antialergijskih lekova (ketoprofen, cetirizin, ibudilast) u humanoj plazmi pomoću HPLC metode sa tandem masenom detekcijom predstavljena je u radu [52]. Autori su upotreбили novu polimernu *MSPak GF* kolonu koja je omogućila *on-line* pripremu uzoraka biološkog materijala. Na taj način, proteini i makromolekuli matriksa isprani su sa kolone, dok su ispitivani analiti zadržani na stacionarnoj fazi. Zatim su analiti eluirani mobilnom fazom sa velikim sadržajem acetonitrila koristeći gradijentnu tehniku eluiranja. Kvantitativna analiza je izvršena u pozitivnom ESI modu pomoću SRM (eng. *Selected Reaction Monitoring*) metode. Prinosi ekstrakcije ispitivanih lekova bili su od 51,7% do 95,5%, a parametri regresione jednačine pokazali su zadovoljavajuću linearnost.

Za poređenje okularne farmakokinetike rastvora za oči olopatadin-hidrohlorida koncentracija 0,2% i 0,7% u različitim tkivima oka (rožnjača, konjunktiva, mrežnjača, sočivo, beonjača) i plazmi kunića, prikazana je još jedna RP-HPLC metoda u sprezi sa masenim detektorom. Kao interni standard korišćen je olopatadin-hidrohlid obeležen heksadeuterijumom. Uzorci bioloških materijala pripremljeni su metodom precipitacije proteina u prisustvu acetonitrila. Hromatografsko razdvajanje postignuto je u *Luna PFP* koloni (dimenzije 50 mm × 2 mm, 5 μm veličina čestica) koristeći smešu 0,1% mravlje kiseline i acetonitrila u odnosu 1:1 (35:65 V/V) pod izokratskim uslovima i pri protoku mobilne faze od 0,6 mL min⁻¹. Kvantitativna analiza je sprovedena na tandem masenom spektrometru u ESI (+) modu koristeći SRM metodu. Odabrane prekursor-proizvod jon tranzicije bile su m/z 338,2→165,1 za olopatadin i m/z 344,2→165 za interni standard obeležen izotopom.

Postavljena metoda omogućila je tačno i precizno praćenje koncentracije olopatadina u brojnim biološkim materijalima, što je iskorišćeno za procenu njegove farmakokinetike u dve različite formulacije kapi za oči [53].

U cilju procene sedativnog profila olopatadina i ketotifena, postavljena je HPLC tehnika sa tandem masenom detekcijom za njihovo određivanje u humanoj plazmi. Priprema uzoraka bazirala se na čvrsto-tečnoj ekstrakciji. *Deverosil* C30-UG-5 RP kolona korišćena je za hromatografsku analizu olopatadina, dok je *Synergi Max* C18 kolona, dimenzija 50 mm × 2 mm, upotrebljena za hromatografsku analizu ketotifena. Izokratsko eluiranje vršeno je mobilnom fazom koja je predstavljala smešu 10 mmol L⁻¹ amonijum-acetata i acetonitrila (65:35 V/V), sa protokom od 0,2 mL min⁻¹. Primenjena je ESI (+) jonizacija, a kvantitativna analiza se bazirala na kolizijom indukovanoj disocijaciji (eng. *Collision Induced Dissociation* – CID) molekulskih jona olopatadina *m/z* vrednosti 338 i ketotifena *m/z* vrednosti 310 u MRM modu [54].

Za ispitivanje uticaja P-glikoproteina na penetraciju olopatadina u moždano tkivo i njegovu koncentraciju u plazmi, razvijena je LC-MS metoda za njegovo određivanje u biološkim materijalima miševa nakon intravenske ili *per os* primene. Adekvatna priprema uzoraka homogenata mozga i plazme postignuta je selektivnom metodom čvrsto-tečne ekstrakcije. Hromatografsko razdvajanje urađeno je u *Symmetry* C18 koloni na 25°C, uz gradijentno eluiranje mobilnom fazom sačinjenom od 0,05% mravlje kiseline i metanola. Detekcija je izvršena u ESI (+) modu praćenjem molekuskog jona olopatadina *m/z* vrednosti 338 i molekuskog jona internog standarda azelastina *m/z* vrednosti 383 [55].

Kao što se iz prikazanog pregleda naučnih publikacija može zaključiti, sveobuhvatna karakterizacija hromatografskog ponašanja olopatadina u HILIC sistemu sa UV i MS/MS detekcijom do sada nije opisana. Takođe, uočeno je da nije razvijena HILIC metoda za istovremenu analizu geometrijskih izomera olopatadina i benzalkonijum-hlorida u kapima za oči uz primenu sistematičnog hemometrijskog pristupa, kao i za praćenje polarnijih proizvoda degradacije olopatadina pod različitim *stres* uslovima.

Većina objavljenih bioanalitičkih studija postavljena je za kvantitativnu analizu olopatadina u plazmi konvencionalnom RP-HPLC tehnikom sa masenom detekcijom nakon složene procedure pripreme uzoraka. S druge strane, nisu predstavljena istraživanja u kojima je olopatadin praćen u uzorcima humanih suza primenom HILIC tehnike u kombinaciji sa MS/MS detektorom.

1.3.4. Farmakodinamske osobine i okularni farmakokinetički profil olopatadina

Olopatadin-hidrohlorid je najnoviji predstavnik antihistaminika druge generacije za lokalnu primenu. Formulacija kapi za oči tipa rastvora proizvođača Alcon (*Patanol*[®]) i koncentracije 1 mg mL⁻¹, odobrena je 1996. godine u SAD i 2002. godine u EU kao prva linija terapije znakova i simptoma akutnog sezonskog i perenijalnog (celogodišnjeg) alergijskog konjuktivitisa [56]. Sezonski konjuktivitis je najčešći oblik alergijskog konjuktivitisa koji je izazvan proteinima polena različitih trava, drveća i korova. Javlja se u periodu cvetanja od marta do oktobra, obično kod osoba starosti od 20 do 40 godina. Perenijalni konjuktivitis predstavlja hroničnu upalu očne spojnice, uzrokovan je grinjom *Dermatophagoides pteronyssinus* iz kućne prašine ili životinjskom dlakom i ispoljava se tokom cele godine. Ovi tipovi alergijskog konjuktivitisa ne ostavljaju posledice na vid, ali neprijatni simptomi, kao što su crvenilo, svrab, otok, peckanje, suzenje očiju, osećaj grebanja i fotofobija mogu bitno narušiti kvalitet života i izazvati smanjenu radnu sposobnost [57].

Zbog svog potentnog bifaznog dejstva, poboljšane lokalne raspoloživosti i brzog efekta, olopatadin se smatra idealnim oftalmološkim antialergijskim agensom. Njegov dvostruki mehanizam delovanja zasnovan je na selektivnoj blokadi histaminskih H₁ receptora u konjuktivi, kao i na stabilizaciji membrana lizozima mastocita, odnosno posledičnoj inhibiciji njihove degranulacije i oslobađanja histamina i lipidnih proinflamatornih medijatora rane preosetljivosti [58–61]. Na taj način, olopatadin direktno i posredno antagonizuje efekte najvažnijeg endogenog vazoaktivnog amina u reakciji prvog tipa preosetljivosti. Dodatno, predstavlja prvi topikalni antihistaminik koji je klinički dokazan kao snažan stabilizator mastocita u oku i koji smanjuje simptome crvenila i svraba već nekoliko min. nakon aplikacije [56].

Režim doziranja 0,1% m/v oftalmološkog rastvora olopatadin-hidrohlorida je jedna kap u konjunktivalnu vrećicu obolelog oka, dva puta dnevno u razmaku od 8 h. Ukoliko je potrebno, lečenje može trajati i do četiri meseca [56]. Bezbedan je za primenu u pedijatrijskoj populaciji i ne zahteva prilagođavanje doze kod starijih pacijenata, kao i kod pacijenata sa insuficijencijom jetre i bubrega. S obzirom na to da kapi za oči sadrže i benzalkonijum-hlorid ($0,1 \text{ mg mL}^{-1}$) kao konzervans koji može uzrokovati keratopatiju, bitno je obratiti posebnu pažnju na pacijente sa suvim okom ili oštećenom rožnjačom. Takođe, kod pacijenata koji koriste meka kontaktna sočiva neophodno je sačekati najmanje 10 min. po aplikaciji kapi pre nego što se stave sočiva [62].

Zbog selektivnog vezivanja za *target* receptore, neznatne sistemske apsorpcije i činjenice da ne prolazi kroz hemato-encefalnu barijeru, olopatadin poseduje povoljan profil neželjenih dejstava. Brojnim pretkliničkim i kliničkim procenama potvrđeno je da ne izaziva značajne sistemske sporedne pojave, već samo retke prolazne poremećaje oka u vidu bola slabog intenziteta i povećane osetljivosti. Takođe, pretklinička ispitivanja nisu pokazala da olopatadin ispoljava teratogeni efekat i izaziva malformacije ploda, ali kako kliničke studije na ljudima nisu sprovedene, potreban je poseban oprez kada se propisuje trudnicama. Tokom izvođenja studija na životinjama detektovan je u mleku, tako da se njegova primena ne preporučuje dojiljama [56,62].

Farmakokinetički podaci, nakon primene 0,1% m/v kapi za oči olopatadin-hidrohlorida, nisu dostupni u literaturi. S druge strane, sprovedene su dve farmakokinetičke studije na životinjskim modelima nakon aplikacije pojedinačne doze 0,15% m/v oftalmološkog rastvora olopatadin-hidrohlorida. Rezultati prvog pretkliničkog ispitivanja pokazali su da je apsorpcija olopatadina brza, lokalna raspoloživost u oku velika (83%), eliminacija bifazna s poluvremenom od 0,8 h, a sistemska resorpcija minimalna. U drugom farmakokinetičkom istraživanju praćena je distribucija olopatadina u tkivo oka kunića nakon lokalne primene ^{14}C -olopatadina. Zaključeno je da se lek primarno distribuira u rožnjači, kao i da se maksimalna koncentracija u tkivnim strukturama postiže u intervalu 30–60 min. i potom brzo smanjuje s poluvremenom eliminacije 1–2 h [63].

U cilju procene sistemske bioraspoloživosti, izvedene su i dve okularne farmakokinetičke studije u koje je bilo uključeno ukupno 24 zdrava dobrovoljca kojima su bilateralno aplikovane 0,15% m/v kapi za oči olopatadin-hidrohlorida, dva puta dnevno i u toku dve nedelje. Nivoi olopatadina u plazmi, određeni metodom gasne hromatografije (eng. *Gas Chromatography* – GC) sa masenom detekcijom, bili su u opsegu od ispod limita kvantifikacije ($0,5 \text{ ng mL}^{-1}$) do $1,3 \text{ ng mL}^{-1}$. Kako su dobijene koncentracije bile 50–200 puta manje od koncentracije posle *per os* primene koja se dobro podnosi, potvrđeno je da je sistemska resorpcija lokalno primenjenog olopatadina bez značaja. Dodatno, podaci farmakokinetičkih studija nakon *per os* primene olopatadina ukazali su da njegovo prosečno poluvreme eliminacije u plazmi iznosi od 8 h do 12 h, kao i da se izlučivanje primarno odvija putem bubrega. Približno 70% primenjene doze olopatadina nađeno je u nepromenjenom obliku u urinu, dok su koncentracije mono desmetil- i N-oksida metabolita bile male [63].

2. CILJ RADA

Cilj ove doktorske disertacije bio je da se kroz karakterizaciju HILIC sistema unapredi analitika i bioanalitika olopatadina pomoću sledećih naučnih istraživanja:

1. Karakterizacija hromatografskog ponašanja geometrijskih izomera olopatadina i benzalkonijum-hlorida u HILIC sistemu sa UV detekcijom uz hemometrijsku podršku, kao i definisanje robusnog optimuma metode sa pratećom primenom u analizi farmaceutskog preparata kapi za oči.
2. Izvođenje *studija forsirane degradacije* na olopatadinu i praćenje njegove stabilnosti primenom prethodno postavljene HILIC metode sa UV detekcijom uz definisanje kinetike reakcije degradacije.
3. Optimizacija parametara masene detekcije, karakterizacija hromatografskog ponašanja olopatadina u HILIC-UHPLC sistemu primenom metodologije eksperimentalnog dizajna uz izbor optimalnih uslova, kao i određivanje adekvatne procedure pripreme uzoraka biološkog materijala u cilju razvoja veoma osetljive i selektivne metode pogodne za pouzdanu kvantitativnu analizu olopatadina u humanim suzama tokom kliničke primene.
4. Potvrđivanje primenljivosti validirane HILIC–ESI/MS/MS metode za praćenje koncentracije olopatadina u uzorcima suza prikupljenim od pacijenata *Klinike za očne bolesti Kliničkog centra Srbije* tokom sprovođenja kliničke prospektivne studije i procena njegovog okularnog farmakokinetičkog profila.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Aparati, laboratorijski pribor, reagensi i matematičko-softverski sistemi

Tečni hromatograf 1: Waters Breeze System, Milford, Masačusets, SAD

- ✓ Pumpa: *Waters 1525 Binary HPLC Pump*, SAD
- ✓ Detektor: *Waters 2487 UV/VIS Dual Absorbance Detector*
- ✓ Termostat za kolonu: *HP 1100*, model G 1316 A
- ✓ Grafička obrada podataka: *Breeze Software Data Collection, Windows XP*
- ✓ Mikrolitarski špric: 100 μL , *Thermo HP 1100*, Nemačka
- ✓ Zapremina injektovanja: 20 μL

Tečni hromatograf 2: Waters Acquity H-Class UPLC System, Milford, Masačusets, SAD

- ✓ Pumpa: *Waters Quaternary UPLC Pump* sa sistemom za deaeraciju, SAD
- ✓ Sistem za injektovanje: autosempler s kapacitetom od 112 standardnih bočica
- ✓ Grafička obrada podataka: *MassLynx[®] v4.1 Software Upgrade, Waters Group*
- ✓ Zapremina injektovanja: 1 μL

Tandem maseni spektrometar: Waters Triple Quadrupole System, Masačusets, SAD

- ✓ Jonski izvor: Elektrosprej jonizacija
- ✓ Maseni analizator: Trostruki kvadripol
- ✓ Detektor: Elektronski multiplikator kanonskog tipa

Elektronska analitička vaga: Sartorius tip 121, Sartorius GmbH, Getingen, Nemačka

Ultrazvučno kupatilo: Fungilab, Barselona, Španija

pH-metar sa kombinovanom staklenom elektrodom: Metrohm tip 780, Herisau, Švajcarska

Vorteks mešalica: Vortex-Genie tip 2T, Scientific Industries Inc, Njujork, SAD

Sistem za dobijanje vode HPLC kvaliteta: Simplicity tip 185, Darmštat, Nemačka

Centrifuga: Eppendorf tip 5424R, Eppendorf Ltd, Stivenidž, Velika Britanija

Laboratorijski pribor

- ✓ *Sistem za filtriranje: Whatman 47 mm glass/mesh membranski nosač, Whatman International Ltd, Mejdston, Engleska*
- ✓ *Membranski filteri: Nylon membranski filteri, 0,45 µm i 0,22 µm veličina pora, Whatman International Ltd, Mejdston, Engleska*
- ✓ *Varijabilne automatske pipete: Finnpiquette™ F1 adjustable-volume pipettes, Thermo Fisher Scientific Inc, Vanta, Finska*

Reagensi

- ✓ *Acetonitril: HPLC grade, Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD*
- ✓ *Amonijum-acetat: HPLC grade, J. T. Baker, Amsterdam, Holandija*
- ✓ *Glacijalna sirćetna kiselina: HPLC grade, Zorka Pharma, Šabac, Srbija*
- ✓ *Voda: HPLC grade, dobijena sistemom Simplicity tip 185, Darmštat, Nemačka*
- ✓ *Acetonitril: LC-MS grade, Fischer Scientific International, Virdžinija, SAD*
- ✓ *Voda: HPLC gradient grade, Fischer Scientific International, Virdžinija, SAD*
- ✓ *Mravlja kiselina: ~ 98%, Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD*

Hromatografske kolone

- ✓ *Alltima Amino – dimenzije 250 mm × 4,6 mm, 5 µm veličina čestica, Alltech Associates, Dirfild, Ilinois, SAD*
- ✓ *Betasil Silica – dimenzije 100 mm × 4,6 mm, 5 µm veličina čestica, Thermo Fisher Scientific Inc, San Hoze, Kalifornija, SAD*
- ✓ *Betasil Diol – dimenzije 100 mm × 4,6 mm, 5 µm veličina čestica, Thermo Fisher Scientific Inc, San Hoze, Kalifornija, SAD*
- ✓ *Betasil Cyano – dimenzije 100 mm × 4,6 mm, 5 µm veličina čestica, Thermo Fisher Scientific Inc, San Hoze, Kalifornija, SAD*
- ✓ *UPLC Acquity BEH Amide – dimenzije 100 mm × 2,1 mm, 1,7 µm veličina čestica, Waters, Milford, Masačusets, SAD*

Matematičko-softverski sistemi

- ✓ *Design-Expert*[®] 10.0. – *Stat-Ease Inc*, Mineapolis, Minesota, SAD
- ✓ *STATISTICA 7* – *StatSoft Inc*, Talsa, Oklahoma, SAD
- ✓ *Microsoft Office Excel 2010* – *Microsoft*, Neitik, Masačusets, SAD
- ✓ *MATLAB*[®] 7.10.0. – *The MathWorks Inc*, Neitik, Masačusets, SAD
- ✓ *MarvinSketch 6.1.0.* – *ChemAxon Kft*, Budimpešta, Mađarska
- ✓ *R*[®] 3.2.5. – *GNU General Public Licence*, Boston, Masačutes, SAD

3.2. Standardne supstance i farmaceutski oblik

- ✓ ***Olopatadin-hidrohlorid*** – referentni standard, *Enaltec Labs Ltd*, Mumbaj, India
- ✓ ***Benzalkonijum-hlorid*** – radni standard, smeša alkil benzildimetilamonijum-hlorida ($n\text{-C}_{12}\text{H}_{25} \geq 40\%$ i $n\text{-C}_{14}\text{H}_{29} \geq 20\%$), *Hemofarm A.D*, Vršac, Srbija
- ✓ ***Olopatadin E izomer*** – referentni standard, *USV limited*, Mumbaj, India
- ✓ ***Mianserin-hidrohlorid*** – radni standard, *Sigma-Aldrich*, Sent Luis, Misuri, SAD
- ✓ ***Pana***[®] – kapi za oči tipa rastvora (1 mg mL⁻¹), *Hemofarm A.D*, Vršac, Srbija
- ✓ ***Contrived tears***[®] – sterilni standardi rastvor veštačkih suza, *Ursa BioScience LLC*, Anapolis, Merilend, SAD
- ✓ ***Schirmer Tear Test Strips***[®] – dimenzije 15 mm × 5 mm, *Centrostyle S.p.A*, Vedano Olona, Italija

3.3. Optimizacija hromatografskog razdvajanja geometrijskih izomera olopatadina i benzalkonijum-hlorida u HILIC sistemu sa UV detekcijom**3.3.1. Priprema rastvora standarda za Box–Behnken dizajn**

Osnovni rastvori standarda olopatadina, njegove nečistoće i konzervansa pripremljeni su rastvaranjem u smeši acetonitril–15 mmol L⁻¹ rastvor amonijum-acetata (pH vrednost podešena na 4,5 glacijalnom sirćetnom kiselinom) u odnosu 82,5:17,5 V/V, tako da su postignute koncentracije od 1 mg mL⁻¹ za olopatadin-hidrohlorid i benzalkonijum-hlorid, odnosno 100 µg mL⁻¹ za *E* olopatadin.

Od osnovnih rastvora pripremljena je smeša rastvora standarda u 15 mmol L^{-1} rastvoru amonijum-acetata koja sadrži $500 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ olopatadin-hidrohlorida, $5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ olopatadin *E* izomera i $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ benzalkonijum-hlorida. Laboratorijska smeša čuvana je na temperaturi od 4°C , a pre injektovanja temperirana je na sobnu temperaturu.

3.3.2. Priprema mobilnih faza za Box–Benhken dizajn

Mobilne faze sastojale su se od smeše acetonitrila i vodene faze u koju je dodat pufer amonijum-acetat. pH vrednost vodene faze podešavana je glacijalnom sirćetnom kiselinom. Mobilne faze pripremane su prema planu eksperimenata definisanom matricom *Box–Benhken* dizajna, koji je prikazan u tabeli 2. Svaka mobilna faza pre upotrebe je filtrirana i deaerizovana.

3.3.3. Hromatografski uslovi

Tečni hromatograf: Waters Breeze System

Kolona: Betasil CN (dimenzije $100 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \text{ } \mu\text{m}$ veličina čestica)

Temperatura kolone: 30°C

Protok mobilne faze: 1 mL min^{-1}

Talasna dužina detekcije: 257 nm

Zapremina injektovanja: $20 \text{ } \mu\text{L}$

3.3.4. Hromatografski postupak

HPLC sistem, koji je podešen prema navedenim hromatografskim uslovima, ispiran je mobilnom fazom do postizanja stabilne bazne linije. U cilju provere pogodnosti sistema, izvršeno je ponovljeno injektovanje osnovnih rastvora standarda do postizanja ujednačenih površina hromatografskih pikova. Nakon toga, injektovana je pripremljena smeša standarda po tri puta. Kao odgovori sistema, izračunati su retencioni faktori analiziranih jedinjenja, kao i faktor selektivnosti između *Z* i *E* izomera olopatadina.

Tabela 2. Plan eksperimenata prema *Box–Behken* dizajnu

<i>N</i> _o	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>
1.	80,0 (–1)*	3,5 (–1)	15 (0)
2.	85,0 (+1)	3,5 (–1)	15 (0)
3.	80,0 (–1)	5,5 (+1)	15 (0)
4.	85,0 (+1)	5,5 (+1)	15 (0)
5.	80,0 (–1)	4,5 (0)	5 (–1)
6.	85,0 (+1)	4,5 (0)	5 (–1)
7.	80,0 (–1)	4,5 (0)	25 (+1)
8.	85,0 (+1)	4,5 (0)	25 (+1)
9.	82,5 (0)	3,5 (–1)	5 (–1)
10.	82,5 (0)	5,5 (+1)	5 (–1)
11.	82,5 (0)	3,5 (–1)	25 (+1)
12.	82,5 (0)	5,5 (+1)	25 (+1)
13.	82,5 (0)	4,5 (0)	15 (0)
14.	82,5 (0)	4,5 (0)	15 (0)
15.	82,5 (0)	4,5 (0)	15 (0)

A – sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi (%)

B – pH vrednost vodene faze

C – koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi (mmol L⁻¹)

*Kodirane vrednosti za nivoe faktora prikazane su u zagradama

Kompjuterski programi

Kreiranje eksperimentalnog plana i statistička analiza: *Design-Expert*[®] 10.0.

Konstruisanje trodimenzionih površina odgovora: STATISTICA 7

Identifikacija optimalnih hromatografskih uslova: MATLAB 7.10.0.

Predviđanje *pKa* i *logP* vrednosti analita: *MarvinSketch* 6.1.0.

3.4. Validacija HILIC metode sa UV detekcijom za analizu geometrijskih izomera olopatadina i benzalkonijum-hlorida u kapima za oči

Nakon definisanja optimalnih hromatografskih uslova, pristupilo se validaciji HILIC metode sa UV detekcijom za određivanje olopatadina, njegove nečistoće *E* izomera i konzervansa benzalkonijum-hlorida u kapima za oči, u skladu sa smernicom *Q2 (R1)* Međunarodne konferencije za harmonizaciju iz 2009. godine [64]. Obim validacije obuhvatio je definisanje sledećih parametara: selektivnost, limit kvantifikacije i limit detekcije, linearnost, tačnost i preciznost.

3.4.1. Hromatografski uslovi

Tečni hromatograf: Waters Breeze System

Kolona: Betasil CN (dimenzije 100 mm × 4,6 mm, 5 μm veličina čestica)

Temperatura kolone: 30°C

Mobilna faza: acetonitril–vodeni rastvor amonijum-acetata koncentracije 5 mmol L⁻¹ (pH vrednost podešena na 4,5 glacijalnom sirćetnom kiselinom) u odnosu 85:15 V/V

Protok mobilne faze: 1 mL min⁻¹

Talasna dužina detekcije: 257 nm

Zapremina injektovanja: 20 μL

3.4.2. Priprema rastvora za procenu selektivnosti metode

Osnovni rastvor *placeba* (natrijum-hlorid, dinatrijum-hidrogenfosfat i natrijum-EDTA) pripremljen je u mobilnoj fazi u koncentraciji koja je odgovarala ispitivanim kapima za oči. Smeša rastvora standarda koja sadrži olopatadin-hidrohlorid u koncentraciji od 500 μg mL⁻¹, benzalkonijum-hlorid u koncentraciji od 100 μg mL⁻¹ i olopatadin *E* izomer u koncentraciji od 5 μg mL⁻¹ pripremljena je u mobilnoj fazi.

3.4.3. Priprema rastvora standarda za određivanje LOD i LOQ vrednosti za olopatadin *E* izomer i konzervans benzalkonijum-hlorid

LOD i LOQ vrednosti za nečistoću olopatadin *E* izomer eksperimentalno su određene pripremanjem serije rastvora u mobilnoj fazi pod optimalnim hromatografskim uslovima u sledećim koncentracijama: 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0,10 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0,15 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0,20 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0,35 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0,375 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0,40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i 0,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Takođe, LOD i LOQ vrednosti za konzervans benzalkonijum-hlorid eksperimentalno su određene pripremanjem serije rastvora u mobilnoj fazi sledećih koncentracija: 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

3.4.4. Priprema rastvora standarda za procenu linearnosti metode

U cilju konstruisanja kalibracionih kriva pripremljene su rastuće koncentracije olopatadin-hidrohlorida, njegove nečistoće *E* izomera i konzervansa benzalkonijum-hlorida.

Osnovni rastvor standarda olopatadin-hidrohlorida pripremljen je tako što je odmereno 125 mg referentnog standarda i preneto u odmerni sud od 50 mL, koji je zatim dopunjen mobilnom fazom do oznake. Koncentracija dobijenog rastvora bila je 2,5 mg mL^{-1} . Nakon toga, otpipetirano je 0,15 mL, 0,2 mL, 0,4 mL, 0,8 mL, 1,2 mL, 2 mL, 3 mL i 4 mL osnovnog rastvora standarda u odmerne sudove od 10 mL, koji su potom mobilnom fazom dopunjeni do oznake. Na taj način, pripremljena je sledeća serija rastućih koncentracija olopatadin-hidrohlorida: 37,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 750 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Osnovni rastvor standarda olopatadin *E* izomera pripremljen je na taj način što je odmereno 5 mg referentnog standarda u odmerni sud od 10 mL, koji je potom mobilnom fazom dopunjen do oznake. Koncentracija dobijenog rastvora bila je $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. Nakon toga, 5 mL osnovnog rastvora standarda otpipetirano je u odmerni sud od 100 mL i dopunjeno mobilnom fazom do oznake. Koncentracija dobijenog radnog rastvora bila je $25 \mu\text{g mL}^{-1}$. Konačno, otpipetirano je 0,15 mL, 0,2 mL, 0,4 mL, 0,8 mL, 1,2 mL, 2 mL, 3 mL i 4 mL radnog rastvora standarda u odmerne sudove od 10 mL, koji su potom mobilnom fazom dopunjeni do oznake. Na taj način, pripremljena je sledeća serija rastućih koncentracija *E* izomera: $0,375 \mu\text{g mL}^{-1}$; $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$; $1 \mu\text{g mL}^{-1}$; $2 \mu\text{g mL}^{-1}$; $3 \mu\text{g mL}^{-1}$; $5 \mu\text{g mL}^{-1}$; $7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Osnovni rastvor standarda benzalkonijum-hlorida pripremljen je odmeravanjem 25 mg radnog standarda u odmerni sud od 25 mL, koji je potom mobilnom fazom dopunjen do oznake. Koncentracija dobijenog rastvora bila je 1 mg mL^{-1} . Nakon toga, 10 mL osnovnog rastvora standarda otpipetirano je u odmerni sud od 50 mL i dopunjeno mobilnom fazom do oznake. Koncentracija dobijenog radnog rastvora bila je $200 \mu\text{g mL}^{-1}$. Konačno, otpipetirano je 0,5 mL, 0,75 mL, 1 mL, 1,25 mL, 1,75 mL, 2,5 mL, 3,25 mL i 3,75 mL radnog rastvora standarda u odmerne sudove od 5 mL, koji su zatim mobilnom fazom dopunjeni do oznake. Na taj način, pripremljena je sledeća serija rastućih koncentracija benzalkonijum-hlorida: $20 \mu\text{g mL}^{-1}$; $30 \mu\text{g mL}^{-1}$; $40 \mu\text{g mL}^{-1}$; $50 \mu\text{g mL}^{-1}$; $70 \mu\text{g mL}^{-1}$; $100 \mu\text{g mL}^{-1}$; $130 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $150 \mu\text{g mL}^{-1}$.

3.4.5. Priprema rastvora za procenu tačnosti metode

Tačnost HILIC metode sa UV detekcijom procenjena je određivanjem olopatadin-hidrohlorida, njegove nečistoće *E* izomera i benzalkonijum-hlorida u rastvorima laboratorijskih smeša čiji sastav su, pored navedenih analiziranih jedinjenja, činile i komponente *placeba* u koncentracijama koje su odgovarale njihovim sadržajima u ispitivanom farmaceutskom obliku.

Od osnovnog rastvora standarda olopatadina koncentracije $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$, radnog rastvora standarda *E* izomera koncentracije $25 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ i osnovnog rastvora *placeba* pripremljene su po tri laboratorijske smeše u mobilnoj fazi sledećih koncentracija: $400 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ za olopatadin-hidrohlorid i $4 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ za *E* izomer; $500 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ za olopatadin-hidrohlorid i $5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ za *E* izomer; $600 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ za olopatadin-hidrohlorid i $6 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ za *E* izomer, što odgovara 80%, 100% i 120% u odnosu na ciljanu koncentraciju olopatadina, odnosno maksimalnu dozvoljenu koncentraciju *E* izomera (1%) [33].

Takođe, od osnovnog rastvora standarda benzalkonijum-hlorida koncentracije 1 mg mL^{-1} i osnovnog rastvora *placeba* pripremljene su po tri laboratorijske smeše u mobilnoj fazi na sledeći način: otpipetirano je po 5 mL osnovnog rastvora *placeba* i 0,8 mL, 1 mL i 1,2 mL osnovnog rastvora benzalkonijum-hlorida u odmerne sudove od 10 mL, koji su potom mobilnom fazom dopunjeni do oznake. Koncentracije benzalkonijum-hlorida u ovim laboratorijskim smešama bile su $80 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ i $120 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, što odgovara 80%, 100% i 120% u odnosu na njegovu ciljanu koncentraciju.

3.4.6. Priprema rastvora za procenu preciznosti metode

Procena preciznosti metode izvedena je korišćenjem komercijalno dostupnih *Pana*[®] kapi za oči koje sadrže 1 mg mL^{-1} olopatadin-hidrohlorida i $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ benzalkonijum-hlorida. Kako je koncentracija ispitivane nečistoće bila manja od LOD vrednosti, uzorak kapi za oči "opterećen" je rastvorom koji je sadržao olopatadin *E* izomer u koncentraciji koja je odgovarala maksimalno dozvoljenoj koncentraciji za dati farmaceutski oblik, odnosno 1% u odnosu na sadržaj olopatadin-hidrohlorida [33]. Ovaj rastvor pripremljen je tako što je 1 mL osnovnog rastvora *E* izomera koncentracije $500 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ prenet u odmerni sud od 25 mL, koji je potom mobilnom fazom dopunjen do oznake. Koncentracija *E* izomera u dobijenom rastvoru bila je $20 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Potom je 2,5 mL kapi za oči i 1,25 mL prethodno pripremljenog rastvora *E* izomera preneto u odmerni sud od 5 mL, koji je dopunjen mobilnom fazom do oznake. Koncentracija olopatadin-hidrohlorida u dobijenom rastvoru za procenu preciznosti bila je $500 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, dok je koncentracija *E* izomera bila $5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Ova procedura ponovljena je šest puta za tri različite serije *Pana*[®] kapi za oči.

Takođe, procena preciznosti metode izvršena je na taj način što su nerazblaženi uzorci komercijalno dostupnih kapi za oči, u kojima je koncentracija benzalkonijum-hlorida bila $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, šest puta injektovani u HPLC sistem.

3.4.7. Priprema rastvora uzorka Pana[®] kapi za oči

Rastvor uzorka Pana[®] kapi za oči pripremljen je tako što je 2,5 mL uzorka preneto u odmerni sud od 5 mL i dopunjeno mobilnom fazom do oznake. Koncentracija rastvora bila je $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ za olopatadin-hidrochlorid i $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ za benzalkonijum-hlorid. Postupak je ponovljen šest puta.

3.4.8. Hromatografski postupak

Pri navedenim optimalnim hromatografskim uslovima, HPLC sistem podešen je do postizanja stabilne bazne linije propuštanjem mobilne faze. U cilju provere pogodnosti sistema, izvršeno je ponovljeno injektovanje osnovnih rastvora standarda do postizanja ujednačenih površina hromatografskih pikova. Nakon toga, injektovani su pripremljeni rastvori analiziranih jedinjenja. Kao odgovori sistema, praćena su retencionna vremena i površine pikova ispitivanih jedinjenja.

Kompjuterski programi

Statistička obrada podataka: *Microsoft Office Excel 2010*

3.5. Ispitivanje stabilnosti olopatadina pod uslovima forsirane degradacije primenom HILIC metode sa UV detekcijom

3.5.1. Hromatografski uslovi

Tečni hromatograf: Waters Breeze System

Kolona: Betasil CN (dimenzije 100 mm × 4,6 mm, 5 μm veličina čestica)

Temperatura kolone: 30°C

Mobilna faza: acetonitril–vodeni rastvor amonijum-acetata koncentracije 5 mmol L⁻¹ (pH vrednost podešena na 4,5 glacijalnom sirćetnom kiselinom) u odnosu 85:15 V/V

Protok mobilne faze: 1 mL min⁻¹

Talasna dužina detekcije: 257 nm

Zapremina injektovanja: 20 µL

3.5.2. *Priprema rastvora standarda za izvođenje studija forsirane degradacije*

Osnovni rastvor standarda olopatadin-hidrohlorida koncentracije 1 mg mL⁻¹ pripremljen je u mobilnoj fazi. Od osnovnog rastvora otpipetirano je 0,5 mL i dopunjeno odgovarajućim *stres* agensom do 5 mL. Kao *stres* agensi korišćeni su 0,01 M, 0,5 M i 0,1 M hlorovodonična kiselina, 0,5 M i 1 M natrijum-hidroksid, destilovana voda, kao i rastvori vodonik-peroksida koncentracija 3%, 15% i 30%. Koncentracija olopatadin-hidrohlorida u ovim rastvorima bila je 100 µg mL⁻¹. Degradacija na povišenoj temperaturi praćena je zagrevanjem vodenog rastvora olopatadin-hidrohlorida koncentracije 100 µg mL⁻¹ na temperaturi od 60°C.

3.5.3. *Hromatografski postupak*

Pri navedenim optimalnim hromatografskim uslovima, HPLC sistem podešen je do postizanja stabilne bazne linije propuštanjem mobilne faze. Neposredno nakon dodatka *stres* agenasa, odnosno u 0-tom minutu sprovedena je analiza. Degradacija svih uzoraka praćena je u definisanim vremenskim intervalima, a koncentracija olopatadin-hidrohlorida nakon tretiranja *stres* uslovima određena je iz odgovarajuće kalibracione krive. Kao odgovori sistema, praćeni su retenciono vreme i površina pika olopatadin-hidrohlorida.

Kompjuterski programi

Određivanje kinetike degradacije olopatadina: *Microsoft Office Excel* 2010

3.6. Optimizacija HILIC sistema sa MS/MS detekcijom

3.6.1. Optimizacija uslova tandem masenog spektrometra

Tokom izvođenja preliminarnih ispitivanja, izvršen je izbor odgovarajuće metode i moda jonizacije i optimizirani su parametri ESI jonskog izvora i kolizione ćelije sa značajnim uticajem na intenzitet odgovora jona olopatadina. Mianserin-hidrohlorid je uspešno implementiran kao interni standard. Azot je upotrebljen kao desolvacioni gas i gas za raspršivanje, dok je kao kolizioni gas korišćen argon. U ESI (+) režimu rada uz direktno injektovanje olopatadina i internog standarda u maseni spektrometar, pri protoku od 5 $\mu\text{L min}^{-1}$, detektovani su joni sa najvećim intenzitetom signala i odabrani kao joni prekursori.

Zatim su automatskim procesom pomoću *Intelli Start* opcije softvera u MRM modu definisane po dve tranzicije za molekulske jone analita i internog standarda, kao i optimalne vrednosti kolizione energije i napona u konusu ESI jonskog izvora za svaku tranziciju. Prekursor-proizvod jon tranzicije sa najvećim intenzitetom signala praćene su za određivanje olopatadina i internog standarda, dok su druge odabrane tranzicije praćene u cilju njihove identifikacije i strukturne karakterizacije.

U sledećem koraku je manuelnom optimizacijom, pomoću *MS Tune* opcije softvera, procenjen uticaj ostalih parametara masene detekcije od značaja i određene su njihove optimalne vrednosti u cilju dobijanja što većeg intenziteta signala prethodno odabranih tranzicija. Temperatura jonskog izvora održavana je na 150°C, dok je temperatura desolvacije bila 500°C. Optimalna vrednost protoka desolvacionog gasa podešena je na 1.000 L h⁻¹, dok je protok gasa u konusu jonskog izvora bio 10 L h⁻¹.

Najbolji oblik pikova postignut je pri vremenu skeniranja od 0,1 s, dok je optimalna širina skeniranja bila 0,025 *m/z*. Rezolucija prvog kvadripola (eng. *Qaudrupole* – Q) podešena je na 12,0 (u slučaju jedinjenja malih molekulskih masa), odnosno na 14,2 (u slučaju jedinjenja velikih molekulskih masa). Moć razlaganja trećeg kvadripola za jedinjenja male molekulske mase fokusirana je na 10,4, a za jedinjenja velike molekulske mase na 15,0.

Kompjuterski programi

Optimizacija MS/MS uslova: *MS Tune* i *Intelli Start* opcije *MassLynx® v4.1 Software Upgrade*

3.6.2. Optimizacija hromatografskih uslova u HILIC-UHPLC sistemu*3.6.2.1. Priprema rastvora standarda za Box–Benhken dizajn*

Osnovni rastvori standarda olopatadina i mianserina pripremljeni su rastvaranjem u acetonitrilu tako da su postignute koncentracije od $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ za olopatadin-hidrohlid i mianserin-hidrohlid. Od osnovnih rastvora pripremljena je smeša rastvora standarda u 0,1%-tnom vodenom rastvoru mravlje kiseline koja sadrži $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ olopatadin-hidrohlida i $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ mianserin-hidrohlida. Laboratorijska smeša čuvana je na temperaturi od 4°C , a pre injektovanja temperirana je na sobnu temperaturu.

3.6.2.2. Priprema mobilnih faza za Box–Benhken dizajn

Mobilne faze sastojale su se od smeše acetonitrila i vodene faze u koju je dodata mravlja kiselina u koncentraciji od 0,1%. Mobilne faze pripremane su prema planu eksperimenata definisanom matricom *Box–Benhken* dizajna, koji je prikazan u tabeli 3. Svaka mobilna faza pre upotrebe je filtrirana.

3.6.2.3. Hromatografski uslovi

Tečni hromatograf: *Waters Acquity H-Class UPLC System, SAD*

Kolona: *UPLC Acquity BEH Amide* (100 mm × 2,1 mm, 1,7 μm veličina čestica)

Detekcija: *Waters Triple Quadrupole System, SAD*

Zapremina injektovanja: 1 μL

Tabela 3. Plan eksperimenata prema *Box–Behken* dizajnu

<i>N</i> ₂	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>
1.	90 (0)*	27 (–1)	0,25 (+1)
2.	87 (–1)	33 (+1)	0,20 (0)
3.	90 (0)	33 (+1)	0,25 (+1)
4.	93 (+1)	27 (–1)	0,20 (0)
5.	93 (+1)	30 (0)	0,15 (–1)
6.	87 (–1)	30 (0)	0,25 (+1)
7.	90 (0)	33 (+1)	0,15 (–1)
8.	93 (+1)	33 (+1)	0,20 (0)
9.	90 (0)	27 (–1)	0,15 (–1)
10.	87 (–1)	27 (–1)	0,20 (0)
11.	93 (+1)	30 (0)	0,25 (+1)
12.	87 (–1)	30 (0)	0,15 (–1)
13.	90 (0)	30 (0)	0,20 (0)
14.	90 (0)	30 (0)	0,20 (0)
15.	90 (0)	30 (0)	0,20 (0)

A – sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi (%)

B – temperatura kolone (°C)

C – protok mobilne faze (mL min⁻¹)

*Kodirane vrednosti za nivoe faktora prikazane su u zagradama

3.6.2.4. Hromatografski postupak

UHPLC sistem, koji je podešen prema navedenim hromatografskim uslovima, ispiran je mobilnom fazom do postizanja stabilne bazne linije. Nakon toga, injektovana je smeša rastvora standarda analita i internog standarda po tri puta. Kao odgovori sistema, praćena su retencionna vremena olopatadina i internog standarda, kao i kriterijum separacije (*S*) koji predstavlja razliku između retencionog vremena početka pika olopatadina i retencionog vremena kraja pika mianserina.

Kompjuterski programi

Kreiranje eksperimentalnog plana i statistička analiza: *Design-Expert*® 10.0.

Prikupljanje i analiza podataka: *MassLynx*® v4.1 *Software Upgrade*

Konstruisanje trodimenzionih površina odgovora: STATISTICA 7

Identifikacija optimalnih hromatografskih uslova: MATLAB 7.10.0.

Predviđanje *pKa* i *logP* vrednosti analita: *MarvinSketch* 6.1.0.

3.7. Optimizacija procedure pripreme uzoraka humanih suza

3.7.1. Priprema smeše za razvoj optimalne metode pripreme uzoraka suza

Za pronalaženje optimalnih uslova pripreme uzoraka suza, korišćena je smeša sačinjena od 300 µL veštačkih suza koje su "opterećene" sa 100 µL radnog rastvora internog standarda mianserin-hidrohlorida koncentracije 500 ng mL⁻¹ i 100 µL radnog rastvora olopatadin-hidrohlorida koncentracije 2,5 µg mL⁻¹. Zatim su "prazne" Širmerove test trake "opterećene" sa 50 µL prethodno pripremljene smeše.

3.7.2. Razvoj optimalne metode pripreme uzoraka suza

Tokom izvođenja preliminarnih eksperimenata, kao najpogodniji i relativno jednostavan postupak pripreme uzoraka suza sa velikim prinosom ekstrakcije olopatadina odabrana je tehnika precipitacije proteina. Acetonitril je izabran kao odgovarajući agens za denaturisanje proteina. Takođe, utvrđeni su faktori koji su značajno uticali na prinos postupka ekstrakcije (vreme vorteksovanja, vreme, temperatura i brzina centrifugiranja) i definisane su njihove optimalne vrednosti.

Razvijena metoda pripreme uzorka podrazumevala je da se uzorak humanih suza (~ 30 µL) najpre "optereti" sa 20 µL radnog rastvora internog standarda mianserin-hidrohlorida koncentracije 250 µg mL⁻¹. Zatim je dodato 950 µL acetonitrila i uzorak je čuvan na 4°C u vremenskom intervalu od 1 h. Nakon temperiranja na sobnu temperaturu, vršeno je mešanje uzorka na *Vortex* aparatu u trajanju od 15 min. Potom je vorteksovani uzorak centrifugiran 20 min. pri brzini od 21.000 rcf i na temperaturi od 4°C.

Posle centrifugiranja, supernatant je prenet u staklenu bočicu, tzv. vialu i direktno injektovan u UHPLC–MS/MS sistem. Zapremina injektovanja bila je 1 μL .

Kompjuterski programi

Prikupljanje i analiza podataka: *MassLynx® v4.1 Software Upgrade*

3.8. Priprema rastvora standarda za procenu linearnosti metode i priprema uzoraka za proveru kvaliteta

Osnovni rastvor standarda olopatadin-hidrohlorida koncentracije 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pripremljen je rastvaranjem određene količine referentnog standarda u vodi. Osnovni rastvor standarda mianserin-hidrohlorida koncentracije 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pripremljen je rastvaranjem određene količine radnog standarda u vodi. Nakon toga, od osnovnog rastvora olopatadina pripremljeni su radni rastvori standarda u vodi sledećih rastućih koncentracija: 10 ng mL^{-1} ; 200 ng mL^{-1} ; 500 ng mL^{-1} ; 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 7,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Radni rastvor standarda mianserina koncentracije 500 ng mL^{-1} pripremljen je razblaživanjem osnovnog rastvora u vodi. Svi rastvori čuvani su na temperaturi od 4°C, a pre upotrebe temperirani su na sobnu temperaturu.

Dalje, u čistu *Eppendorf* epruvetu preneto je 300 μL veštačkih suza koje su zatim "opterećene" sa 100 μL radnog rastvora internog standarda mianserin-hidrohlorida i 100 μL odgovarajućeg radnog rastvora olopatadin-hidrohlorida. Na taj način, dobijene su smeše koje su dalje upotrebljene za pripremu rastvora standarda za procenu linearnosti metode i uzoraka za proveru kvaliteta (eng. *Quality Control – QC*). Osam rastvora standarda za procenu linearnosti pripremljeno je tako što su "prazne" (eng. *blank*) Širmerove test trake "opterećene" sa po 50 μL pogodne smeše i 950 μL acetonitrila. Na taj način, postignute su sledeće željene koncentracije olopatadin-hidrohlorida koje su korišćene za konstruisanje kalibracione krive: 0,1 ng mL^{-1} ; 2 ng mL^{-1} ; 5 ng mL^{-1} ; 10 ng mL^{-1} ; 25 ng mL^{-1} ; 50 ng mL^{-1} ; 75 ng mL^{-1} i 100 ng mL^{-1} . QC uzorci pripremljeni su na isti način u maloj (LLOQ), srednjoj i velikoj koncentraciji za olopatadin-hidrohlomid: 0,1 ng mL^{-1} ; 25 ng mL^{-1} i 75 ng mL^{-1} . Rastvori standarda za procenu linearnosti i QC uzorci potom su tretirani metodom pripreme uzorka koja je opisana u poglavlju 3.7.2.

3.9. Validacija HILIC metode sa MS/MS detekcijom za određivanje olopatadina u humanim suzama

Optimizirana HILIC–MS/MS metoda validirana je prema zvaničnim smernicama američke Agencije za hranu i lekove (eng. *Food and Drug Administration – FDA*) za validaciju bioanalitičkih metoda iz 2013. godine [65]. Proces validacije podrazumeva je ispitivanje selektivnosti, osetljivosti, linearnosti, preciznosti, tačnosti, efekta prenošenja (eng. *carryover effect*), prinosa ekstrakcije (*Recovery* vrednost), efekta matriksa i stabilnosti uzoraka.

3.9.1. Hromatografski uslovi

Tečni hromatograf: Waters Acquity H-Class UPLC System, SAD

Kolona: UPLC Acquity BEH Amide (100 mm × 2,1 mm, 1,7 µm veličina čestica)

Temperatura kolone: 27°C

Mobilna faza: acetonitril–0,1% vodeni rastvor mravlje kiselene u odnosu 87:13 V/V

Protok mobilne faze: 0,25 mL min⁻¹

Zapremina injektovanja: 1 µL

3.9.2. Uslovi tandem masenog spektrometra

Temperatura jonskog izvora: 150°C

Protok desolvacionog gasa: 1.000 L h⁻¹

Temperatura desolvacije: 500°C

Protok konus gasa: 10 L h⁻¹

Napon kapilare: 3,5 kV

Napon kona: 35 V; 42 V

Koliziona energija: 15 V; 20 V; 30 V; 40V

3.9.3. *Selektivnost*

FDA [65] i smernice Evropske agencije za lekove (eng. *European Medicines Agency* – EMA) [66] usaglašene su u definisanju selektivnosti kao sposobnosti bioanalitičke metode da razdvoji i odredi ispitivani analit i interni standard od komponenti za koje se očekuje da će biti prisutne u uzorku. Selektivnost predložene metode ispitana je poređenjem "praznog" uzorka veštačkih suza i uzorka veštačkih suza "opterećenog" olopatadin-hidrohloridom u koncentraciji koja odgovara LLOQ vrednosti i mianserin-hidrohloridom u koncentraciji od 5 ng mL⁻¹. Kriterijum prihvatljivosti podrazumevao je da površina pika interferirajućih supstanci na retencionom vremenu analita bude manja od 20% u odnosu na njegovu površinu pika, odnosno da na retencionom vremenu internog standarda bude manja od 5% u odnosu na njegovu površinu pika [65,66].

3.9.4. *Osetljivost*

LLOQ vrednost predstavlja najmanju koncentraciju na kalibracionoj krivi koja se može kvantitativno analizirati sa prihvatljivom tačnošću i preciznošću. U konkretnom slučaju, LLOQ određen je eksperimentalno kao najmanja koncentracija olopatadin-hidrohlorida sa odnosom signala i šuma bazne linije većim od 10 i RSD vrednošću manjom od 20% za pet ponavljanja [65,66]. Dodatno, LOD vrednost prikazana je kao najmanji nivo olopatadin-hidrohlorida sa S/N odnosom većim od 3:1.

Za procenu osetljivosti predložene metode korišćena je laboratorijska smeša koja se sastojala od 100 µL radnog rastvora standarda olopatadin-hidrohlorida koncentracija 20 ng mL⁻¹; 15 ng mL⁻¹; 12,5 ng mL⁻¹; 10 ng mL⁻¹; 7,5 ng mL⁻¹; 5 ng mL⁻¹ i 2,5 ng mL⁻¹, zatim 100 µL radnog rastvora internog standarda mianserin-hidrohlorida koncentracije 500 ng mL⁻¹ i 300 µL vode. U 50 µL pripremljene smeše dodato je 950 µL acetonitrila i zatim injektovano u UHPLC–MS/MS sistem.

3.9.5. Linearnost

Linearnost metode procenjena je analiziranjem odgovarajućih rastvora sa po tri merenja, čija je priprema prethodno opisana u poglavlju 3.8. Opseg linearnosti bio je od 0,1 ng mL⁻¹ (LLOQ) do 100 ng mL⁻¹. Kalibraciona kriva ($y = ax + b$) od osam tačaka konstruisana je kao zavisnost odnosa površina pikova tranzicije 338→165 *m/z* olopatadina i tranzicije 265→91 *m/z* internog standarda (*y*) u funkciji poznate koncentracije analita (*x*), upotrebom metode najmanjih kvadrata i linearne regresione analize. Zbog heteroskedastičnosti kalibracione krive koja je potvrđena primenom F-testa, odabran je odgovarajući težinski faktor na osnovu najmanje sume procentualne relativne greške (eng. *Relative Error* – RE) [67,68]. Kriterijum prihvatljivost podrazumevao je da najmanje 75% standarda za procenu linearnosti poseduje RSD vrednost manju od 15% u odnosu na nominalnu koncentraciju, odnosno RSD vrednost manju od 20% za LLOQ standard [65,66]. Ispitana je i značajnost odsečka na ordinati pomoću Studentovog *t*-testa.

3.9.6. Tačnost i preciznost

U cilju testiranja tačnosti i preciznosti razvijene bioanalitičke metode, analizirano je po pet QC uzoraka u tri koncentracije olopatadin-hidrohlorida (0,1 ng mL⁻¹; 25 ng mL⁻¹ i 75 ng mL⁻¹) koristeći proceduru ekstrakcije predstavljenu u poglavlju 3.7.2. Za procenu tačnosti svaki QC uzorak ispitivan je sa po tri merenja, a za procenu ponovljivosti sa po jednim merenjem. *Intra-day* preciznost i tačnost određeni su u okviru jednog istog dana, dok su *inter-day* preciznost i tačnost ispitivani u toku tri uzastopna dana. *Intra-* i *inter-day* preciznost izračunata je i prikazana kao RSD vrednost, dok je *intra-* i *inter-day* tačnost izražena u procentima kao sistematska greška (*bias*). Kriterijumi prihvatljivosti uključili su preciznost i tačnost unutar regiona ±15% od teorijske koncentracije za srednju (25 ng mL⁻¹) i veliku koncentraciju (75 ng mL⁻¹), odnosno ±20% od teorijske koncentracije za LLOQ uzorke [65,66].

3.9.7. *Prinos ekstrakcije*

Prinos ekstrakcije predstavlja meru sposobnosti metode da ekstrahuje ispitivano jedinjenje iz biološkog materijala i u procentima izražava količinu analita dobijenu tokom pripreme uzorka i preanalitičkih postupaka. *Recovery* vrednost određena je poređenjem srednjih vrednosti površina pikova ekstrahovanih QC uzoraka i odgovarajućih rastvora standarda u vodi istih koncentracija, ali bez procesa ekstrakcije. Eksperimenti su izvedeni u tri koncentracije ($0,1 \text{ ng mL}^{-1}$; 25 ng mL^{-1} i 75 ng mL^{-1}) za olopatadin-hidrochlorid sa po pet ponavljanja. Svaki rastvor sadržao je interni standard u koncentraciji od 5 ng mL^{-1} . Kako minimalna *Recovery* vrednost nije propisana u smernicama za validaciju bioanalitičkih metoda [65], cilj je bio da se postigne njena konstantna vrednost u okviru ispitivanog opsega koncentracija.

3.9.8. *Efekat matriksa*

Efekat matriksa određen je iz odnosa površina pikova uzoraka koji su nakon ekstrakcije veštačkih suza "opterećeni" sa smešom olopatadina i internog standarda i odgovarajućih rastvora standarda u vodi istih koncentracija, ali bez ekstrakcije. Ovaj bitan parametar validacije ispitan je na tri nivoa koncentracija (LLOQ, srednja i velika QC koncentracija) za analit sa po pet ponavljanja. Koncentracija mianserin-hidrochlorida bila je 5 ng mL^{-1} . Definisane su vrednosti faktora matriksa (eng. *Matrix Factor* – MF) analita i internog standarda, kao i normalizovani MF koji predstavlja odnos MF ispitivanog leka i internog standarda. Varijabilnost MF izražena je u procentima kao RSD. Efekat matriksa nije se smatrao značajnim ukoliko su RSD vrednosti u opsegu od 85% do 115% [65].

3.9.9. *Efekat prenošenja*

Efekat prenošenja je fenomen koji je uslovljen zaostatkom određene količine analita u instrumentu nakon injektovanja, što utiče na tačnost i preciznost rezultata. Pojava odgovora olopatadina iz prethodno ispitivanog uzorka testirana je injektovanjem čistog rastvarača, odnosno acetonitrila nakon analize standarda za procenu linearnosti najveće koncentracije (eng. *Upper Limit of Quantification* – ULOQ), tj. 100 ng mL^{-1} .

Granična vrednost za efekat prenošenja nije propisana u smernicama za validaciju bioanalitičkih metoda [65,66], ali se smatra da njegovu vrednost treba svesti na minimum. Imajući u vidu da odgovor analita koji odgovara LLOQ mora biti najmanje pet puta veći od odgovora analita u "praznom" uzorku, postavljeni cilj bio je da vrednost efekta prenošenja bude manja od 20% odgovora olopatadina pri LLOQ koncentraciji.

3.9.10. Stabilnost

Ispitivanje stabilnosti analita u biološkom materijalu i rastvoru od suštinskog je značaja za dobijanje pouzdanih rezultata bioanalitičke metode [69]. U sklopu procesa validacije predložene HILIC metode sa MS/MS detekcijom, izvedene su *studije stabilnosti* u suzama analiziranjem QC uzoraka u tri koncentracije za olopatadin-hidrochlorid (0,1 ng mL⁻¹; 25 ng mL⁻¹ i 75 ng mL⁻¹) sa po tri merenja. Kratkoročna stabilnost ispitana je čuvanjem uzoraka na sobnoj temperaturi (25°C) u toku 24 h. Dugoročna stabilnost testirana je nakon izlaganja uzoraka temperaturi od -80°C tokom perioda od 30 dana. Stabilnost u toku zamrzavanja i odmrzavanja određena je nakon tri ciklusa rukovanja uzorcima sa sobne temperature na -80°C u trajanju od po 24 h. Za procenu stabilnosti upoređivani su rezultati dobijeni za uzorke za testiranje stabilnosti i *ex tempore* pripremljene uzorke istih koncentracija. Olopatadin se smatrao stabilnim ako je njegova koncentracija u uzorku nakon primene uslova čiji se uticaj procenjivao bila od 85% do 115%, u odnosu na početnu koncentraciju [65,66].

3.9.11. Hromatografski postupak

Pri navedenim optimalnim hromatografskim uslovima, UHPLC sistem podešen je do postizanja stabilne bazne linije propuštanjem mobilne faze. Nakon toga, injektovani su pripremljeni rastvori za procenu parametara validacije. Kao odgovori sistema, praćena su retencionna vremena i površine pikova olopatadina i internog standarda.

Kompjuterski programi

Statistička obrada podataka: *Microsoft Office Excel 2010*

Korigovanje kalibracione krive: *R*[®] 3.2.5.

3.10. Primena HILIC–ESI/MS/MS metode u farmakokinetičkoj studiji za određivanje koncentracije olopatadina u humanim suzama

Klinička prospektivna farmakokinetička studija odobrena je od strane Etičkog odbora *Kliničkog centra Srbije* pod brojem protokola 93/8 (Prilog) i sprovedena u *Klinici za očne bolesti*. U ovom ispitivanju učestvovalo je 30 ambulantnih pacijenata sa alergijskim konjuktivitisom koji su na terapiji olopatadinom, oba pola i starosti od 18 do 60 godina. Svaki učesnik je pismeno i usmeno upoznat sa neophodnim informacijama o leku i cilju izvođenja ispitivanja (*Obaveštenje za ispitanike*), a zatim je potpisao *Formular pristanka za učešće u praćenju efekata terapije*. Uzorci suza prikupljeni su u sledećim definisanim vremenskim intervalima: 0,25 h; 0,5 h; 1 h; 2 h i 8 h nakon lokalne aplikacije komercijalno dostupnih kapi za oči koje sadrže olopatadin-hidrohlorid u koncentraciji od 1 mg mL⁻¹. Uzorkovanje je vršeno pomoću sterilnih Širmerovih test traka za jednokratnu upotrebu na bezbolan način i uz minimalne traume za pacijenta. Vreme sakupljanja uzoraka iz oba oka istovremeno bilo je ograničeno na 5 min. U toku izvođenja istraživanja, ispitanici nisu koristili kontaktna sočiva i nisu bili na terapiji drugim oftalmološkim lekovima.

Zapremina uzorka suza određena je iz razlike mase Širmerove test trake izmerene nakon i pre uzorkovanja. U proseku, približno 30 µL uzorka suza sakupljeno je od svakog pojedinca. Do momenta izvođenja kvantitativne analize, uzorci su čuvani u plastičnim *Ependorf* epruvetama na definisanoj temperaturi od –80°C koja je strogo kontrolisana. Pre analize, uzorci su termostatirani na sobnu temperaturu i pripremljeni postupkom ekstrakcije koji je opisan u poglavlju 3.7.2. Koncentracije olopatadin-hidrohlorida u uzorcima suza izračunate su iz kalibracione krive za procenu linearnosti upotrebljene HILIC–ESI/MS/MS metode. Okularni farmakokinetički parametri izvedeni su iz odnosa koncentracija–vreme za olopatadin-hidrohlorid [70–73].

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Razvoj HILIC metode sa UV detekcijom za određivanje geometrijskih izomera olopatadina i benzalkonijum-hlorida u kapima za oči

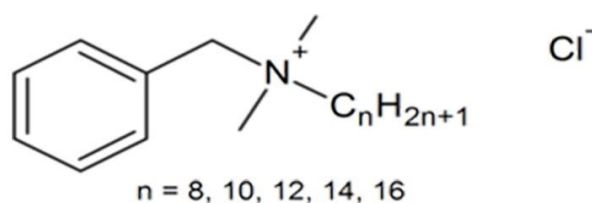
Predmet naučnog istraživanja prvog dela doktorske disertacije bio je ispitivanje mogućnosti primene nove HILIC metode sa UV detekcijom za kvantitativnu analizu geometrijskih izomera olopatadina i benzalkonijum-hlorida u farmaceutskoj formulaciji kapi za oči. Upotrebom savremenog hemometrijskog pristupa izvršena je kompletna karakterizacija hromatografskog ponašanja analiziranih jedinjenja u HILIC sistemu i dobijene su korisne naučne informacije o analitici olopatadina. Pomoću primenjenog sistematičnog postupka omogućena je i sveobuhvatna analiza složenog HILIC sistema, što je unapredilo dosadašnja naučna znanja iz ove oblasti. Robusnost metode ispitana je u fazi optimizacije iz matematičkih modela dobijenih primenom *Box-Benhken* eksperimentalnog dizajna, a identifikovanje globalnog optimuma postignuto je korišćenjem metodologije pretrage čvorova mreže. U cilju potvrđivanja pogodnosti primene optimizirane HILIC metode sa UV detekcijom, urađena je njena validacija. Konačno, postavljena metoda uspešno je upotrebljena za analizu komercijalno dostupnog farmaceutskog preparata.

4.1.1. Karakterizacija retencionog ponašanja analiziranih jedinjenja u HILIC sistemu sa UV detekcijom i izbor optimalnih hromatografskih uslova

U prvoj fazi naučnog istraživanja, urađena je karakterizacija i razvoj optimalne HILIC metode sa UV detekcijom uz pomoć unapređenih hemometrijskih alata u cilju istovremenog određivanja *Z* i *E* geometrijskih izomera olopatadina i konzervansa benzalkonijum-hlorida u formulaciji kapi za oči.

Kao što je već navedeno u uvodnom delu doktorske disertacije, slabo zadržavanje polarnih i jonizovanih jedinjenja, kao i neodgovarajući oblik pikova polarnih jedinjenja u konvencionalnoj RP-HPLC hromatografiji mogu se prevazići upotrebom unapređene HILIC tehnike [1]. Značaj HILIC hromatografije potvrđen je sve većim brojem objavljenih naučnih publikacija koje se bave njenom primenom u savremenoj analizi i bioanalizi lekova [2]. Međutim, zbog specifičnosti, kompleksnosti i nerobusne prirode HILIC sistema, neophodno je sprovesti dodatna istraživanja u cilju sticanja novih saznanja o ovoj relativno novoj i nedovoljno proučenoj separacionoj tehnici. Imajući u vidu karakteristike ispitivanih jedinjenja, istraživanje geometrijskih izomera olopatadina u HILIC modu predstavljalo je veliki izazov, posebno zbog činjenice da je *Z* izomer farmakološki aktivan, a *E* izomer glavna nečistoća. Pregledom naučne literature ustanovljeno je da je razdvajanje geometrijskih izomera u HILIC sistemima nedovoljno opisano, tako da se karakterizacija retencionog ponašanja olopatadina i njegove nečistoće *E* izomera u HILIC hromatografiji može smatrati inovativnom. Kako su *Z* i *E* olopatadin amfoterna jedinjenja i poseduju jonske karakteristike, očekivalo se da će se izborom HILIC tehnike postići njihova adekvatna hromatografska analiza.

Takođe, u naučno istraživanje uključen je i benzalkonijum-hlorid koji predstavlja najčešći aditiv u farmaceutskim oblicima (slika 10). S obzirom na to da kapi za oči veoma često sadrže benzalkonijum-hlorid kao konzervans, objavljen je veliki broj preglednih radova u kojima je opisana njegova kvantitativna analiza pomoću različitih instrumentalnih tehnika, pre svega RP-HPLC hromatografijom [74–77]. Međutim, zbog prisustva kvaternerne amonijum grupe u strukturi, određivanje benzalkonijum-hlorida u RP-HPLC sistemu zahteva upotrebu jon-par reagenasa. S druge strane, nisu dostupni literaturni podaci o njegovoj kvantitativnoj analizi primenom HILIC metode. U ovom naučnom istraživanju, smatralo se da će se u HILIC sistemu postići odgovarajuće određivanje pomenutog katjonskog surfaktanta bez nepoželjnog dodatka jon-par aditiva.



Slika 10. Hemijska struktura benzalkonijum-hlorida

4.1.1.1. Preliminarna faza istraživanja

Eksperimentalno istraživanje započeto je izvođenjem preliminarnih studija sa ciljem da se definišu kvalitativni i kvantitativni faktori sa najvećim uticajem na hromatografsku analizu ispitivanih komponenti smeše. Kako bi se smanjio broj potrebnih eksperimenata i olakšali postupci kreiranja empirijskih modela i pretrage eksperimentalnog prostora, postojala je težnja da se broj identifikovanih faktora svede na minimum. Ovakva strategija može se smatrati opravdanom, jer je za većinu hromatografskih sistema neophodno definisati samo tri ili četiri ključna faktora sa uticajem koji nije poznat i koji se mora detaljno analizirati. Izolovani faktori koji značajno utiču na HILIC sistem optimizirani su u sledećem koraku naučnog istraživanja.

Na osnovu prethodnih znanja i iskustava, pretpostavljeno je da su tip stacionarne faze, tip i koncentracija organskog rastvarača i pufera, kao i pH vrednost vodene faze faktori koji bi mogli imati značajan uticaj na ponašanje posmatranog HILIC sistema. Stoga, ovaj prvi korak naučnog istraživanja uključio je ispitivanje analiziranih jedinjenja u brojnim polarnim kolonama koristeći različite mobilne faze pod HILIC uslovima. U tom smislu, upotrebljene su kolone sa silikagel, amino silikagel, cijanopropil silikagel i diolnom silikagel stacionarnom fazom, čije su karakteristike opisane u poglavlju 3.1.

Kako sastav mobilne faze može bitno uticati na zadržavanje i razdvajanje ispitivanih jedinjenja u HILIC sistemu, široki opsezi vrednosti faktora koji se odnose na eluent procenjivani su u toku preliminarnе faze istraživanja. Acetonitril je odabran kao organska komponenta mobilne faze jer poseduje veću moć eluiranja i omogućava poboljšanu simetriju pikova u poređenju sa polarnijim metanolom. Udeo ovog aprotinskog rastvarača variran je u širokom opsegu koncentracija od 75% do 90%. Tokom izvođenja preliminarnih eksperimenata pokazano je da se povećanjem sadržaja organskog rastvarača postiže jače zadržavanje sve tri analizirane komponente na sve četiri kolone, kao i bolji oblik njihovih pikova, što je u skladu s dosadašnjim literaturnim zaključcima. Razlog je taj da se smanjenjem polarnosti mobilne faze smanjuje i njena moć eluiranja, tako da se polarni analiti duže zadržavaju na površini polarnih kolona [15].

Uticaj sadržaj acetonitrila u eluentu na retenciono ponašanje ispitivanih jedinjenja u HILIC sistemu očekivano je bio znatno veći u odnosu na uticaj ostalih hemijskih faktora, odnosno pH vrednosti vodene faze i koncentracije pufera.

U zavisnosti od pH vrednosti mobilne faze, olopatadin može postojati u različitim jonizovanim formama. pK_a vrednosti njegovih jonizujućih grupa su 2,58 (fenilsirćetna grupa) i 9,24 (tercijarna amino grupa) [35]. pH vrednost vodene faze podešavana je glacijalnom sirćetnom kiselinom i ispitana u intervalu od 3,0 do 6,0. U testiranom opsegu pH vrednosti vodene faze bazna i kisela grupa olopatadina i njegovog strukturno sličnog *E* izomera bile su u svojim jonizujućim oblicima, odnosno dominantna je bila željena zviterjonska forma molekula. Amonijum-acetat izabran je kao pogodan pufer i njegova koncentracija u vodenoj fazi bila je u opsegu od 5 mmol L⁻¹ do 60 mmol L⁻¹. Povećanje koncentracije pufera generalno dovodi do umereno većeg zadržavanja polarnih analita u silikagel, diolnoj i drugim neutralnim kolonama, a kao posledica povećanja adsorbovanog vodenog sloja na površini stacionarne faze. U ovoj preliminarnoj studiji, povećanje udela amonijum-acetata takođe je uslovalo blago povećanje vrednosti retencionih vremena olopatadina i njegove nečistoće *E* izomera. Opisani uticaj logično je bio veći u silikagel i diolnoj koloni, u poređenju sa cijanopropil kolonom usled njihove veće polarnosti. Kako jonske interakcije između jonizovanih jedinjenja i negativno naelektrisanih silanolnih grupa sa površine kolone verovatno nisu bile uključene u reticioni mehanizam na ovim stacionarnim fazama, *Z* i *E* olopatadin (prisutni u cviterjonskim oblicima), kao i benzalkonijum-hlorid (u katjonskom obliku) pokazali su slično retenciono ponašanje.

S druge strane, amino kolona koja je pri primenjenim hromatografskim uslovima pozitivno naelektrisana, ponašala se kao anjon menjanjivačka stacionarna faza. Naime, pozitivno naelektrisana ispitivana jedinjenja pokazuju elektrostatičke repulzivne (odbojne) interakcije sa površinom stacionarne faze amino kolone. Veće zadržavanje analiziranih komponenti sa povećanjem koncentracije amonijum-acetata u ovoj koloni je očekivano i nastalo je kao rezultat većeg stepena neutralizacije površine stacionarne faze suprotno naelektrisanim jonima pufera. Međutim, zbog prisustva elektrostatičkog odbijanja, sve komponente su se slabo zadržavale u amino koloni, tako da je njihovo zadovoljavajuće retenciono ponašanje bilo nemoguće postići.

Na silika i diolnoj koloni, benzalkonijum-hlorid je pokazao značajno različito retenciono ponašanje u poređenju sa drugim ispitivanim komponentama. Naime, eluirao se značajno kasnije, tako da je vreme trajanja analize bilo neprihvatljivo dugo, dok su se pikovi geometrijskih izomera olopatadina eluirali blizu pika mobilne faze. Ovakvo ponašanje verovatno je uslovljeno izraženom razlikom u polarnosti jedinjenja ($\log P$ vrednost benzalkonijum-hlorida 1,69) [35], kao i činjenicom da jonske interakcije nemaju zapaženu ulogu u retencionim mehanizmima u ovim kolonama. Takođe, pik benzalkonijum-hlorida u silika i diolnoj koloni posedovao je nepoželjan tzv. *tailing*.

Konačno, zaključeno je da su najprihvatljivije vreme trajanja analize, zadovoljavajuće razdvajanje komponenti smeše, kao i najbolji oblik pikova postignuti u cijanopropil koloni koja je odabrana kao najpogodnija i koja je korišćena za dalja istraživanja. Na osnovu rezultata iz preliminarnih studija, identifikovana su i tri kritična numerička faktora mobilne faze (udeo acetonitrila u eluentu, pH vrednost vodene faze i koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi) sa bitnim uticajem na retencionna vremena i kvalitet razdvajanja ispitivanih jedinjenja, koji će biti dodatno praćeni u fazi optimizacije HILIC metode sa UV detekcijom.

Dodatno, u toku preliminarne faze gradijentno eluiranje nije bilo razmatrano zbog sporog dovođenja u ravnotežu HILIC kolona i relativno jednostavne strukture ispitivanih jedinjenja, tako da je izokratski način eluiranja mobilnom fazom izabran kao odgovarajući. Uticaj temperature kolone ispitivan je u opsegu od 25°C do 35°C, a protok mobilne faze u opsegu od 0,5 mL min⁻¹ do 1,5 mL min⁻¹. S obzirom na predvidiv uticaj na ponašanje hromatografskog sistema, ovi fizički faktori održavani su na konstantnim nivoima tokom daljeg naučnog istraživanja. Odabrana temperatura stacionarne faze bila je 30°C, a protok eluenta 1 mL min⁻¹.

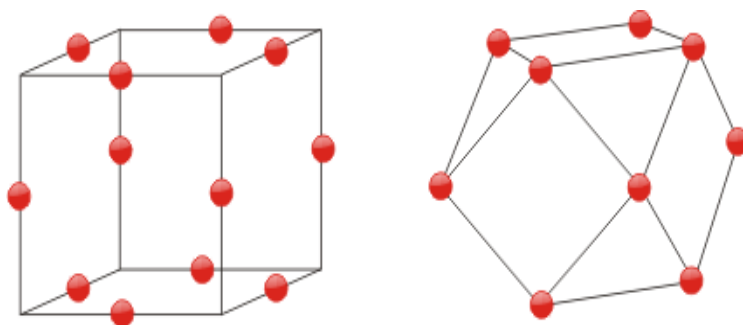
4.1.1.2. Primena metodologije eksperimentalnog dizajna

U cilju sprovođenja detaljnije procene hromatografskog ponašanja analiziranih jedinjenja u HILIC sistemu sa UV detekcijom i postavljanja optimalnih hromatografskih uslova za njihovo određivanje u kapima za oči, u sledećem koraku naučnog istraživanja primenjena je savremena hemometrijska procedura. Uz pomoć metodologije eksperimentalnog dizajna (eng. *Design of Experiments* – DoE) uspostavljene su odgovarajuće matematičke zavisnosti značajnih hromatografskih faktora od željenih odgovora sistema na osnovu kojih je izvršeno kompletno tumačenje retencionog ponašanja ispitivanih jedinjenja. Naime, pomoću kreiranih empirijskih modela na jednostavan i efikasan način postignuta je kvantitativna procena uticaja svih pojedinačnih faktora i njihovih interakcija na praćene odgovore sistema. Definisane efekte faktorskih interakcija u HILIC modu smatra se izuzetno značajnim zbog toga što interakcije mogu imati bitnu ulogu u hromatografskom ponašanju analita.

Na osnovu rezultata prikupljenih u preliminarnoj fazi istraživanja, najpre su pažljivo definisani opsezi za izabrane značajne faktore mobilne faze koji će dalje biti istraživani u fazi optimizacije HILIC metode. Pravilan odabir opsega variranja faktora jedan je od kritičnih koraka u DoE metodologiji, tako da je bilo neophodno posvetiti posebnu pažnju prilikom njihovog definisanja. Kako se najveći broj zavisnosti u tačnoj hromatografiji aproksimira relativno jednostavnim linearnim i kvadratnim funkcijama, preširoki intervali faktora mogli bi usloviti pojavu složenijih tipova zavisnosti ispitivanih odgovora od odabranih faktora. Na taj način, linearnim i kvadratnim funkcijama bilo bi onemogućeno postizanje odgovarajućeg modelovanja, odnosno neophodne aproksimacije. S druge strane, preuski intervali mogu izazvati situaciju u kojoj promena datog faktora ne dovodi do značajnije promene praćenog odgovora, usled čega se ne bi mogli izvesti ispravni zaključci tokom razvoja metode [78]. Konačni opsezi identifikovanih kvantitativnih faktora bili su 80–85% za sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, 3,5–5,5 za pH vrednost vodene faze i 5–25 mmol L⁻¹ za koncentraciju amonijum-acetata u vodenoj fazi. Na taj način, definisan je eksperimentalni prostor koji je potom ispitan hemometrijskom tehnikom, odnosno primenom odgovarajućeg eksperimentalnog dizajna površine odgovora (eng. *Response Surface Methodology* – RSM).

Dizajni površine odgovora zasnovani su na sprovođenju relativno malog broja pažljivo isplaniranih eksperimenata na najmanje tri različita nivoa faktora u cilju definisanja jednostavne kvadratne zavisnosti, koja omogućava teorijsko izračunavanje ključnih odgovora za svaku moguću kombinaciju značajnih faktora [78]. Na taj način, eksperimentalni prostor može se detaljno pretražiti samo matematičkim modelovanjem bez potrebe za izvođenjem dodatnih eksperimenata. RSM dizajni koji se najčešće koriste u fazi optimizacije metode su *Box–Behnken* dizajn, centralni kompozicioni dizajn, *Delert* dizajn, D-optimalni dizajn, dizajn smeše i pun faktorski dizajn 3^k . Odabir odgovarajućeg dizajna zavisi od vrste ispitivanih faktora, njihovih intervala variranja, prihvatljivog broja eksperimenata, kao i od očekivanja analitičara [79].

U ovom delu naučnog istraživanja upotrebljen je *Box–Behnken* dizajn. Šematski prikaz eksperimenata definisanih ovim tzv. *rotatable* dizajnom za tri ispitivana faktora, predstavljen je na slici 11.



Slika 11. Grafički prikaz *Box–Behnken* dizajna za tri faktora

Primenjeni *Box–Behnken* dizajn predstavlja kombinaciju tri 2^k puna faktorska dizajna (k je broj ispitivanih faktora), odnosno sastoji se iz tri dela sa po četiri eksperimenata. Posmatranjem svakog pojedinačnog dela, može se zaključiti da su dva faktora raspoređena u punom faktorskom dizajnu na dva nivoa, dok se treći faktor nalazi na nominalnom nivou. U prostoru su tačke postavljene tako da formiraju površinu kruga, odnosno smeštene su na sredini svake ivice kocke, izuzev centralne tačke koja se nalazi u sredini kocke [80].

Broj potrebnih eksperimenata (N) prema matrici *Box–Behnken* dizajna izračunava se pomoću sledeće jednačine:

$$N = 2k(k - 1) + c_p \quad (1)$$

gde je k – broj ispitivanih faktora, a c_p – broj eksperimenata u centralnoj tački.

U poređenju sa ostalim tipovima RSM dizajna, *Box–Behnken* poseduje značajne prednosti zbog kojih je i izabran za evaluaciju hromatografskog ponašanja ispitivanih jedinjenja. Naime, smatra se jednim od najefikasnijih dizajna jer zahteva izvođenje manjeg broja eksperimenata u odnosu na ostale vrste dizajna, a obezbeđuje jednako pouzdane rezultate. Takođe, *Box–Behnken* dizajn ne sadrži takvu kombinaciju faktora u kojoj su svi faktori na vrhovima kocke, što ga čini veoma pogodnim u specijalnim slučajevima kada je nepoželjno izvođenje eksperimenata na ekstremnim vrednostima, koji bi mogli dovesti do nezadovoljavajućih rezultata [81].

Korišćenjem *Box–Behnken* dizajna u fazi karakterizacije hromatografskog ponašanja geometrijskih izomera olopatadina i benzalkonijum-hlorida u HILIC sistemu sa UV detekcijom, istražen je uticaj tri kritična faktora povezana sa mobilnom fazom na tri nivoa (granični donji, nominalni i granični gornji). Kodiranim vrednostima -1 i $+1$ dodeljene su sledeće stvarne vrednosti ispitivanih faktora: za sadržaj acetonitrila vrednosti 80% i 85%, za pH vrednost vodene faze 3,5 i 5,5, a za sadržaj amonijum-acetata u vodenoj fazi vrednosti 5 mmol L⁻¹ i 25 mmol L⁻¹. Matrica primenjenog dizajna dopunjena je sa tri replikacije u centralnoj tački (eksperimenti 13, 14 i 15), koje su bile od značaja u proceni eksperimentalne greške i linearnosti kreiranih matematičkih modela. Plan eksperimenta definisan matricom *Box–Behnken* dizajna, koji se sastojao od ukupno 15 eksperimenata, kreiran je pomoću *Design-Expert*[®] 10.0. softvera i prikazan u tabeli 2. Priprema smeše standarda geometrijskih izomera olopatadina i benzalkonijum-hlorida, kao i priprema mobilnih faza, takođe su opisane u poglavljima 3.3.1. i 3.3.2.

Nakon randomiziranog izvođenja eksperimenata predviđenih matricom odgovarajućeg dizajna, pristupilo se analizi dobijenih hromatograma. S obzirom na to da je cilj istraživanja bio da se objasni retenciono ponašanje ispitivanih jedinjenja u HILIC sistemu, kao odgovori sistema praćena su retencionna vremena svih komponenti smeše.

Zatim su, na osnovu njihovih vrednosti i vrednosti retencionog vremena pika mobilne faze, izračunati odgovarajući retencioni faktori. Takođe, odabran je odgovarajući elementarni kriterijum razdvajanja, odnosno faktor selektivnosti između *Z* i *E* geometrijskih izomera olopatadina. Dobijeni rezultati izabranih odgovora hromatografskog sistema prikazani su u tabeli 4.

Tabela 4. Eksperimentalno dobijene vrednosti praćenih hromatografskih odgovora za *Box–Behnken* dizajn*

<i>N</i> ₂	<i>k</i> ₁	<i>k</i> ₂	<i>k</i> ₃	<i>α</i> _{1,2}
1.	0,83	1,09	2,13	1,32
2.	1,37	1,94	2,51	1,42
3.	0,62	1,11	4,29	1,79
4.	1,38	2,63	5,46	1,91
5.	0,86	1,78	6,35	2,08
6.	1,59	3,53	8,37	2,22
7.	0,59	0,93	2,25	1,57
8.	1,20	2,08	2,91	1,73
9.	1,73	2,56	4,37	1,48
10.	1,04	2,09	10,73	2,01
11.	0,82	1,04	1,85	1,27
12.	0,89	1,50	3,37	1,68
13.	0,94	1,67	3,45	1,78
14.	0,91	1,61	3,39	1,77
15.	0,92	1,62	3,43	1,77

*k*₁ – retencioni faktor olopatadin-hidrohlorida

*k*₂ – retencioni faktor olopatadin *E* izomera

*k*₃ – retencioni faktor benzalkonijum-hlorida

*α*_{1,2} – faktor selektivnosti između *Z* i *E* geometrijskih izomera olopatadina

*Maksić J, Jovanović M, Rakić T, Popović I, Ivanović D, Jančić–Stojanović B. *Chromatographic analysis of olopatadine in hydrophilic interaction liquid chromatography. J Chromatogr Sci.* 2015; 53 (5): 680–6.

Najčešći pristup građenju eksperimentalnih modela podrazumeva primenu metode višestruke linearne regresije (eng. *Multiple Linear Regression – MLR*) i metode najmanjih kvadrata (eng. *Least Squares Method*) [79]. MLR metoda zasnovana je na fitovanju vrednosti odabranih odgovora dobijenih sprovođenjem eksperimenata prema matrici primenjenog dizajna u odgovarajuće modele i omogućava uspostavljanje matematičkog odnosa u sistemu u kome se ispituje uticaj više faktora na jedan odgovor sistema. Metoda najmanjih kvadrata podrazumeva svođenje na minimum sume kvadrata odstupanja vrednosti odgovora predviđenih kreiranim modelom u odnosu na eksperimentalne vrednosti odgovora. Statističkom analizom dobijenih rezultata praćenih odgovora sistema pomoću MLR tehnike i metode najmanjih kvadrata, pokazano je da odgovarajući matematički model za k_2 , k_3 i $\alpha_{1,2}$ odgovore predstavlja polinom drugog stepena sa dvofaktorskim interakcijama, koji se može prikazati sledećom kvadratnom jednačinom:

$$y = b_0 + b_1A + b_2B + b_3C + b_{12}AB + b_{13}AC + b_{23}BC + b_{11}A^2 + b_{22}B^2 + b_{33}C^2 \quad (2)$$

gde je b_0 – odsečak, b_1 , b_2 i b_3 – regresioni koeficijenti linearnih članova, b_{11} , b_{22} i b_{33} – regresioni koeficijenti kvadratnih članova, b_{12} , b_{13} i b_{23} – regresioni koeficijenti članova dvofaktorskih interakcija, a A , B i C – ispitivani faktori.

S druge strane, k_1 odgovor je fitovan u najjednostavniji polinomijalni model, odnosno linearni model sa dvofaktorskim interakcijama koji se može opisati sledećom jednačinom:

$$y = b_0 + b_1A + b_2B + b_3C + b_{12}AB + b_{13}AC + b_{23}BC \quad (3)$$

gde je značenje svih regresionih koeficijenata članova identično kao i u slučaju prethodno predstavljene kvadratne jednačine.

Odgovarajući regresioni koeficijenti kreiranih kvadratnih i linearnog matematičkog modela, njihova statistička značajnost i drugi relevantni statistički parametri predstavljenu su u tabeli 5.

Tabela 5. Koeficijenti generisanih matematičkih modela i pogodna statistička analiza*

<i>Odgovor</i>	<i>k₁</i>		<i>k₂</i>		<i>k₃</i>		<i>α_{1,2}</i>	
<i>Član</i>	<i>Koeficijent</i>	<i>p-vrednost</i>	<i>Koeficijent</i>	<i>p-vrednost</i>	<i>Koeficijent</i>	<i>p-vrednost</i>	<i>Koeficijent</i>	<i>p-vrednost</i>
<i>b₀</i>	1,045	0,0003♦	1,630	0,0005♦	3,426	0,0003♦	1,789	0,0020♦
<i>b₁</i>	0,331	< 0,0001♦	0,661	< 0,0001♦	0,531	0,0256♦	0,065	0,0593
<i>b₂</i>	-0,012	0,0673	0,087	0,1507	1,623	0,0002♦	0,245	0,0003♦
<i>b₃</i>	-0,014	0,0717	-0,551	0,0001♦	-2,436	0,0001♦	-0,191	0,0008♦
<i>b₁₂</i>	0,055	0,3839	0,172	0,0702	0,204	0,4445	0,006	0,8986
<i>b₁₃</i>	-0,032	0,6010	-0,232	0,0244♦	-0,343	0,2126	0,005	0,8936
<i>b₂₃</i>	0,040	0,6300	0,157	0,0950	-1,215	0,0038♦	-0,028	0,4996
<i>b₁₁</i>			0,176	0,0743	0,033	0,9020	0,063	0,1708
<i>b₂₂</i>			-0,119	0,2014	0,149	0,5912	-0,236	0,0021♦
<i>b₃₃</i>			0,281	0,0150♦	1,515	0,0017♦	0,060	0,1853
<i>RSD [%]</i>	0,289		0,018		0,216		0,011	
<i>R²</i>	0,929		0,985		0,987		0,973	
<i>Adjusted R²</i>	0,875		0,957		0,963		0,923	
<i>Predicted R²</i>	0,831		0,913		0,922		0,895	
<i>Lack of fit</i>	0,122		0,088		0,189		0,213	

k₁ – retencioni faktor olopatadin-hidrohlorida

k₂ – retencioni faktor olopatadin *E* izomera

k₃ – retencioni faktor benzalkonijum-hlorida

α_{1,2} – faktor selektivnosti između *Z* i *E* geometrijskih izomera olopatadina

♦ Koeficijenti modela su značajni za *p*-vrednost < 0,05

*Maksić J, Jovanović M, Rakić T, Popović I, Ivanović D, Jančić–Stojanović B. Chromatographic analysis of olopatadine in hydrophilic interaction liquid chromatography. *J Chromatogr Sci.* 2015; 53 (5): 680–6.

Adekvatnost dobijenih polinomijalnih modela, koji detaljno opisuju praćene odgovore sistema, ispitana je primenom analize varijanse, odnosno ANOVA (eng. *Analysis of Variance*) testa. U tom smislu, određeni su koeficijenti determinacije (R^2) koji definišu korelaciju između eksperimentalno dobijenih i modelima izračunatim vrednostima odgovora, kao i korigovani R^2 (eng. *adjusted R^2*) koji predstavljaju R^2 vrednosti prilagođene ukupnom broju eksperimenata. Takođe, izračunate su predviđene R^2 vrednosti (eng. *predicted R^2*) koje opisuju koliko dobro modeli predviđaju vrednosti odgovora. Na osnovu prikazanih vrednosti parametara R^2 , *adjusted R^2* i *predicted R^2* koje su bile bliske 1, potvrđena je adekvatnost svih empirijskih modela i njihova dobra sposobnost predviđanja. Drugim rečima, dobijeni modeli izvršili su zadovoljavajuću aproksimaciju eksperimentalno prikupljenih retencionih podataka. Takođe, tzv. *lack of fit* vrednosti koje procenjuju greške koje potiču od samih modela statistički nisu bile značajne (p -vrednost $> 0,05$). Pouzdanost kreiranih jednačina dodatno je potvrđena i malim RSD vrednostima ($RSD < 0,3\%$).

Zatim se pristupilo detaljnom tumačenju uticaja izabranih faktora i njihovih interakcija na posmatrane odgovore sistema pomoću statistički značajnih regresionih koeficijenata kreiranih matematičkih modela, koji su prikazani u tabeli 5. Step en efekta svakog ispitivanog faktora sagledan je analizom apsolutnih vrednosti koeficijenata linearnih članova definisanih empirijskih modela. Takođe, na osnovu predznaka koeficijenata linearnih članova procenjen je smer u kome su se odgovori menjali sa promenom odgovarajućih faktora. Na osnovu apsolutnih vrednosti statistički značajnih koeficijenata članova dvofaktorskih interakcija i grafičkog prikaza polinomijalnih modela u obliku trodimenzionih (3-D) dijagrama, na pravilan način protumačen je relativno komplikovan istovremeni uticaj dva ispitivana faktora na odgovore sistema. Konačno, analizirani su i koeficijenti kvadratnih članova modela koji su ukazali na postojanje nelinearne zavisnosti posmatranog odgovora u funkciji ispitivanih faktora.

S obzirom na to da su kao odgovori praćeni retencioni faktori sva tri ispitivana jedinjenja i faktor selektivnosti između kritičnog para pikova, istovremenom analizom uticaja pojedinačnih faktora i njihovih interakcija bilo je moguće izvršiti kompletan opis i predviđanje retencionog ponašanja olopatadina, njegove nečistoće *E* izomera i benzalkonijum-hlorida, kao i kvaliteta razdvajanja geometrijskih izomera olopatadina u složenom HILIC sistemu.

U toku izvođenja preliminarnih eksperimenata zapaženo je da se retencioni faktori svih analiziranih jedinjenja značajnije menjaju sa promenom sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi. Razmatranjem dobijenog linearnog modela za k_1 odgovor, moglo se primetiti da je jedino b_1 regresioni koeficijent koji se odnosi na udeo acetonitrila u eluentu statistički značajan (p -vrednost $< 0,05$). Dodatno, p -vrednosti koje odgovaraju regresionim koeficijentima linearnih članova povezanih sa koncentracijom acetonitrila u mobilnoj fazi su manje od 0,05 i u slučaju polinoma drugog reda za k_2 i k_3 odgovore. Na taj način, potvrđen je veoma intenzivan uticaj udela acetonitrila u HILIC mobilnoj fazi na retenciono ponašanje sve tri ispitivane komponente.

Daljim tumačenjem kvadratnog modela za olopatadin *E* izomer, na osnovu statistički značajnog b_3 regresionog koeficijenta, pokazan je značajan uticaj koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi na vrednost njegovog retencionog faktora. Bitan efekat koncentracije amonijum-acetata na retenciono ponašanje *E* izomera potvrđen je i na osnovu b_{33} koeficijenta kvadratnog člana za koji je p -vrednost manja od 0,05. Takođe, dvofaktorska interakcija (p -vrednost b_{13} koeficijenta = 0,0244), koja odgovara sadržaju acetonitrila u eluentu i koncentraciji amonijum-acetata u vodenoj fazi, značajno utiče na zadržavanje posmatrane nečistoće na cijanopropil stacionarnoj fazi.

Dodatno, retencioni faktor benzalkonijum-hlorida je pod uticajem sva tri ispitivana faktora, što je zapaženo na osnovu statistički značajnih koeficijenata linearnih članova i statistički značajnog b_{33} koeficijenta kvadratnog člana povezanog sa koncentracijom amonijum-acetata u vodenoj fazi.

Zadržavanje poslednje eluirane komponente u koloni je i pod istovremenim efektom pH vrednosti vodene faze i koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi, što je zaključeno posmatranjem statistički značajnog b_{23} koeficijenta člana dvofaktorske interakcije.

Analizom kreiranog kvadratnog modela za faktor selektivnosti između Z i E izomera olopatadina, moglo se primetiti da su pH vrednost vodene faze i koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi faktori koji pokazuju statistički značajan uticaj. S druge strane, sadržaj acetonitrila u ispitivanom opsegu ne poseduje bitan efekat na razdvajanje geometrijskih izomera olopatadina. Značajan efekat pH vrednosti vodene faze na $\alpha_{1,2}$ odgovor potvrđen je i na osnovu p -vrednosti veće od 0,05 za regresioni koeficijent kvadratnog člana.

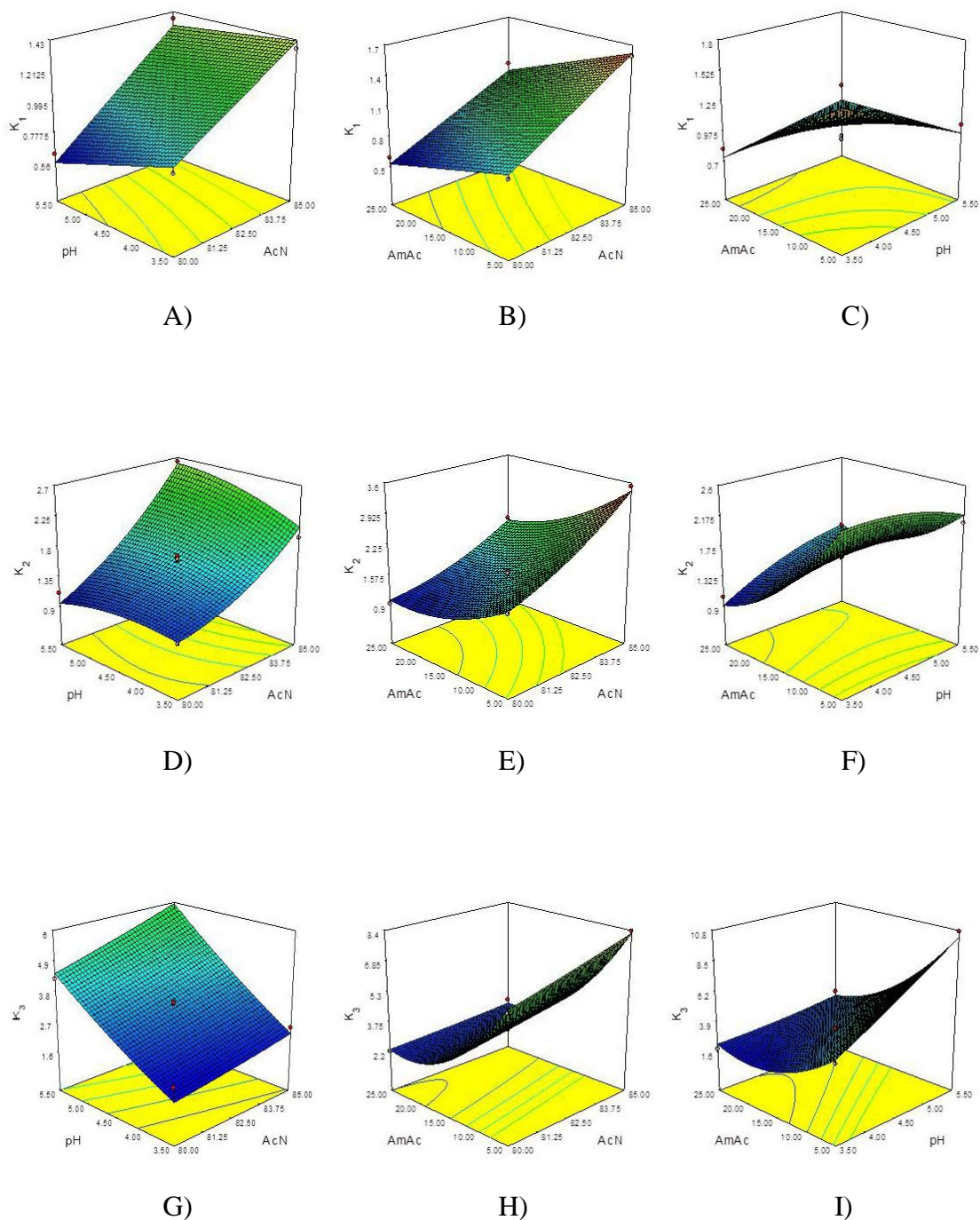
Uzimajući u obzir apsolutne vrednosti koeficijenata generisanih matematičkih modela za geometrijske izomere olopatadina, udeo acetonitrila u mobilnoj fazi očekivano pokazuje najjači uticaj na njihovo zadržavanje u cijanopropil koloni, dok je efekat pH vrednosti vodene faze najslabiji. S druge strane, zadržavanje benzalkonijum-hlorida na stacionarnoj fazi je pod najvećim uticajem koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi, dok najmanji efekat poseduje sadržaj acetonitrila u eluentu. Posmatranjem apsolutnih vrednosti koeficijenata linearnih članova modela za $\alpha_{1,2}$ odgovor, najjači efekat na razdvajanje geometrijskih izomera olopatadina ima pH vrednost vodene faze, a najslabiji udeo acetonitrila.

Na osnovu predznaka koeficijenata linearnih članova, potvrđeno je da se povećanjem udela acetonitrila u mobilnoj fazi produžava zadržavanje svih ispitivanih jedinjenja u koloni i ukupno vreme trajanja analize, što je u skladu sa teorijskim znanjima o HILIC hromatografiji. Rezultati iz preliminarnih studija ukazali su da se povećanjem koncentracije amonijum-acetata postiže umereno veće zadržavanje geometrijskih izomera olopatadina u cijanopropil koloni. Međutim, negativan predznak koeficijenata linearnih članova kvadratnih matematičkih modela pokazuje da se povećanjem koncentracije amonijum-acetata postiže smanjeno zadržavanje olopatadin E izomera i benzalkonijum-hlorida, kao i lošije razdvajanje Z i E izomera olopatadina.

Ovakvo saznanje verovatno je posledica toga što je pufer onemogućio elektrostatičke interakcije cviterjonske forme olopatadin *E* izomera i katjonskog oblika konzervansa sa deprotonovanim rezidualnim silanolnim grupama na površini stacionarne faze cijanopropil kolone. Dalje, povećanje pH vrednosti vodene faze uslovljava veće zadržavanje poslednje eluirane komponente na stacionarnoj fazi, kao i poželjno povećano razdvajanje kritičnog para pikova. Produženo zadržavanje benzalkonijum-hlorida u cijanopropil koloni pri većim pH vrednostima vodene faze moglo bi se objasniti njegovim izraženim baznim karakteristikama.

U cilju vizuelne evaluacije značajnosti uticaja istraživanih faktora, konstruisani su odgovarajući trodimenzioni dijagrami za praćene retencione faktore geometrijskih izomera olopatadina i benzalkonijum-hlorida i prikazani na slici 12. 3-D dijagram predstavlja površinu odgovora čijom se interpretacijom može objasniti ponašanje odgovora u posmatranom delu eksperimentalnog prostora u zavisnosti od dva ispitivana faktora. Na taj način, predstavljene 3-D površine odgovora omogućile su potvrdu rezultata dobijenih tumačenjem matematičkih modela koji su kreirani primenom DoE alata, kao i detaljniju karakterizaciju hromatografskog ponašanja ispitivanih jedinjenja.

Statistički značajne dvofaktorske interakcije ilustrovane su 3-D dijagramima predstavljenim na slici 12E i 12I i dodatno su protumačene. Na slici 12E, prikazana je zavisnost retencionog faktora olopatadin *E* izomera od sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi i koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi. Potvrđen je veoma jak uticaj acetonitrila na k_2 odgovor, kao i da se povećanjem udela acetonitrila produžava zadržavanje olopatadin *E* izomera. Isti zaključci doneti su i na osnovu pozitivnog predznaka b_1 koeficijenta linearnog člana empirijskog modela povezanog sa k_2 . S druge strane, manje koncentracije amonijum-acetata uslovljavaju povećanje vrednosti retencionog faktora ispitivane nečistoće, što je u skladu sa podacima dobijenim tumačenjem odgovarajućeg kvadratnog modela za k_2 odgovor (negativan predznak b_3 regresionog koeficijenta).



Slika 12. Trodimenzionalne površine k_1 , k_2 i k_3 odgovora u funkciji tri ispitivana faktora HILIC sistema (sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi [%], pH vrednost vodene faze i koncentracija amonijum -acetata u vodenoj fazi [mmol L^{-1}])

A, B, C) k_1 – retencioni faktor olopatadin-hidrohlorida
 D, E, F) k_2 – retencioni faktor olopatadin *E* izomera
 G, H, I) k_3 – retencioni faktor benzalkonijum-hlorida

Na 3-D dijagramu prikazanom na slici 12I, data je zavisnost retencionog faktora benzalkonijum-hlorida u funkciji koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi i pH vrednosti vodene faze. Pokazano je da je duže zadržavanje konzervansa na stacionarnoj fazi postignuto povećanjem pH vrednosti vodene faze, što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim posmatranjem polinoma drugog reda za k_3 odgovor (pozitivan predznak b_2 koeficijenta linearnog člana). Takođe, moglo se uvideti da smanjenje koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi dovodi samo do malog povećanja vrednosti retencionog faktora benzalkonijum-hlorida. Na taj način, potvrđeni su podaci dobijeni na osnovu negativnog predznaka b_3 regresionog koeficijenta kvadratne jednačine koja se odnosi na k_3 odgovor.

4.1.1.3. Multikriterijumski pristup robusnoj optimizaciji hromatografskog razdvajanja

Nakon detaljnog opisivanja retencionog ponašanja pojedinačnih jedinjenja u HILIC sistemu sa UV detekcijom, izvedena je optimizacija hromatografskog razdvajanja ispitivane smeše. Ovaj finalni korak naučnog istraživanja započet je određivanjem ciljeva optimizacije. Kao prvi cilj definisano je adekvatno zadržavanje olopatadina na cijanopropil stacionarnoj fazi zbog toga što je u istraživanom eksperimentalnom području pokazao slabo zadržavanje. Postavljeni cilj okarakterisan je vrednošću retencionog faktora olopatadin-hidrohlorida (k_1). Optimalna vrednost trebalo je da bude veća od 1,5. Drugi kriterijum za optimizaciju podrazumevao je zadovoljavajuće razdvajanje Z i E geometrijskih izomera olopatadina i opisan je pomoću faktora selektivnosti između ovog kritičnog para pikova ($\alpha_{1,2}$). Cilj je bio da $\alpha_{1,2}$ vrednost neophodno bude veća od 1,2. Na osnovu polinoma drugog reda, koji je opisao zavisnost $\alpha_{1,2}$ u funkciji svih ispitivanih faktora, može se videti da je odgovor pod snažnim uticajem koncentracije amonijum-acetata i pH vrednosti vodene faze. Kako je u svakoj hromatografskoj analizi veoma bitno da se testira robusnost značajnih odgovora, procenjena je robusnost $\alpha_{1,2}$ pomoću prethodno kreiranog adekvatnog matematičkog modela primenom pogodne hemometrijske tehnike. Iz navedenog razloga, kao konačan cilj optimizacije postavljena je maksimalna robusnost razdvajanja Z i E geometrijskih izomera olopatadina.

Procena robusnosti faktora selektivnosti u okviru faze optimizacije metode izvedena je izračunavanjem kriterijuma robusnosti, koji je definisan kao parcijalni izvod dobijene funkcije odgovora u zavisnosti od svih značajnih faktora, sa ciljem da se ispita uticaj malih i namernih variranja faktora povezanih sa mobilnom fazom [82,83]. Dobijene jednačine za $d\alpha_{1,2}/dA$, $d\alpha_{1,2}/dB$ i $d\alpha_{1,2}/dC$ bile su sledeće:

$$d\alpha_{1,2}/dA = -1,647 + 0,002 \times B + 0,0002 \times C + A \times 0,020 \times A \quad (4)$$

$$d\alpha_{1,2}/dB = 2,178 + 0,002 \times A - 0,003 \times C - 0,459 \times B \quad (5)$$

$$d\alpha_{1,2}/dC = -0,041 + 0,0002 \times C - 0,003 \times B + 0,001 \times C \quad (6)$$

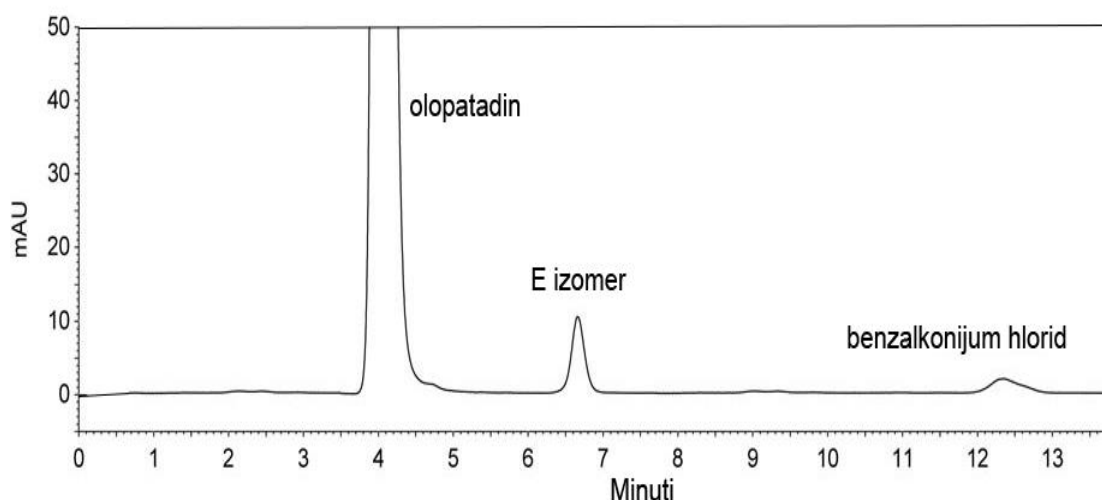
gde je $\alpha_{1,2}$ – faktor selektivnosti između *Z* i *E* geometrijskih izomera olopatadina, dok su *A*, *B* i *C* – ispitivani faktori.

Kreirane matematičke zavisnosti za $d\alpha_{1,2}/dA$, $d\alpha_{1,2}/dB$ i $d\alpha_{1,2}/dC$ omogućile su kompjutersko simuliranje promena eksperimentalnih uslova bez izvođenja dodatnih eksperimenata. Kako je teorijskim skriningom robusnosti u ovoj ranoj fazi razvoja HILIC metode pokazano da su vrednosti faktora selektivnosti između geometrijskih izomera olopatadina ostale u okviru zadovoljavajućih granica, potvrđena je stabilnost optimuma pre izvođenja procesa validacije.

Zatim je primenjen multikriterijumski pristup robusnoj optimizaciji HILIC metode (eng. *multi-objective optimization*) sa ciljem da se istovremeno postignu maksimalno zadržavanje prvog eluiranog pika, zadovoljavajuće razdvajanje *Z* i *E* izomera olopatadina, kao i njihovo robusno razdvajanje, odnosno minimalne vrednosti $d\alpha_{1,2}/dA$, $d\alpha_{1,2}/dB$ i $d\alpha_{1,2}/dC$ ($< 0,05$). Identifikacija optimalnih hromatografskih uslova izvršena je korišćenjem metodologije pretrage čvorova mreže (eng. *grid point search methodology*). S obzirom na to da pronalaženje opšteg optimuma grafičkim putem pomoću metodologije površine odgovora poseduje nedostatke u slučaju analize više od dva eksperimentalna faktora i nije automatizovano, izabran je jedan od postupaka multikriterijumskog pristupa optimizaciji hromatografskog razdvajanja koji je omogućio istovremeno praćenje više odgovora sa različitim i suprotnim ciljevima.

Definisanje rastojanja između čvorova mreže, odnosno gustine mreže unutar intervala vrednosti značajnih faktora predstavlja kritičan korak prilikom upotrebe primenjene enumerativne tehnike [84]. Ukoliko se odabere previše mala gustina mreže mogu se javiti greške prilikom nalaženja optimalnih uslova, dok je odabir prevelike gustine nepraktičan i vremenski zahtevan. Iz navedenog razloga, posvećena je posebna pažnja ovom koraku i definisana je gustina mreže za svaki od ispitivanih faktora na sledeći način: 1% za sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, 0,2 pH jedinice za pH vrednost vodene faze i 2 mmol L⁻¹ za koncentraciju amonijum-acetata u vodenoj fazi. Nakon toga, pomoću MATLAB[®] 7.10.0. softverskog programa konstruisano je 726 (6×11×11) simuliranih hromatograma i izračunate su vrednosti praćenih odgovora u svakoj tački mreže korišćenjem definisanih matematičkih modela pomoću *Box–Behnken* eksperimentalnog dizajna. Poređenjem dobijenih vrednosti odgovora, svi prethodno postavljeni kriterijumi za optimizaciju ($k_1 > 1,5$; $\alpha_{1,2} > 1,2$ i maksimalna robusnost $\alpha_{1,2}$ u funkciji svih istraživanih faktora merena kao parcijalni izvod odgovora) su postignuti i definisan je globalni optimum koji je odgovarao sledećoj kombinaciji značajnih faktora: smeša acetonitril–vodena faza (5 mmol L⁻¹ amonijum-acetat, pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom na 4,5) u odnosu 85:15 V/V. Određeni optimalni hromatografski uslovi razdvajanja eksperimentalno su verifikovani i dobijeni hromatogram predstavljen je na slici 13.

Pod datim optimalnim hromatografskim uslovima, analiza je izvedena pet puta i na osnovu veoma malih RSD vrednosti za olopatadin (1,1%), njegov *E* izomer (0,9%) i benzalkonijum-hlorid (1,2%) pokazana je željena ponovljivost retencionih vremena ispitivanih komponenata smeše. Na taj način, potvrđena je adekvatnost upotrebljene strategije optimizacije. Analizirana jedinjenja bila su razdvojena na odgovarajući način pod HILIC uslovima i na *Betasil Cyano* stacionarnoj fazi u vremenskom intervalu manjem od 13 min.



Slika 13. Reprezentativan hromatogram laboratorijske smeše koja sadrži $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ olopatadin-hidrohlorida ($t_r = 4,03 \text{ min.}$), $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ olopatadin *E* izomera ($t_r = 6,65 \text{ min.}$) i $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ benzalkonijum-hlorida ($t_r = 12,29 \text{ min.}$), dobijen pod sledećim optimalnim hromatografskim uslovima: *Betasil Cyano* kolona (dimenzije $100 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$ veličina čestica); mobilna faza sastavljena od 85% acetonitrila i 15% vodene faze koja sadrži 5 mmol L^{-1} amonijum-acetata i čija je pH vrednost podešena na 4,5 pomoću glacijalne sirćetne kiseline; protok mobilne faze 1 mL min^{-1} ; temperatura kolone 30°C ; UV detekcija 257 nm i zapremina injektovanja $20 \mu\text{L}$ *

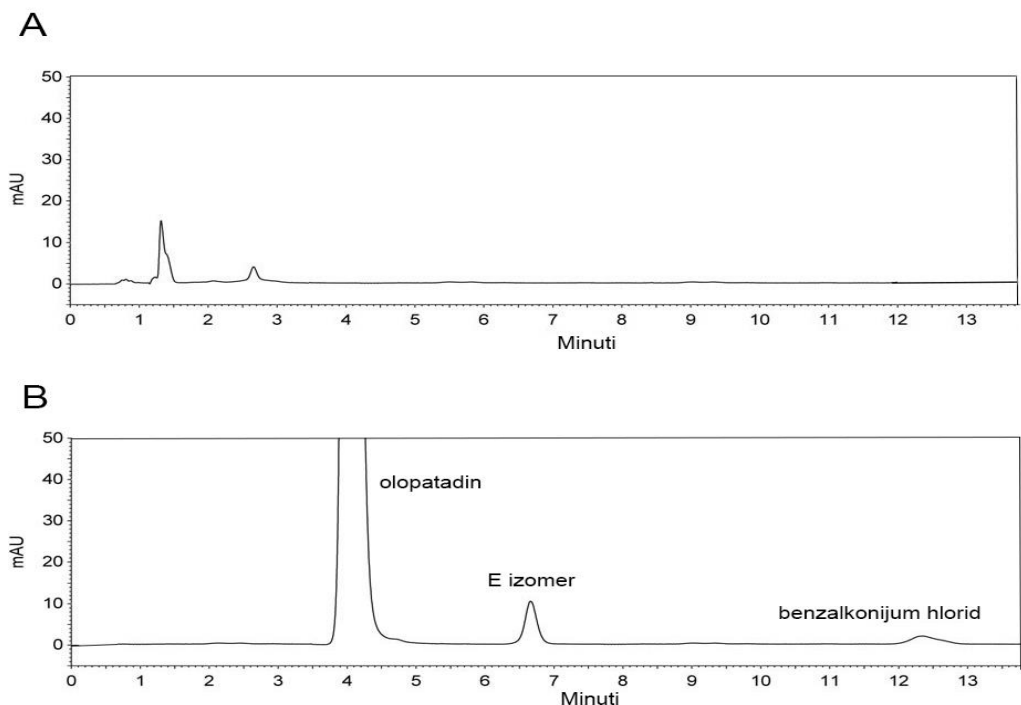
*Maksić J, Jovanović M, Rakić T, Popović I, Ivanović D, Jančić–Stojanović B. *Chromatographic analysis of olopatadine in hydrophilic interaction liquid chromatography. J Chromatogr Sci.* 2015; 53 (5): 680–6.

Konačno, prezentovani sistematičan pristup razvoju HILIC metode sa UV detekcijom, zasnovan na primeni eksperimentalnog dizajna, pruža mogućnost da se sagledaju sve potencijalne promene u hromatografskom ponašanju geometrijskih izomera olopatadina i benzalkonijum-hlorida unutar definisanog eksperimentalnog prostora. Celokupna optimizaciona procedura je automatizovana i brojni simulirani hromatogrami pod različitim hromatografskim uslovima mogu se kreirati bez izvođenja novih eksperimenata. Dodatna prednost implementiranja predloženog hemometrijskog alata tokom postavljanja metode jeste ta da će njeno detaljno istraživanje kroz postupak validacije predstavljati jednostavan zadatak sa malim rizikom od neuspeha.

4.1.2. Validacija HILIC metode sa UV detekcijom za kvantitativnu analizu Z i E izomera olopatadina i benzalkonijum-hlorida u kapima za oči

Kako bi se potvrdila pouzdanost primene optimizirane HILIC metode sa UV detekcijom i dokazao njen potencijal u rutinskoj analizi olopatadina, njegove nečistoće E izomera i benzalkonijum-hlorida u farmaceutskoj formulaciji kapi za oči, u drugoj fazi ovog naučnog istraživanja izvedena je njena kompletna validacija pod optimalnim hromatografskim uslovima.

Prvi testirani parametar validacije bila je selektivnost predložene metode. Poređeni su hromatogrami dobijeni analiziranjem osnovnog rastvora *placebo* kapi za oči i rastvora laboratorijske smeše standarda ispitivanih jedinjenja, koji su pripremljeni na način opisan u poglavlju 3.4.2. S obzirom na to da na hromatogramu *placebo* rastvora nisu uočeni interferirajući pikovi na retencionim vremenima koja odgovaraju ispitivanim komponentama, potvrđena je selektivnost HILIC metode sa UV detekcijom (slika 14). Takođe, pomoćne materije iz kapi za oči ne utiču na razdvajanje analiziranih komponenti.



Slika 14. Reprezentativni hromatogrami za procenu selektivnosti predložene HILIC metode

A) osnovni rastvor *placebo* kapi za oči

B) laboratorijska smeša Z i E izomera olopatadina i benzalkonijum-hlorida

Ispitivanje osjetljivosti metode veoma je značajno u kvantitativnoj analizi jedinjenja koja su u farmaceutskom obliku prisutna u veoma malim koncentracijama i obuhvata definisanje LOD i LOQ. Ove vrednosti eksperimentalno su određene za nečistoću olopatadin *E* izomer i konzervans benzalkonijum-hlorid izračunavanjem S/N odnosa, imajući u vidu da je S/N odnos 3:1 prihvatljiv za određivanje LOD, dok je S/N odnos 10:1 odgovarajući za definisanje LOQ [85,86]. Rastvori pripremljeni na način opisan u poglavlju 3.4.3, injektovani su sve dok površina pika analiziranih jedinjenja nije bila tri puta veća (za LOD), odnosno deset puta veća (za LOQ) od standardne devijacije šuma za šest ponovljenih injektovanja mobilne faze. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 6. Zatim je na definisanim koncentracijama za LOD i LOQ vršeno po šest injektovanja i izračunate su RSD vrednosti. Dobijene RSD vrednosti za olopatadin *E* izomer (8,1% za LOD; 3,2% za LOQ) i benzalkonijum-hlorid (10,7% za LOD; 7,1% za LOQ) ispunjavaju zahtevane kriterijume i preporuke ICH Q2 (RI) smernice ($\leq 20\%$ za LOD; $\leq 10\%$ za LOQ) [64].

Za procenu linearnost HILIC metode sa UV detekcijom analizirana je zavisnost površine pikova ispitivanih jedinjenja u funkciji njihovih poznatih koncentracija. Priprema rastvora standarda rastućih koncentracija olopatadin-hidrohlora, olopatadin *E* izomera i benzalkonijum-hlorida opisana je u poglavlju 3.4.4. Kalibracione krive konstruisane su metodom najmanjih kvadrata, a svaka od osam tačaka dobijena je kao rezultat tri injektovanja. Značajni regresioni parametri za potvrdu linearnosti metode u definisanim opsezima koncentracija prikazani su u tabeli 6. Izračunate vrednosti koeficijenta korelacije (r) odgovaraju zahtevanim kriterijumima za prihvatanje rezultata ($> 0,99$ za olopatadin-hidrohlora, odnosno $> 0,98$ za olopatadin *E* izomer i benzalkonijum-hlorid). Takođe, na osnovu vrednosti statističkog parametra t_b koje su manje od tabelarne vrednosti (t_{tab}), pokazano je da je ispunjen uslov linearnosti predložene metode [85,86].

Tabela 6. Značajni podaci za validaciju predložene HILIC metode sa UV detekcijom*

Parametar	Analit		
	Olopatadin-hidrochlorid	Olopatadin E izomer	Benzalkonujum-hlorid
LOQ [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	/	0,1	6
LOD [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	/	0,375	20
Linearnost			
Opseg koncentracija [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	37,5 – 1000	0,375 – 10	20 – 150
$y = ax + b$	22,9112x + 233,8131	25,7994x – 1,6954	1,1035x + 0,0746
r	0,9992	0,9994	0,9990
S_a	0,2488	0,2577	0,0219
S_b	118,4258	0,8645	0,0084
p_b	0,8451	0,7569	0,6002
t_b	0,5101	1,4830	1,6210
Tačnost			
Koncentracija [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	400 (80%)	4 (80%)	80 (80%)
Recovery [%]	101,5	83,1	100,3
RSD [%]	0,5	1,8	0,9
Koncentracija [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	500 (100%)	5 (100%)	100 (100%)
Recovery [%]	101,2	83,9	98,9
RSD [%]	0,7	1,6	1,1
Koncentracija [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	600 (120%)	6 (120%)	120 (120%)
Recovery [%]	101,3	90,6	101,3
RSD [%]	0,3	1,4	1,2
Preciznost			
Koncentracija [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	500 (100%)	5 (100%)	100 (100%)
RSD [%]	1,9	5,8	2,0

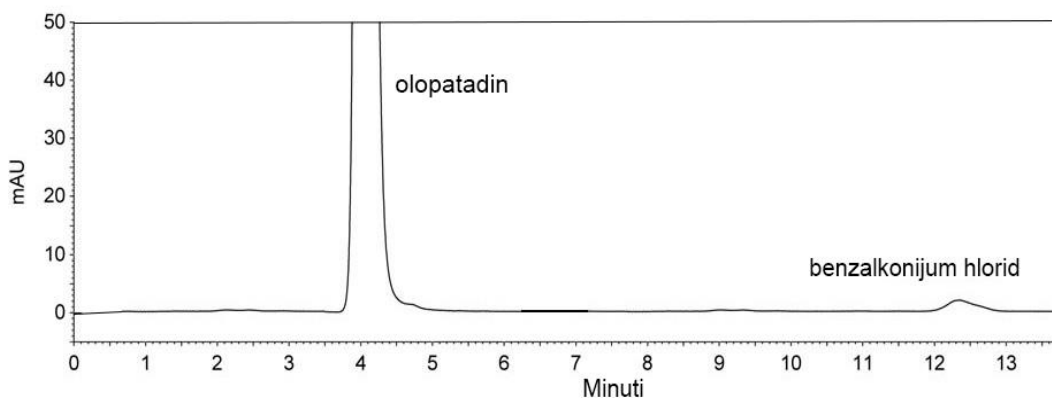
a – nagib kalibracione krive; b – odsečak na y osi; r – koeficijent korelacije; S_a – standardna devijacija nagiba prave; S_b – standardna devijacija odsečka na ordinati; p_b – p -vrednost odsečka; t_b – t -vrednost odsečka; $t_{tab} = 2,306$ ($n = 8$; $\alpha = 0,05$)

*Maksić J, Jovanović M, Rakić T, Popović I, Ivanović D, Jančić–Stojanović B. Chromatographic analysis of olopatadine in hydrophilic interaction liquid chromatography. *J Chromatogr Sci.* 2015; 53 (5): 680–6.

Tačnost kreirane metode ispitana je analizom rastvora laboratorijskih smeša pripremljenih na način opisan u poglavlju 3.4.5. Dobijeni rezultati dati su u tabeli 6. Izračunate *Recovery* vrednosti su u dozvoljenim granicama (98–102% za olopatadin-hidrohlorid i benzalkonijum-hlorid; 80–120% za olopatadin *E* izomer), kao i RSD vrednosti ($\leq 2\%$) [85,86]. Na ovaj način, potvrđeno je da HILIC metoda sa UV detekcijom pokazuje zadovoljavajuću tačnost.

Preciznost, odnosno ponovljivost analitičke metode procenjena je analiziranjem šest replikacija uzoraka komercijalno dostupnih *Pana*[®] kapi za oči koji su "opterećeni" nečistoćom olopatadin *E* izomer. Priprema rastvora uzoraka opisana je u poglavlju 3.4.6. Rezultati su prikazani u tabeli 6. Statističkom analizom eksperimentalno dobijenih vrednosti i izračunavanjem RSD vrednosti dokazana je preciznost predložene HILIC metode. Naime, RSD vrednosti za olopatadin-hidrohlorid i benzalkonijum-hlorid ispunjavaju zahtevane kriterijume preciznosti ($RSD \leq 2\%$; $n \geq 6$). Takođe, RSD vrednosti za olopatadin *E* izomer su manje od 10%, što je u skladu sa zahtevom za nečistoće koje su u farmaceutskom obliku prisutne u koncentraciji manjoj od 1% [86].

Nakon evaluacije kojom je potvrđena adekvatnost primene HILIC metode sa UV detekcijom, određen je sadržaj olopatadina, njegove nečistoće *E* izomera i benzalkonijum-hlorida u *Pana*[®] kapima za oči tipa rastvora. Rastvori uzoraka pripremljeni su na način opisan u poglavlju 3.4.7, a reprezentativan hromatogram prikazan je na slici 15.



Slika 15. Hromatogram komercijalno dostupnih *Pana*[®] kapi za oči

Kvantitativna analiza urađena je na tri različite komercijalno dostupne serije *Pana*[®] kapi za oči, a dobijeni rezultati izraženi su kao prosečan sadržaj olopatadina (98,9%; n = 6) i benzalkonijum-hlorida (96,8%; n = 6), dok je sadržaj nečistoće olopatadin *E* izomera bio manji od LOD vrednosti. Na taj način, ispunjen je zahtev monografije USP38/NF33 farmakopeje za sadržaj olopatadin-hidrohlorida u kapima za oči (90,0–110,0%, računato na olopatadin) [33]. Sadržaj benzalkonijum-hlorida odgovara kriterijumu prihvatljivosti navedenom u specifikaciji proizvođača ispitivanih kapi za oči *Hemofarm* (90,0–110,0%).

Naučno relevantni rezultati za analitiku olopatadina obezbeđeni su zahvaljujuću tome što je po prvi put postavljena HILIC metoda sa UV detekcijom za pouzdano određivanje njegovih geometrijskih izomera i konzervansa u formulaciji kapi za oči. Naučnoistraživački doprinos ovog dela doktorske disertacije ogleda se i u činjenici da je HILIC sistem do sada nedovoljno ispitivan primenom metodologije eksperimentalnog dizajna, kao i da je u literaturi nedovoljno opisana analiza amfoternih jedinjenja sa cviterjonskom strukturom i geometrijskih izomera primenom HILIC tehnike.

4.2. Ispitivanje olopatadina pod stres uslovima primenom HILIC metode sa UV detekcijom

Predmet naučnog istraživanja ovog dela doktorske disertacije bio je da se ispita mogućnost primene novorazvijene HILIC metode sa UV detekcijom za praćenje stepena degradacije olopatadina pod uticajem različitih *stres* agenasa, kao i za određivanje kinetike njegove degradacije. Ovim unapređenim postupkom za istraživanje stabilnosti olopatadina, omogućeno je adekvatno praćenje degradacionih proizvoda različite polarosti i dobijanje velikog broja korisnih podataka o njegovoj osnovnoj hemijskoj stabilnosti u kratkom vremenskom intervalu. Dodatno, definisanjem neophodnih parametara kinetike reakcije degradacije olakšano je razumevanje i predviđanje mehanizma i puteva razgradnje olopatadina.

Studije forsirane degradacije

Studije forsirane degradacije ili *stres studije* sprovode se u cilju ispitivanja primarne hemijske stabilnosti farmaceutskog jedinjenja i farmaceutskog oblika [87]. U savremenoj farmaceutskoj analizi, ove studije poseduju veliki značaj jer se na osnovu njihovih rezultata mogu steći bitni podaci o stabilnosti leka. Izvode se pod uslovima koji su drastičniji od uslova propisanih za *ubrzane studije stabilnosti* (temperatura 40°C, relativna vlažnost 75%). Na osnovu *stres studija* u kratkom vremenskom periodu dobijaju se važne informacije o mogućim putevima razgradnje i mehanizmu degradacije farmaceutskog jedinjenja, kao i o njegovom predloženom degradacionom profilu. Takođe, omogućavaju identifikaciju i karakterizaciju degradacionih proizvoda koji se spontano mogu javiti tokom sinteze, proizvodnje, upotrebe i čuvanja leka [87]. Nastali degradacioni proizvod može biti okarakterisan kao srodna supstanca farmaceutskom jedinjenju ili ekscipijensima, odnosno može nastati kao rezultat interakcije između farmaceutskog jedinjenja i ekscipijenasa.

Osnovni cilj *studija forsirane degradacije* je dobijanje uzoraka koji sadrže degradacione proizvode u koncentraciji od 5% do 20% [87,88]. Razgradnja ispod 5% ne uzima se u razmatranje, jer se smatra da veoma male količine degradacionih proizvoda nastalih pod *stres* uslovima ne bi nastale pod preporučenim uslovima čuvanja farmaceutskog jedinjenja ili gotovog proizvoda. S druge strane, razgradnja veća od 20% ne bi uspela da omogući pouzdano definisanja degradacionog profila. *Studije forsirane degradacije* na farmaceutskom jedinjenju predstavljaju integralni deo strategije razvoja gotovog proizvoda i sprovode se u preformulacionoj fazi u cilju izbora najpogodnije soli, optimalnog pakovanja, uslova čuvanja i roka trajanja. Takođe, korisne su za potvrdu specifičnosti tokom razvoja, optimizacije i validacije SIM metoda [87,89,90].

Uprkos značaju *stres studija* u svim fazama farmaceutskog razvoja, važeće smernice koje se odnose na njih su veoma uopštene. U ICH *Q1A (R2)* smernici navodi se da se *studije forsirane degradacije* sprovode na jednoj seriji lekovitog jedinjenja ili gotovog proizvoda, u čvrstom obliku, odnosno u obliku rastvora ili suspenzije.

Preporuka je da se izvode pod sledećim uslovima: povišena temperatura (za oko 10°C viša od temperature kod *ubrzanih studija stabilnosti*, odnosno 50°C ili 60°C), povećana relativna vlažnost (veća od 75%), hidroliza u širokom opsegu pH vrednosti, fotoliza i oksidacija [91]. *Studije fotostabilnosti* imaju esencijalnu ulogu u *stres* testovima i detaljno su opisane u ICH *Q1B* smernici. Fotoliza se sprovodi izlaganjem leka kombinaciji bele svetlosti, UV i fluorescentnih lampi ili korišćenjem halogenih i ksenon lampi [92]. Međutim, pomenute smernice ne obezbeđuju dovoljno informacija o strategiji i principima sprovođenja *stres* testova, odnosno ne specificiraju interval pH vrednosti, kao ni temperaturni opseg i specifična oksidaciona sredstva.

4.2.1. Rezultati studija forsirane degradacije na olopatadinu

U prvoj fazi ovog načnog istraživanja, prema važećim regulatornim zahtevima, kao i prema trendovima opisanim u naučnoj literaturi, sprovedene su *studije forsirane degradacije* na farmaceutskom jedinjenju olopatadin-hidrochlorid. Degradacija nastala nakon tretiranja različitim *stres* agensima, kao što su kiselina, baza, oksidaciono sredstvo i povišena temperatura, praćena je u definisanim vremenskim intervalima upotrebom prethodno postavljene HILIC metode sa UV detekcijom.

Olopatadin je najpre izložen dejstvu baze, odnosno 0,5 M NaOH i 1 M NaOH. Tokom 72 h, tretiranje olopatadina sa 0,5 M NaOH nije dovelo do značajne degradacije. Takođe, dodatak jače baze 1 M NaOH nije uticao na povećanje procesa razgradnje. Dobijeni rezultati pokazali su da se olopatadin u 0-tom minutu degradirao 2,1%, nakon 24 h 2,7%, a posle 48 h 3,5% u odnosu početnu koncentraciju. Smatra se da razgradnja manja od 5% nije reprezentativna i da ovi degradacioni proizvodi ne bi nastali u *redovnim studijama stabilnosti*, pri preporučenim uslovima čuvanja [88]. Na taj način, moglo se zaključiti da je ispitivani analit stabilan u baznoj sredini.

U sledećem koraku, ispitan je uticaj povišenja temperature na stabilnost olopatadina. Hromatografskom analizom zagrejanog vodenog rastvora na 60°C zapaženo je da ne dolazi do razgradnje pod dejstvom povišene temperature, odnosno da je ispitivano jedinjenje termostabilno. Naime, u odabranim vremenskim intervalima (0 h; 15 min; 1 h; 2 h i 3 h) nije se promenila, odnosno smanjila koncentracija analita.

Hidroliza u kiseloj sredini sa 0,5 M HCl pokazala je potpunu razgradnju u 0-tom minutu, tako da je analiza ponovljena sa manjim koncentracijama ove kiseline. Tretiranje sa slabijom 0,1 M HCl izazvalo je značajnu degradaciju olopatadina, te se mogla pretpostaviti njegova izrazita nestabilnost u kiseloj sredini. Koncentracija se trenutno smanjila za 34,0%, nakon 15 min. za 39,0%, 1 h za 46,6%, a posle 2 h za 48,4%. Dalje, nakon 24 h procenat degradacije bio je 61,3% u odnosu na početnu koncentraciju. Izlaganje slabijoj kiselini 0,01 M HCl je dovelo do reprezentativne i manje intenzivne degradacije ispitivanog analita. U definisanim vremenskim periodima (0 h; 15 min; 1 h i 2 h), smanjenje koncentracije olopatadina bilo je manje od 10% u odnosu na inicijalnu koncentraciju. Takođe, posle 24 h i 48 h procenat degradacije nije se značajno povećavao.

U poslednjem delu ovog naučnog istraživanja, dodatkom oksidacionog sredstva H₂O₂ u malim koncentracijama (3%, 15%), olopatadin je ostao relativno stabilan. Naime, nakon 48 h procenat degradacije farmaceutskog jedinjenja bio je manji od 1,5% (3% H₂O₂), odnosno 2,5% (15% H₂O₂). Međutim, veća koncentracija vodonik-peroksida od 30% uslovlila je intenzivniju degradaciju. Ispitivano jedinjenje se u 0-tom minutu razgradilo 0,8%, nakon 1 h nije došlo do značajnije degradacije, ali je nakon 48 h procenat razgradnje bio 7,5%. Reprezentativna degradacija olopatadina pod dejstvom 30% vodonik-peroksida ukazala je na njegovu relativnu nestabilnost u prisustvu jakih oksidacionih sredstava.

Pregled rezultata *studija forsirane degradacije* dat je u tabeli 7.

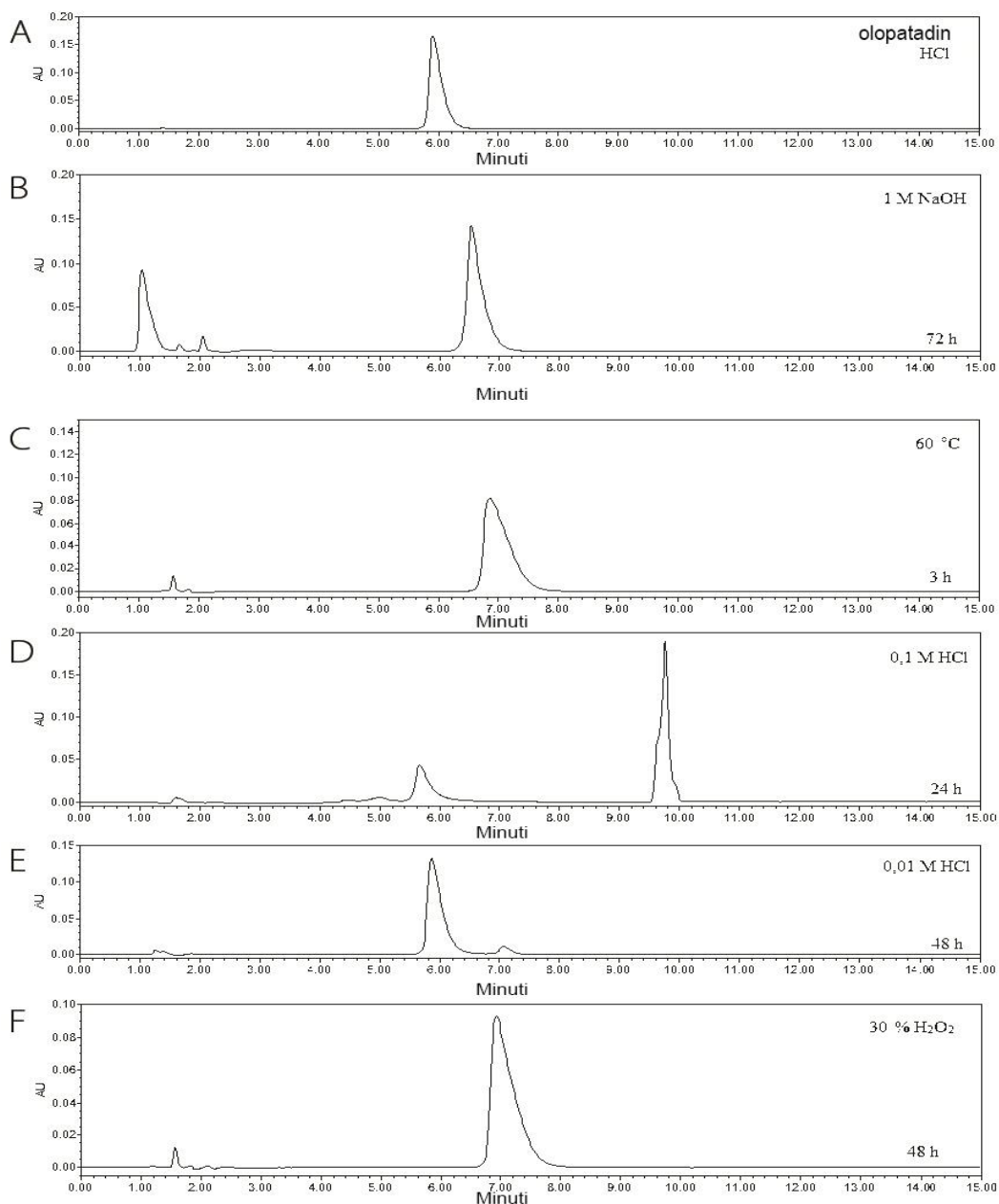
Tabela 7. Pregled rezultata *studija forsirane degradacije**

Degradacija	Stres agens			
	1 M NaOH	0,1 M HCl	0,01 M HCl	30% H₂O₂
Vreme degradacije [h]	Stepen degradacije [%]			
0	2,1	34,0	4,9	0,8
0,25	2,3	39,0	6,3	1,4
1	2,5	46,6	7,2	3,1
2	2,6	48,4	9,5	5,1
3	/	/	/	5,4
24	2,7	61,3	10,1	5,5
48	3,5	/	10,2	7,5

*Maksić J, Tumpa A, Popović I, Jančić–Stojanović, B. Ispitivanje olopatadin hidrohlorida pod stres uslovima metodom tečne hromatografije hidrofilnih interakcija. *Hem Ind.* 2016; 70 (3): 339–46.

Prikazani rezultati *stres studija* pokazali su da je olopatadin stabilan u baznoj sredini, kao i pod dejstvom povišene temperature (60°C). S druge strane, hidroliza u kiseloj sredini i oksidacija u prisustvu velike koncentracije vodonik-peroksida ukazali su na relativnu nestabilnost farmaceutskog jedinjenja u prisustvu pomenutih *stres* agenasa.

Odabrani hromatogrami olopatadina, dobijeni nakon tretiranja različitim *stres* faktorima, prikazani su na slici 16.



Slika 16. Reprezentativni hromatogrami olopatadina nakon izlaganja različitim *stres* agensima*

- A) Hromatogram standarda olopatadin-hidrohlorida ($c = 100 \mu\text{g mL}^{-1}$)
- B) Hromatogram uzorka nakon tretiranja olopatadina sa 1 M NaOH
- C) Hromatogram uzorka nakon zagrevanja vodenog rastvora olopatadina (60°C)
- D) Hromatogram uzorka nakon tretiranja olopatadina sa 0,1 M HCl
- E) Hromatogram uzorka nakon tretiranja olopatadina sa 0,01 M HCl
- F) Hromatogram uzorka nakon tretiranja olopatadina sa 30% H_2O_2

*Maksić J, Tumpa A, Popović I, Jančić–Stojanović, B. Ispitivanje olopatadin hidrohlorida pod stres uslovima metodom tečne hromatografije hidrofилnih interakcija. *Hem Ind.* 2016; 70 (3): 339–46.

Na osnovu priloženih hromatograma, moglo se zaključiti da je HILIC metoda sa UV detekcijom uspešno primenjena za praćenje stabilnosti olopatadina pod uticajem brojnih *stres* agenasa. Dodatno, pokazano je da je razvijena HILIC metoda praktična i podobna za dve namene, odnosno da se istovremeno može koristiti za kvalitativnu i kvantitativnu procenu olopatadina, njegove nečistoće *E* izomera i konzervansa u farmaceutskom obliku kapi za oči, kao i za analizu stabilnosti olopatadina pod različitim *stres* uslovima. Takođe, zaključeno je da se pod uticajem 0,1 M HCl (slika 16D) dobija degradacioni proizvod koji ne nastaje pod ostalim *stres* uslovima i koji je adekvatno razdvojen od olopatadina sa značajnim razlikama u retencionim vremenima (retenciono vreme proizvoda \approx 10 min.). Eluiranje degradacionog proizvoda nakon olopatadina ukazalo je na njegovu veću polarnost, zbog toga što u HILIC sistemu povećanje polarnosti jedinjenja dovodi do njegovog dužeg zadržavanja na stacionarnoj fazi. S druge strane, u RP-HPLC sistemu jedinjenje veće polarnosti kraće se zadržava u koloni i eluira se ranije, što u zavisnosti od njegove prirode može izazvati neretenciono ponašanje i značajno otežavanje identifikovanja novog pika. Glavna prednost predstavljene HILIC metode ogleda se u činjenici da zbog različitih mehanizama retencije u odnosu na RP-HPLC hromatografiju, koja se do sada najčešće primenjivala za ispitivanje stabilnosti olopatadina, omogućava praćenje nastajanja polarnijih struktura i nedvosmisleno ukazuje na postojanje novog entiteta u hromatografskom sistemu, što je od posebnog značaja u izvođenju *stres studija*.

4.2.2. Određivanje kinetike reakcije degradacije olopatadina

U sledećoj fazi ovog naučnog istraživanja, predstavljeno je definisanje kinetike reakcije degradacije olopatadina i donet je konačan zaključak o njegovom ponašanju i degradacionom profilu. Takođe, tumačenjem predviđenih parametara kinetike stečen je bolji uvid u mehanizam razgradnje olopatadina i proširena su naučna saznanja o njegovoj stabilnosti.

Tok reakcije degradacije može zavisiti od vrste rastvarača, koncentracije reaktanata, temperature i pH vrednosti. Red reakcije degradacije opisuje zavisnost brzine reakcije od koncentracije reaktanata. Lekovi se uglavnom razlažu po principu reakcija nultog, prvog ili pseudo-prvog reda. Međutim, mogu biti zastupljeni i složeniji mehanizmi razgradnje, odnosno reakcije višeg reda [93]. Brzina reakcije degradacije određuje se na osnovu brzine smanjenja koncentracije reaktanata ili brzine porasta koncentracije proizvoda reakcije. Za opisivanje reakcije u naučnoj literaturi najčešće se koristi zakon brzine reakcije koji može imati diferencijalni i integralni oblik [94]. Integralni oblik brzine reakcije degradacije može se definisati pomoću sledećih linearnih jednačina [94]:

$$[A] = -k t + [A]_0 \quad (7)$$

za reakciju nultog reda, zatim

$$\ln[A] = -k t + \ln[A]_0 \quad (8)$$

za reakciju prvog reda, kao i

$$1/[A] = k t + 1/[A]_0 \quad (9)$$

za reakciju drugog reda. U navedenim jednačinama $[A]_0$ predstavlja početnu koncentraciju analiziranog jedinjenja, $[A]$ koncentraciju analita nakon vremena t , a k konstantu brzine reakcije degradacije (koeficijent brzine). Predstavljanje zakona brzine reakcije na ovaj način omogućava određivanje reda reakcije degradacije i k vrednosti. Red reakcije može biti definisan poređenjem eksperimentalno dobijenih vrednosti sa teorijskim vrednostima dobijenim iz jednačina 7–9. Za poređenje rezultata neophodno je najpre konstruisati odgovarajuće grafike. Na apscisi sva tri grafika prikazuje se vreme trajanja reakcije, a na ordinati koncentracija reaktanta (reakcija nultog reda), prirodni logaritam koncentracije reaktanta (reakcija prvog reda) i recipročna vrednost koncentracije reaktanta (reakcija drugog reda). Zatim se izračunava koeficijent korelacije (r) u cilju ispitivanja i potvrđivanja linearnosti dobijenih kriva. Konačno, red reakcije degradacije određuje se na osnovu linearnosti dobijene krive, odnosno kriva koja pokazuje linearnost u ispitivanom području odgovara redu reakcije. Nakon utvrđivanja reda reakcije, kao značajan podatak izračunava se k vrednost, koja je jednaka brzini date reakcije pri jediničnim koncentracijama reagujućih vrsta i izražava se kao apsolutna vrednost nagiba dobijene prave.

Kinetika degradacije olopatadina određena je u baznoj i kiseljoj sredini, kao i nakon izlaganja oksidacionom sredstvu primenom prethodno opisanog integralnog oblika zakona brzine reakcije. Definisani vremenski intervali i eksperimentalno dobijeni rezultati prikazani su u tabelama od 8 do 11.

Tabela 8. Kinetika degradacije olopatadina nakon izlaganja 1 M NaOH

Vreme [h]	c [mmol L ⁻¹]	$\ln(c)$ [mmol L ⁻¹]	$1/c$ [mmol L ⁻¹]
0	0,289141	-1,24084	3,458520
0,25	0,281805	-1,26654	3,548553
1	0,289836	-1,23844	3,450227
3	0,286052	-1,25158	3,495868
24	0,281232	-1,26857	3,555783
48	0,278904	-1,27689	3,585463
<i>Nagib</i>	-0,00018	-0,00062	0,002182
<i>Odsečak</i>	0,28673	-1,24928	3,48801
<i>Koeficijent korelacije (r)</i>	0,7633	0,7657	0,7680

Tabela 9. Kinetika degradacije olopatadina nakon izlaganja 0,1 M HCl

Vreme [h]	c [mmol L ⁻¹]	$\ln(c)$ [mmol L ⁻¹]	$1/c$ [mmol L ⁻¹]
0	0,172523	-1,75722	5,796329
0,25	0,154454	-1,86786	6,47442
1	0,139529	-1,96948	7,166969
2	0,135062	-2,00202	7,404007
24	0,101241	-2,29025	9,877421
<i>Nagib</i>	-0,0022	-0,01739	0,139943
<i>Odsečak</i>	1,15256	-1,88258	6,58114
<i>Koeficijent korelacije (r)</i>	0,8665	0,8228	0,9391

Tabela 10. Kinetika degradacije olopatadina nakon izlaganja 0,01 M HCl

<i>Vreme [h]</i>	<i>c [mmol L⁻¹]</i>	<i>ln(c) [mmol L⁻¹]</i>	<i>1/c [mmol L⁻¹]</i>
<i>0</i>	0,252369	-1,37054	3,977488
<i>0,25</i>	0,250506	-1,38427	3,991920
<i>1</i>	0,248151	-1,39372	4,029804
<i>2</i>	0,242071	-1,41852	4,131019
<i>24</i>	0,240298	-1,42587	4,161499
<i>48</i>	0,240097	-1,42671	4,164983
<i>Nagib</i>	-0,00021	-0,00087	0,00353
<i>Odsečak</i>	0,24852	-1,39239	4,02514
<i>Koeficijent korelacije (r)</i>	0,7173	0,7200	0,7228

Tabela 11. Kinetika degradacije olopatadina nakon izlaganja 30% H₂O₂

<i>Vreme [h]</i>	<i>c [mmol L⁻¹]</i>	<i>ln(c) [mmol L⁻¹]</i>	<i>1/c [mmol L⁻¹]</i>
<i>0</i>	0,293641	-1,2254	3,405519
<i>0,25</i>	0,28956	-1,23939	3,453516
<i>1</i>	0,284596	-1,25668	3,513753
<i>2</i>	0,27875	-1,27744	3,587443
<i>3</i>	0,277757	-1,28101	3,600269
<i>24</i>	0,277426	-1,2822	3,604565
<i>48</i>	0,271469	-1,30391	3,683662
<i>Nagib</i>	-0,00031	-0,00110	0,00392
<i>Odsečak</i>	0,28532	-1,25431	3,50606
<i>Koeficijent korelacije (r)</i>	0,7287	0,7352	0,7416

Na osnovu najvećih *r* vrednosti, predstavljenih u tabelama od 8 do 11, zaključeno da su bazna, kisela i oksidativna degradacija olopatadina reakcije drugog reda.

Iako promena koncentracije s vremenom pruža detaljan opis brzine reakcije, poželjno je bilo definisati i još jednu meru brzine reakcije, odnosno poluvreme reakcije degradacije ($t_{1/2}$). Poluvreme reakcije podrazumeva vreme za koje se početna koncentracija reagujućeg jedinjenja smanji na polovinu i što je reakcija brža, njeno vrednost je manja [93].

U slučaju reakcije prvog reda, $t_{1/2}$ ne zavisi od koncentracije, dok je za reakciju drugog reda obrnuto proporcionalan početnoj koncentraciji reaktanta. Predviđene k i $t_{1/2}$ vrednosti, izračunate na osnovu prikazane jednačine, predstavljene su u tabeli 12.

Tabela 12. Konstante brzine i poluvremena reakcije degradacije olopatadina*

<i>Stres agens</i>	<i>Konstanta</i>	
	<i>Brzina degradacije [mmol L⁻¹h⁻¹]</i>	<i>Poluvreme degradacije [h] $t_{1/2} = 1/k[A_0]^\diamond$</i>
<i>1 M NaOH</i>	0,0022	1572
<i>0,1 M HCl</i>	0,1399	41,4
<i>0,01 M HCl</i>	0,0035	1132,1
<i>30% H₂O₂</i>	0,0039	873,2

$^\diamond[A_0]$ – početna koncentracija

*Maksić J, Tumpa A, Popović I, Jančić–Stojanović, B. Ispitivanje olopatadin hidrohlorida pod stres uslovima metodom tečne hromatografije hidrofилnih interakcija. *Hem Ind.* 2016; 70 (3): 339–46.

Na osnovu dobijenih vrednosti poluvremena reakcije, zaključeno je da je degradacija u kiseloj sredini sa 0,1 M HCl najbrža reakcija ($t_{1/2} = 41,4$ h), dok je degradacija u baznoj sredini najsporija reakcija ($t_{1/2} = 1572$ h). Na ovaj način, potvrđena je velika stabilnost olopatadina u baznoj sredini. S druge strane, pokazano je da je olopatadin najosetljiviji na prisustvo kiseline 0,1 M HCl. Zapaženo je i da je kiselna degradacija sa jačom kiselinom 0,1 M HCl znatno brža reakcija od kisele degradacije sa slabijom kiselinom 0,01 M HCl. Takođe, hidroliza u kiseloj sredini sa 0,1 M HCl značajno je brža reakcija i od reakcije oksidacije u prisustvu 30% H₂O₂, na osnovu čega je donet zaključak da je analit stabilniji na oksidaciju nego na prisustvo kiseline.

Naučnoistraživački doprinos ovog dela doktorske disertacije zasniva se na činjenici da stabilnost olopatadina još uvek nije dovoljno proučena, kao i da primena HILIC metode sa UV detekcijom za praćenje i karakterizaciju njegovih degradacionih proizvoda pod brojnim *stres* uslovima nije opisana u dosadašnjoj literaturi. Takođe, sagledavanjem sveukupne stabilnosti ovog novijeg lokalnog antihistaminika dobijeni su naučno značajni i pouzdani podaci kojima će se unaprediti njegova analitika.

4.3. Postavljanje HILIC metode sa MS/MS detekcijom za bioanalitiku olopatadina u humanim suzama

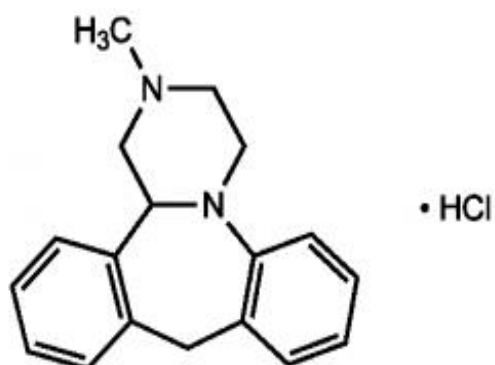
Predmet naučnog istraživanja trećeg dela doktorske disertacije bio je da se po prvi put ispita mogućnost razvoja HILIC metode u kombinaciji sa tandem masenom detekcijom za veoma osetljivo i precizno određivanje olopatadina u uzorcima humanih suza. U cilju postizanja najvećeg intenziteta signala analita i internog standarda, definisane su optimalne vrednosti ključnih parametara jonskog izvora sa elektrosprej jonizacijom i kolizione ćelije trostrukog kvadripola. Korišćenjem savremenih hemometrijskih alata omogućena je sveobuhvatna karakterizacija olopatadina u kompleksnom HILIC-UHPLC sistemu, kao i postizanje najpogodnijih hromatografskih uslova za njegovu kvantitativnu analizu u biološkom materijalu. Za pronalaženje globalnog optimuma primenjena je unapređena tehnika multikriterijumske optimizacije. Kako bi se postigla maksimalna efikasnost bioanalitičke metode, odabrana je adekvatna procedura pripreme uzoraka suza koja je omogućila zadovoljavajuću ekstrakciju olopatadina i uklanjanje svih potencijalno interferirajućih komponenti iz matriksa. Konačno, dobijanje pouzdanih rezultata predložene HILIC-ESI/MS/MS spregnute metode potvrđeno je postupkom njene kompletne validacije u skladu sa zahtevima važeće FDA smernice.

4.3.1. Optimizacija parametara masene detekcije

U prvom koraku ovog naučnog istraživanja, izvedeno je postavljanje uslova metode tandem masene spektrometrije sa ciljem da se postigne maksimalan intenzitet signala olopatadina i internog standarda. Strategija koja je podrazumevala nezavisnu optimizaciju MS/MS parametara i HILIC-UHPLC uslova smatrala se adekvatnom za postizanje zadovoljavajuće osetljivosti metode. Postavljanje MS/MS metode zasnivalo se na odabiru pogodne tehnike i načina jonizacije, određivanju prekursor-proizvod jon tranzicija analita i internog standarda koje će biti praćene u kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi, kao i na optimizaciji parametara jonskog izvora i kolizione ćelije sa bitnim efektom na efikasnost jonizacije i odgovor detektora.

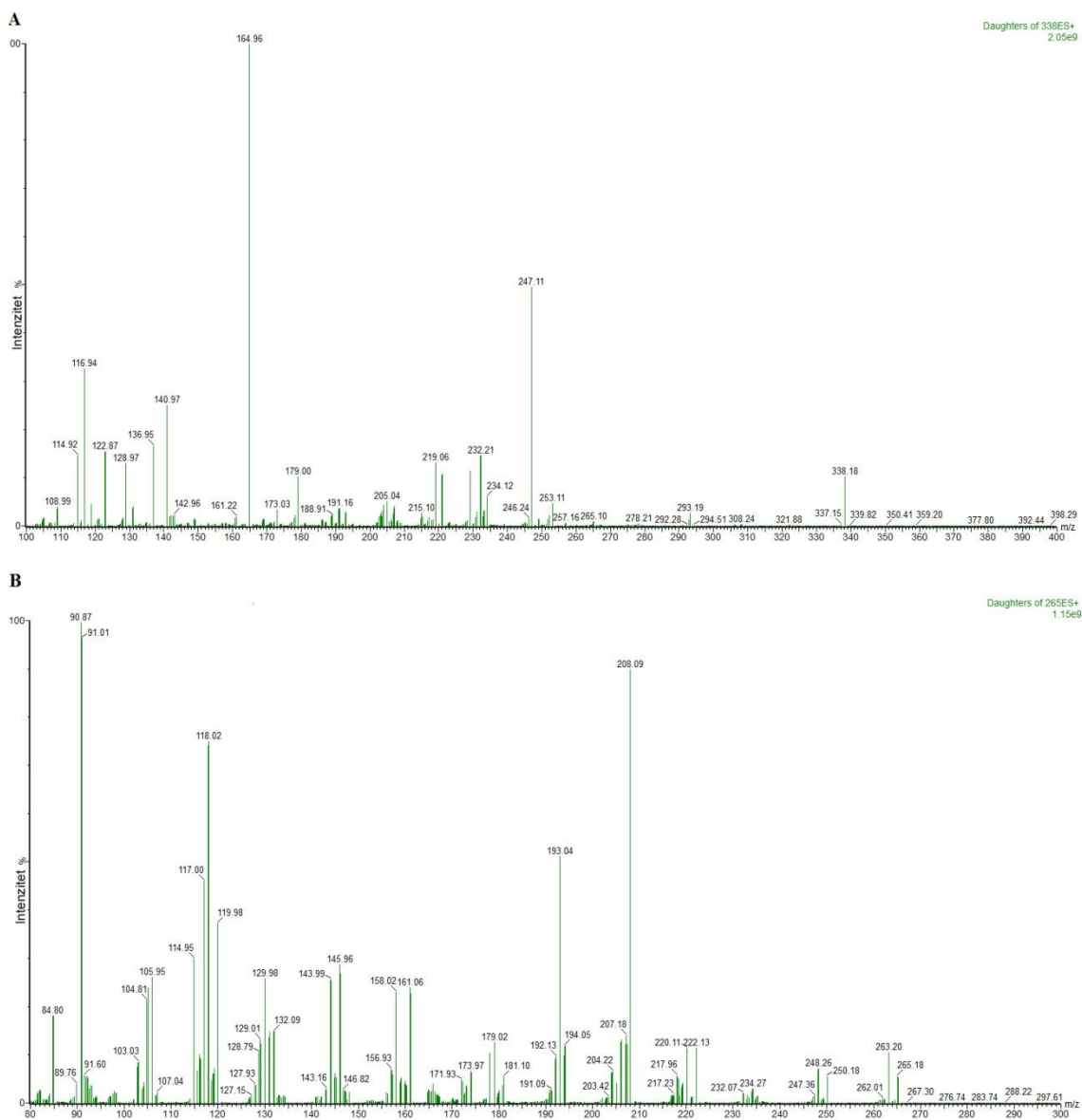
Definisanje optimalne MS/MS metode započeto je definisanjem odgovarajuće tehnike jonizacije i moda jonizacije. Takođe, u cilju dobijanja preciznijih rezultata određivanja analita i kontrole celokupnog analitičkog postupka od pripreme uzoraka do određivanja njihove koncentracije, razmotren je odabir internog standarda. Mianserin-hidrohlorid se smatrao odgovarajućim internim standardom zbog toga što je pokazao zadovoljavajuće retenciono ponašanje u HILIC sistemu, odnosno slično retencionog vreme kao i olopatadin (slika 17). Dodatno, mianserin je posedovao isti obrazac jonizacije kao i analit i reproduktivne *Recovery* vrednosti tokom zajedničkog procesa pripreme uzoraka biološkog materijala. Prilikom izbora metode jonizacije, kritični faktori koji su uzeti u obzir bili su molekulska masa i polarnost analita i internog standarda, kao i prisustvo grupa podložnih jonizaciji. Kako olopatadin i mianserin poseduju polarne grupe sa jonskim karakteristikama, zaključeno je da će se maksimalna efikasnost procesa jonizacije i stabilnost jona obezbediti primenom tehnike elektrosprej jonizacije. Prednost odabrane ESI metode ogledala se u činjenici da je operativna pri atmosferskom pritisku, što je omogućilo jednostavno povezivanje sa UHPLC sistemom i direktno uvođenje eluata sa kolone u jonski izvor. Takođe, ESI pripada grupi "mekih" (eng. *soft*) tehnika jonizacije i predstavlja blag proces sa dobro kontrolisanom fragmentacijom i velikom zastupljenošću molekuskog jona [95]. Zatim se pristupilo izboru optimalnog načina jonizacije, imajući u vidu strukturu analita i internog standarda. Zbog prisustva tercijarne amino i karboksilne grupe olopatadin je detektovan i u pozitivnom i u negativnom ESI modu, dok je mianserin kao bazna supstanca identifikovan samo u pozitivnom. Tokom izvođenja preliminarnih eksperimenata zapaženo je da je pozitivan mod olopatadina pokazao manji šum i veću osetljivost masenog spektrometra u poređenju sa negativnim modom, tako da je konačno odabran pozitivan mod.

Na taj način, korišćenjem jonskog izvora sa pozitivnom elektrosprej jonizacijom i direktnim injektovanjem analita i internog standarda u tandem maseni spektrometar, definisani su joni sa najvećim intenzitetom signala kao joni prekursori. Tumačenjem *full scan* masenog spektra olopatadina, pokazano je da se najzastupljeniji jednostruko naelektrisani protonovani molekulska jona nalazi na m/z vrednosti 338. U slučaju masenog spektra mianserina, dominantan $[M+H]^+$ jon na m/z vrednosti 265 izabran je kao jon prekursor.



Slika 17. Hemijska struktura internog standarda mianserin-hidrohlorida

Sledeća faza u razvoju MS/MS metode podrazumevala je određivanje po dve prekursor-proizvod jon tranzicije sa najvećim odgovorom za prethodno odabrane molekulske jone olopatadina i internog standarda, koje će biti praćene u MRM modu za kvantitativnu analizu i nedvosmislenu identifikaciju analita. Detekcija tranzicija, kao i određivanje optimalnih vrednosti kolizione energije i napona u konusu jonskog izvora za svaku odabranu tranziciju postignuti su automatskim procesom, korišćenjem *Intelli Start* opcije softvera u MRM modu. Na osnovu *product ion* masenog spektra prekursor jona olopatadina, prikazanog na slici 18A, može se zapaziti da se najzastupljeniji fragmentni jon nalazi na m/z vrednosti 165, dok se drugi karakterističan proizvod jon formira na m/z vrednosti 247. Glavni proizvod jon internog standarda identifikovan je na m/z vrednosti 91, a drugi najintenzivniji fragment nalazi se na m/z vrednosti 208 (slika 18B).



Slika 18. MS/MS spektri proizvod jona A) olopatadina i B) internog standarda

Koliziona energija je neophodna za raskidanje molekuskog jona na karakterističnim mestima i njegovu fragmentaciju usled ponovljenih sudara sa molekulima kolizionog gasa. Male vrednosti kolizione energije uslovljavaju nemogućnost dostizanja praga fragmentacije i formiranja proizvod jona, kao i formiranje neutralnog gubitka koji se najčešće ne smatra strukturno značajnim. S druge strane, velike vrednosti ovog parametra mogu dovesti do nepoželjne nekontrolisane fragmentacije nastalih proizvod jona od interesa na manje fragmente.

Kako poseduje bitan uticaj na efikasnost i obrazac fragmentacije u kolizionoj ćeliji trostrukog kvadripolnog masenog analizatora (QQQ), vrednost koliziona energije je obavezno optimizirati prilikom postavljanja svake MS/MS metode [96]. Parametar koji se može upotrebiti za postizanje fragmentacije u ESI jonskom izvoru i strukturnu analizu molekula jeste napon u konusu izvora. Njegovom primenom omogućava se izvlačenje jona iz dela jonskog izvora koji je pod atmosferskim pritiskom i njihovo usmeravanje ka masenom analizatoru, koji je pod visokim vakuumom. Povećanjem vrednosti napona u konusu na 50 V postiže se veća brzina kretanja jona kroz ovaj region, što dovodi do njihove kolizije u kontaktu sa desolvacionim gasom i posledične neselektivne fragmentacije. S druge strane, manje vrednosti napona u konusu prevashodno favorizuju detekciju molekulskog jona. U cilju postizanja kontrolisane i selektivne fragmentacije molekulskog jona u ESI izvoru, neophodno je definisati najpogodniju vrednost ovog značajnog parametra [97]. Dobijene optimalne vrednosti koliziona energije i napona u konusu izvora za obe tranzicije olopatadina i internog standarda prikazane su u tabeli 13.

Tabela 13. Optimalne vrednosti MS/MS parametara

<i>Jedinjenje</i>	<i>m/z vrednost</i>	<i>Napon u konusu izvora (V)</i>	<i>Koliziona energija (V)</i>	<i>Napon kapilare (kV)</i>
<i>Olopatadin-hidrochlorid</i>	338→165	35	15	3,5
	338→247	35	30	3,5
<i>Interni standard</i>	265→91	42	20	3,5
	265→208	42	42	3,5

U poslednoj fazi razvoja MS/MS metode, procesom autopodešavanja pomoću *MS Tune* opcije softvera, procenjen je uticaj ostalih bitnih parametara masene detekcije i određene su njihove optimalne vrednosti u cilju dobijanja što većeg intenziteta signala odabranih tranzicija. Napon kapilare smatra se jednim od ključnih parametara jonskog izvora koji značajno utiče na efikasnost jonizacije olopatadina i internog standarda. U toku preliminarnih istraživanja, njegov efekat ispitivan je u opsegu od 2 kV do 6 kV.

Povećanjem vrednosti pozitivnog napona u elektrospej igli nastaje jako električno polje koje uslovljava formiranje kapljica manjeg dijametra, čime je olakšana njihova desolvatacija pod dejstvom sušecćeg gasa, kao i jonizacija analita i internog standarda. Međutim, napon veći od 5 kV dovodi do visokonaponskog pražnjenja koje onemogućava nastanak mikrokapljica. Podešene optimalne vrednosti napona kapilare, definisane za svaku pojedinačnu tranziciju olopatadina i internog standarda, prikazane su u tabeli 13.

Na efikasnost jonizacije važan efekat ima i protok desolvacionog gasa koji je ispitivan u intervalu od 500 L h^{-1} do 1.500 L h^{-1} , kao i temperatura desolvatacije koja je praćena u opsegu od 300°C do 600°C . Rezultati preliminarnih studija pokazali su da su veće vrednosti protoka i temperature desolvacionog gasa azota doprinele bržoj evaporaciji i uklanjanju molekula rastvaraća kapljica, odnosno povećanju gustine naelektrisanja na njihovoj površini usled smanjenja njihovog dijametra. S druge strane, protok gasa azota u konusu jonskog izvora ne utiče znaćajno na usmeravanje generisanih jona u gasovitom stanju ka masenom analizatoru. Temperatura na kojoj se zagreva elektrospej kapilara varirana je u opsegu od 100°C do 150°C i na osnovu preliminarnih eksperimenata zaključeno je da poseduje znaćajan efekat na veličinu formiranih naelektrisanih kapljica tećnosti na njenom vrhu. Određene optimalne vrednosti prethodno opisanih parametara masene detekcije prikazane su u poglavlju 3.6.1.

Konaćno, u potpunosti je definisana MS/MS metoda koja je obezbedila dobijanje maksimalnog intenziteta signala olopatadina pogodnog za detektovanje i određivanje njegovih veoma malih koncentracija u uzorcima suza i na taj naćin omogućila dalji razvoj veoma osetljive UHPLC–MS/MS metode.

4.3.2. Karakterizacija hromatografskog ponašanja olopatadina u HILIC-UHPLC sistemu i definisanje optimalnih uslova razdvajanja

U cilju dobijanja UHPLC–MS/MS metode velike osetljivosti i selektivnosti koja će biti pogodna za brzo i pouzdano određivanje olopatadina u malim zapreminama humanih suza, odabrana je unapređena HILIC separaciona tehnika. Zahvaljujući kompatibilnosti reagenasa koji se koriste u HILIC hromatografiji sa izuzetno osetljivim MS/MS detektorom i velikoj isparljivosti mobilne faze koja doprinosi značajnom povećanju efikasnosti elektrosprej jonizacije, očekivalo se da će se postići relativno jednostavan razvoj bioanalitičke metode za praćenje izuzetno malih koncentracija olopatadina. Takođe, mala viskoznost HILIC mobilne faze uslovljava niži pritisak u primenjenoj koloni, što omogućava upotrebu većeg protoka eluenta i skraćivanje dužine trajanja analize. Dodatni motiv za primenu HILIC tehnike podrazumevao je da će se zbog kompatibilnosti organskih ekstrakata uzoraka biološkog materijala sa velikim udelom acetonitrila u mobilnoj fazi postići jednostavna priprema uzoraka suza. Imajući u vidu da je olopatadin amfoterno jedinjenje sa cviterjonskim karakteristikama, smatralo se da će se pomoću veoma selektivne HILIC tehnike sa odličnom separacionom moći obezbediti njegova adekvatna hromatografska analiza, kao i dodatno prečišćavanje uzoraka suza.

Nakon optimizacije parametara masene detekcije, u sledećem koraku naučnog istraživanja je primenom unapređene hemometrijske strategije sprovedena detaljna hromatografska procena olopatadina u HILIC-UHPLC sistemu, kao i identifikacija optimalnih uslova razdvajanja pogodnih za određivanje njegove koncentracije u uzorcima humanih suza. Na taj način, postignuto je dobijanje naučno značajnih podataka za bioanalitiku olopatadina.

4.3.2.1. Preliminarne studije

Polazna faza istraživanja podrazumevala je izvođenje serije preliminarnih eksperimenata sa ciljem da se definišu ključni faktori sa najvećim uticajem na retenciono ponašanje i kvalitet razdvajanja olopatadina i internog standarda u HILIC-UHPLC sistemu.

Na osnovu naučnih podataka i stečenog iskustva procenjeno je da vrsta stacionarne faze i komponente eluenta mogu imati bitan efekat na ponašanje olopatadina i internog standarda u HILIC hromatografiji, tako da je odabrana laboratorijska smeša ispitivana u brojnim polarnim kolonama koristeći mobilne faze različitih karakteristika pod HILIC uslovima. Upotrebljen je izokratski način eluiranja mobilnom fazom zbog toga što je omogućio zadovoljavajuće razdvajanje jedinjenja od interesa, prihvatljivo vreme trajanja analize i uklanjanje komponenti iz matriksa sa kolone.

Preliminarni eksperimenti izvođeni su u HILIC sistemu na amino, silikagel i amidnoj stacionarnoj fazi, čije osobine su opisane u poglavlju 3.1. Zbog prisustva elektrostatičkih repulzivnih interakcija, analit i interni standard nedovoljno su se zadržavali na površini pozitivno naelektrisane amino kolone, tako da njihovo zadovoljavajuće zadržavanje nije bilo moguće postići. U slučaju primene silika kolone, pikovi olopatadina i internog standarda eluirali su se blizu pika mobilne faze i posedovali su tzv. *tailing*. Konačno, kao adekvatna stacionarna faza, na kojoj je postignuto najprihvatljivije vreme trajanja analize i simetričan oblik pikova, odabrana je hibridna amidna kolona sa unakrsno povezanim etilenskim mostovima. Ova umereno polarna modifikovana silikagel kolona se zahvaljujući svojoj maloj veličini čestica pokazala pogodnom za sprovođenje HILIC separacije pod UHPLC uslovima. Dodatne prednosti izabrane neutralne stacionarne faze ogledale su se u činjenici da je hemijski stabilna u primenjenom opsegu pH vrednosti vodene faze, kao i da ne izaziva nepoželjne ireverzibilne adsorpcije analita i internog standarda. Hemijski vezane amidne grupe na površini kolone nemaju sposobnost jonizacije, ali je pri pH vrednostima eluenta većim od 4,0 moguće deprotonovanje rezidualnih silanolnih grupa [8]. Na taj način, u retencioni mehanizam razdvajanja olopatadina i internog standarda na upotrebnoj stacionarnoj fazi najverovatnije je uključena i jonska interakcija njihovih pozitivno naelektrisanih baznih grupa sa negativno naelektrisanim slobodnim silanolnim grupama. Redosled eluiranja ispitivanih komponenti u primenjenoj koloni bio je u skladu sa teorijskim znanjima o HILIC hromatografiji. Vrednost particionog koeficijenta internog standarda ($\log P = 3,83$) ukazuje da je interni standard lipofilniji od olopatadina ($\log P = 3,23$) [35]. Iz navedenog razloga, interni standard eluira se brže, dok se polarniji olopatadin duže zadržava na stacionarnoj fazi.

Važno je istaći i da u dosadašnjoj naučnoj literaturi nisu zabeležena istraživanja vezana za primenu UPLC BEH amidne kolone u analizi olopatadina.

Mobilna faza u HILIC sistemu, koja sadrži veliki procenat organskog rastvarača i mali udeo vode, predstavlja skoro idealan izbor za masenu detekciju. Naime, zbog svoje male viskoznosti i velike isparljivosti smanjuje površinski napon tečnosti, favorizujući formiranje tzv. Tejlorove kupe i sićušnih naelektrisanih kapi. Kapljice manjeg dijametra zatim brže podležu procesu desolvatacije i jonizacije u ESI izvoru, čime se postiže veća osetljivost masenog detektora. Takođe, mravlja kiselina koja se često koristi kao aditiv u HILIC sistemu pogoduje uslovima tandem masene detekcije [2]. Kako sastav mobilne faze može bitno uticati na zadržavanje i razdvajanje olopatadina i internog standarda u HILIC sistemu, široki opsezi vrednosti faktora povezanih sa eluentom procenjivani su u toku preliminarnih studija. Acetonitril je izabran kao pogodna organska komponenta mobilne faze zbog toga što daje jači odgovor detektora, duže zadržavanje analita i internog standarda u koloni, kao i poboljšanu simetriju njihovih pikova u odnosu na polarniji rastvarač, npr. metanol. Variranjem udela acetonitrila u opsegu koncentracija od 80% do 95% zapažen je značajan uticaj navedenog aprotinskog rastvarača na hromatografsko ponašanje olopatadina i internog standarda. Naime, pokazano je da povećanje sadržaja acetonitrila dovodi do njihovog jačeg zadržavanja u BEH amidnoj koloni i posledično bržeg sprovođenja analize, kao i do poboljšanog razdvajanja njihovih pikova. Ovakvi zaključci bili su i očekivani s obzirom da se u HILIC sistemu povećanjem udela manje polarnog rastvarača smanjuje debljina vodenog sloja, koji se jače vezuje za površinu kolone, što dovodi do produženog zadržavanja polarnih komponenti [18].

U vodenu fazu eluenta dodata je mravlja kiselina koja ima ulogu donora protona i njen sadržaj optimiziran je u cilju postizanja maksimalnog intenziteta signala na masenom detektoru. Zaključeno je da koncentracija mravlje kiseline od 0,1% najviše doprinosi formiranju protonovanih formi molekulskih jona analita i internog standarda, odnosno povećanju efikasnosti elektrosprej jonizacije, kao i osetljivosti metode. Takođe, pri pH vrednosti 0,1%-tnog vodenog rastvora mravlje kiseline analit i interni standard bili su u poželjnim jonizujućim formama, čime je povećana njihova hidrofilnost i zadržavanje u HILIC sistemu.

Zapravo, amfoterno jedinjenje olopatadin egzistira u svom cviterjonskom obliku, dok se mianserin, koji poseduje tercijarnu amino grupu čija je pK_a vrednost 6,92 [35], nalazi u svom katjonskom obliku.

Temperatura BEH amidne stacionarne faze ispitivana je u opsegu od 25°C do 35°C, dok je protok mobilne faze variran u intervalu od 0,1 mL min⁻¹ do 0,4 mL min⁻¹. Preliminarnim eksperimentima utvrđeno je da ovi faktori bitno utiču na retenciono ponašanje i simetriju pikova olopatadina i internog standarda. Povišenjem temperature kolone u datom opsegu dobijeni su oštriji pikovi bez tzv. *tailinga*, dok su viši protoci eluenta rezultovali smanjenjem ukupnog vremena trajanja analize i poboljšanjem oblika pikova ispitivanog jedinjenja i internog standarda.

Konačno, identifikovani su sledeći kvantitativni kritični faktori sa značajnim uticajem na hromatografsko ponašanje ispitivanog leka i internog standarda, koji će potom biti detaljnije istraživani primenom DoE metodologije: sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, protok mobilne faze i temperatura kolone.

4.3.2.2. *Primena hemometrijskog pristupa*

U sledećoj fazi naučnog istraživanja izvršena je detaljna karakterizacija hromatografskog ponašanja olopatadina u HILIC-UHPLC sistemu hemometrijskim pristupom. Primenjena strategija omogućila je građenje adekvatnih matematičkih modela, koji su obezbedili detaljnu analizu istovremenog uticaja većeg broja faktora i njihovih interakcija na retenciono ponašanje olopatadina i internog standarda. Takođe, definisani empirijski modeli iskorišćeni su kao osnova za optimizaciju uslova hromatografskog razdvajanja.

Na osnovu podataka dobijenih u preliminarnim studijama, identifikovani su konačni intervali variranja značajnih faktora. Definisani opsezi kvantitativnih faktora bili su sledeći: 87–93% za udeo acetonitrila u eluentu, 27–33°C za temperaturu BEH amidne kolone i 0,15–0,25 mL min⁻¹ za protok eluenta. Na taj način, pažljivo je kreiran eksperimentalni prostor koji je potom ispitivan odgovarajućim hemometrijskim alatom.

Imajući u vidu broj, vrstu i nivoe ispitivanih faktora, odabran je *Box-Benhken* dizajn za opisivanje HILIC-UHPLC sistema. Pomoću ove vrste optimizacionog dizajna, u fazi karakterizacije hromatografskog ponašanja olopatadina i internog standarda u HILIC-UHPLC sistemu, istražen je uticaj tri kritična faktora na graničnom donjem, nominalnom i graničnom gornjem nivou. Kodiranim vrednostima -1 i $+1$ za sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi dodeljene su stvarne vrednosti 87% i 93%, za protok mobilne faze vrednosti $0,15 \text{ mL min}^{-1}$ i $0,25 \text{ mL min}^{-1}$, a za temperaturu kolone vrednosti 27°C i 33°C . Matrici upotrebljenog dizajna dodate su tri replikacije u centralnoj tački kako bi se obezbedila potrebna statistička verifikacija modela. Plan eksperimenta, sastavljen od ukupno 15 eksperimenata, predstavljen je u tabeli 3. Priprema laboratorijske smeše standarda olopatadin-hidrohlorida i internog standarda, kao i priprema mobilnih faza, date su poglavljima 3.6.2.1. i 3.6.2.2.

Kako bi se na adekvatan način objasnilo retenciono ponašanje analita u HILIC-UHPLC sistemu, kao odgovori sistema koje je bilo potrebno pratiti odabrani su retenciono vreme internog standarda mianserin-hidrohlorida (t_1), retenciono vreme olopatadin-hidrohlorida (t_2) i kriterijum separacije (S), koji predstavlja razliku između retencionog vremena početka pika olopatadin-hidrohlorida i retencionog vremena kraja pika internog standarda. Dobijeni rezultati odgovora hromatografskog sistema prikazani su u tabeli 14.

Tabela 14. Eksperimentalno dobijene vrednosti izabranih odgovora sistema*

<i>N_o</i>	<i>t₁</i> [min.]	<i>t₂</i> [min.]	<i>S</i>
1.	2,37	2,58	0,04
2.	1,59	2,05	-0,05
3.	1,86	2,39	0,03
4.	3,78	4,89	0,25
5.	3,68	4,93	0,40
6.	1,52	2,09	-0,02
7.	1,96	2,50	0,10
8.	3,75	4,84	0,35
9.	2,40	2,71	0,06
10.	1,71	2,25	0,04
11.	3,59	4,53	0,31
12.	1,55	2,24	-0,02
13.	2,21	2,53	0,09
14.	2,20	2,53	0,06
15.	2,21	2,56	0,07

t₁ – retenciono vreme mianserin-hidrohlorida (interni standard)

t₂ – retenciono vreme olopatadin-hidrohlorida

S – razlika između retencionog vremena početka pika olopatadin-hidrohlorida i retencionog vremena kraja pika mianserin-hidrohlorida

*Maksić J, Stajić A, Knežević M, Dačić Krnjaja B, Jančić-Stojanović B, Medenica M. Determination of olopatadine in human tears by HILIC-MS/MS method. *Bioanalysis*. 2017; 9 (24): 1943–54.

Na osnovu eksperimentalno dobijenih podataka za tri željena odgovora sistema, primenom tehnike višestruke linearne regresije i metode najmanjih kvadrata, generisani su odgovarajući polinomi drugog stepena sa dvofaktorskim interakcijama i izračunati su regresioni koeficijenti za kodirane vrednosti ispitivanih faktora (jednačina 10, tabela 15). Adekvatnost i sposobnost predviđanja dobijenih kvadratnih jednačina ispitana je primenom ANOVA testa.

$$y = b_0 + b_1A + b_2B + b_3C + b_{12}AB + b_{13}AC + b_{23}BC + b_{11}A^2 + b_{22}B^2 + b_{33}C^2 \quad (10)$$

Tabela 15. Koeficijenti kreiranih kvadratnih modela i njihova statistička značajnost*

<i>Odgovor</i>	<i>t</i> ₁		<i>t</i> ₂		<i>S</i>		
	<i>Član</i>	<i>Koeficijent</i>	<i>p-vrednost</i>	<i>Koeficijent</i>	<i>p-vrednost</i>	<i>Koeficijent</i>	<i>p-vrednost</i>
	<i>b</i> ₀	2,210	0,0001♦	2,540	<0,0001♦	0,073	0,0002♦
	<i>b</i> ₁	1,050	<0,0001♦	1,320	<0,0001♦	0,170	<0,0001♦
	<i>b</i> ₂	-0,140	0,0278♦	-0,081	0,0255♦	0,005	0,5867
	<i>b</i> ₃	-0,031	0,5163	-0,099	0,0123♦	-0,023	0,0475♦
	<i>b</i> ₁₂	0,023	0,7368	0,038	0,3516	0,048	0,0114♦
	<i>b</i> ₁₃	-0,015	0,8221	-0,062	0,1477	-0,022	0,1240
	<i>b</i> ₂₃	-0,017	0,7933	0,005	0,8964	-0,013	0,3518
	<i>b</i> ₁₁	0,470	0,0008♦	0,940	<0,0001♦	0,092	0,0008♦
	<i>b</i> ₂₂	0,032	0,6512	0,033	0,4316	-0,018	0,2167
	<i>b</i> ₃₃	-0,091	0,2266	-0,027	0,5018	0,002	0,8759
	<i>RSD [%]</i>	0,223		0,396		0,287	
	<i>R</i> ²	0,992		0,999		0,990	
	<i>Adjusted R</i> ²	0,978		0,996		0,971	
	<i>Predicted R</i> ²	0,872		0,976		0,856	
	<i>Lack of fit</i>	0,125		0,236		0,227	

*t*₁ – retenciono vreme mianserin-hidrohlorida (interni standard)

*t*₂ – retenciono vreme olopatadin-hidrohlorida

S – razlika između retencionog vremena početka pika olopatadin-hidrohlorida i retencionog vremena kraja pika mianserin-hidrohlorida

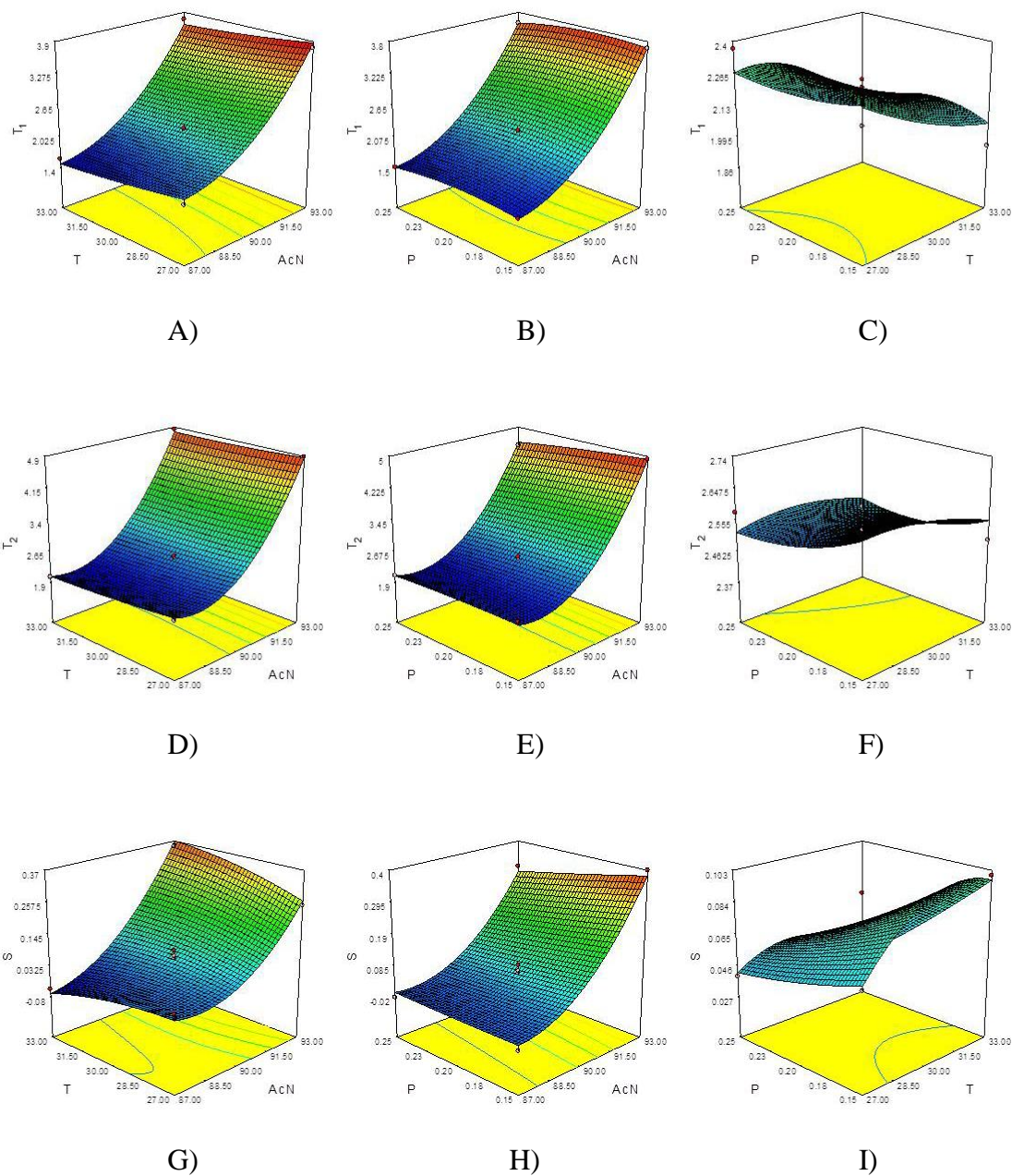
♦Statistički značajni koeficijenti za nivo značajnosti $\alpha = 0,05$

*Maksić J, Stajić A, Knežević M, Dačić Krnjaja B, Jančić–Stojanović B, Medenica M. Determination of olopatadine in human tears by HILIC–MS/MS method. *Bioanalysis*. 2017; 9 (24): 1943–54.

Predstavljene vrednosti relevantnih statističkih parametara *R*², *adjusted R*² i *predicted R*² ukazale su da predloženi empirijski modeli adekvatno opisuju odgovore hromatografskog sistema unutar ispitivanog eksperimentalnog prostora. Pouzdanost eksperimentalnih modela potvrđena je i tzv. *lack of fit* testom koji nije bio statistički značajan, kao i RSD vrednostima koje su bile manje od 0,4%.

DoE metodologija je u konkretnom slučaju obezbedila i da se uticaji ispitivanih faktora kvantitativno definišu, čime je postignuta sveobuhvatna karakterizacija i predviđanje retencionog ponašanja olopatadina i internog standarda u nedovoljno proučenom HILIC sistemu na BEH amidnoj stacionarnoj fazi. Efekti pojedinačnih faktora i njihovih interakcija na posmatrane odgovore sistema procenjeni su na osnovu statistički značajnih regresionih koeficijenata kreiranih matematičkih modela prikazanih u tabeli 15. Vizuelna potvrda zaključaka izvedenih na osnovu razmatranja polinomijalnih modela, kao i detaljnije opisivanje hromatografskog ponašanja analita i internog standarda postignuti su konstruisanjem odgovarajućih 3-D površina odgovora. 3-D dijagrami za retenciona vremena olopatadina i internog standarda, kao i za kriterijum separacije u funkciji dva istraživana faktora, prikazani su na slici 19 A–I.

Na osnovu b_1 , b_2 i b_3 regresionih koeficijenata linearnih članova definisanih empirijskih modela za praćene odgovore sistema, protumačeni su uticaji pojedinačnih faktora vezanih za mobilnu fazu i karakteristike stacionarne faze na zadržavanje i kvalitet razdvajanja olopatadina i internog standarda. Očekivano, b_1 regresioni koeficijenti su statistički značajni u slučaju polinoma drugog stepena za sva tri praćena odgovora. Na taj način, potvrđen je veoma bitan uticaj udela acetonitrila u mobilnoj fazi na zadržavanje analita i internog standarda u koloni, kao i na međusobno razdvajanje. Takođe, kako su p -vrednosti koje odgovaraju b_2 koeficijentima linearnih članova kreiranih modela za t_1 i t_2 odgovore manje od 0,05, dokazan je značajan efekat temperature kolone na retenciono ponašanje internog standarda i ispitivanog jedinjenja. Protok mobilne faze ima bitan uticaj na zadržavanje olopatadina na stacionarnoj fazi, kao i na kvalitet razdvajanja od internog standarda, što je zaključeno posmatranjem statistički značajnih b_3 koeficijenata koji se odnose na eksperimentalne modele za t_2 i S . Dodatno, analizom kvadratnog modela za kriterijum separacije zapažen je značajan istovremeni efekat udela acetonitrila u eluentu i temperature stacionarne faze (p -vrednost b_{12} koeficijenta člana dvofaktorske interakcije iznosi 0,0114).



Slika 19. Trodimenzionne površine t_1 , t_2 i S odgovora u funkciji tri ispitivana faktora (sadržaj acetonitrila u eluentu [%], temperatura kolone [°C] i protok eluenta [mL min⁻¹])

A, B, C) t_1 – retenciono vreme mianserin-hidrohlorida (interni standard)

D, E, F) t_2 – retenciono vreme olopatadin-hidrohlorida

G, H, I) S – razlika između retencionog vremena početka pika olopatadin-hidrohlorida i retencionog vremena kraja pika mianserin-hidrohlorida

Zatim je sagledan stepen efekta istraživanih faktora analizom apsolutnih vrednosti koeficijenata linearnih članova generisanih matematičkih modela. Donet je zaključak da su zadržavanje olopatadina i internog standarda na stacionarnoj fazi, kao i njihovo razdvajanje pod najvećim uticajem sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi. Moglo se uvideti i da udeo acetonitrila u eluentu ima najjači efekat na retenciono vreme poslednje eluirane komponente i ukupno vreme trajanja analize, a najslabiji na razdvajanje analita i internog standarda. S druge strane, temperatura kolone ima veći uticaj na zadržavanje internog standarda u koloni nego na zadržavanje olopatadina. Takođe, pokazano je da protok mobilne faze poseduje veći uticaj na retenciono ponašanje olopatadina nego na njegov kvalitet separacije.

Dalje, na osnovu pozitivnog predznaka b_1 koeficijenata linearnih članova svih definisanih modela, zapažen je porast zadržavanja analita i internog standarda sa porastom sadržaja acetonitrila u eluentu, kao i njihovo bolje razdvajanje. Priroda ove zavisnosti je nelinearnog karaktera, što su potvrdili statistički značajni b_{11} koeficijenti kvadratnih članova u kreiranim modelima. Isti zaključak donet je i vizuelnom evaluacijom zavisnosti retencionih vremena internog standarda i olopatadina od udela acetonitrila u mobilnoj fazi i temperature kolone (slika 19A i 19D), odnosno protoka mobilne faze (slike 19B i 19E). Takođe, veoma jak pozitivan uticaj sadržaja acetonitrila na razdvajanje olopatadina i internog standarda verifikovan je pomoću ilustrovanih 3-D dijagrama koji predstavljaju zavisnost kriterijuma separacije od udela acetonitrila u eluentu i temperature kolone (slika 19G), odnosno protoka eluenta (slika 19H). Dalje, pomoću negativnog predznaka apsolutnih vrednosti b_2 koeficijenata modela za t_1 i t_2 odgovore, zapaženo je da se povišenjem temperature stacionarne faze u ispitivanom opsegu skraćuje retenciono vreme internog standarda i ispitivanog jedinjenja, odnosno ukupna dužina trajanja analize, što je u saglasnosti sa dosadašnjim naučnim podacima o HILIC sistemu. Rezultati iz preliminarnih studija pokazali su da se pri višem protoku mobilne faze postiže umereno kraće vreme trajanja analize, kao i dobijanje pikova pravilnog oblika. Na osnovu negativnog predznaka statistički značajnih b_3 koeficijenata linearnih članova kreiranih modela koji odgovaraju t_2 i S odgovorima, potvrđeno je da povećanje protoka mobilne faze uslovljava poželjno kraće zadržavanje olopatadina u datom HILIC sistemu, ali i njegovo lošije razdvajanje.

Tumačenjem podataka iz tabele 15 moglo se primetiti i da pojedinačni faktori nezavisno utiču na retenciono ponašanje olopatadina i internog standarda. Naime, svi regresioni koeficijenti članova dvofaktorskih interakcija generisanih modela za t_1 i t_2 odgovore nisu statistički značajni, što ukazuje da istovremene interakcije između istraživanih faktora nemaju značajan efekat na zadržavanje analita i internog standarda u koloni. S druge strane, kako je pomoću p -vrednosti b_{12} koeficijenta pokazano da je kriterijum separacije pod bitnim istovremenim uticajem sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi i temperature kolone, to je bilo potrebno detaljnije tumačenje statistički značajne dvofaktorske interakcije, ilustrovane 3-D dijagramom (slika 19G). Na taj način, potvrđen je veoma jak uticaj acetonitrila na S odgovor, kao i to da se povećanjem njegovog udela u ispitivanom intervalu poboljšava razdvajanje olopatadina i internog standarda. Isti zaključci doneti su i na osnovu pozitivnog predznaka b_1 koeficijenta linearnog člana za empirijski model povezan sa kriterijumom separacije, kao i na osnovu rezultata iz preliminarnih studija. Takođe, posmatranjem datog 3-D dijagrama moglo se uvideti da povišenje temperature stacionarne faze uslovljava samo malo bolje razdvajanje olopatadina od internog standarda. S druge strane, razmatranjem b_2 regresionog koeficijenta modela koji se odnosio na S odgovor, pojedinačan efekat temperature nije se pokazao statistički značajnim.

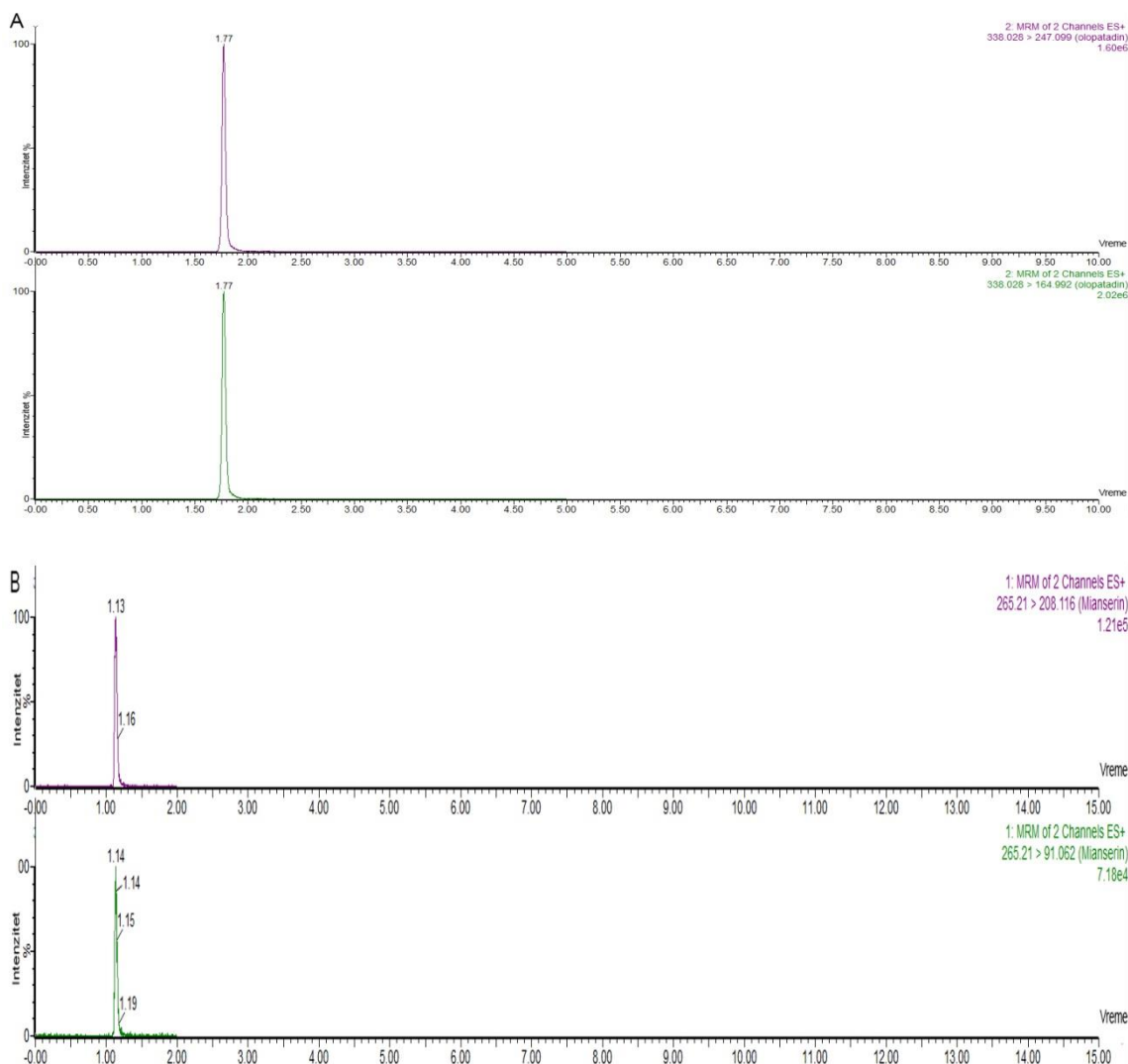
4.3.2.3. Definisane optimalnih UHPLC uslova razdvajanja

Nakon postizanja kompletne karakterizacije retencionog ponašanja olopatadina u složenom HILIC-UHPLC sistemu, pristupilo se odabiru odgovarajućih hromatografskih uslova za njegovu kvantitativnu analizu u suzama. Inicijalna faza ovog dela istraživanja uključila je definisanje ciljeva optimizacije HILIC-UHPLC metode. Primarni cilj bio je da se omogući potpuno razdvajanje olopatadina i internog standarda, odnosno da se obezbedi da vrednost kriterijuma separacije bude veća od 0,2. Drugi postavljeni kriterijum za optimizaciju podrazumevao je minimizaciju dužine trajanja analize i opisan je retencionim vremenom poslednje eluirane komponente (t_2), koje je bilo potrebno da bude manje od 2,5 min.

Na taj način, konačan cilj optimizacije HILIC-UHPLC metode bio je usmeren ka pronalaženju kompromisa između vrednosti ispitivanih faktora koje će obezbediti maksimalno razdvajanje analiziranog para pikova, u okviru prihvatljivog ukupnog vremena trajanja analize.

Kako bi se dobile zadovoljavajuće vrednosti dva odabrana odgovora sa različitim i suprotnim ciljevima, istovremena optimizacija vrednosti tri ključna faktora sprovedena je primenom savremenog multikriterijumskog pristupa optimizaciji. Kao najefikasnija metoda multikriterijumske strategije za pronalaženje globalnog optimuma u skladu s postavljenim ciljevima optimizacije, odabrana je numerička tehnika pretrage čvorova mreže [78]. Primenjena metodologija podrazumevala je da se prethodno definisani eksperimentalni prostor podeli u mrežu i da se potom željene vrednosti odgovora pretražuju samo u čvorovima mreže. Definisane rastojanja između čvorova mreže, odnosno gustine mreže unutar raspona vrednosti istraživanih faktora, predstavljalo je veoma bitan početni korak prilikom upotrebe ove relativno jednostavne enumerativne metode. Najpre je izvršena diskretizacija intervala ispitivanih faktora, a potom je gustina mreže formirana tako da inkrementi u kodiranim vrednostima budu 0,5 za sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, temperaturu kolone i protok mobilne faze. Na taj način, pomak za koncentraciju acetonitrila u eluentu bio je 1,5%, za temperaturu stacionarne faze 1,5°C, a za protok eluenta 0,025 mL min⁻¹. Ukupan broj nivoa za svaki značajan faktor iznosio je 5. Dalje, konačan broj ispitivanih eksperimentalnih tačaka bio je sledeći: 5 nivoa za udeo acetonitrila u eluentu × 5 nivoa za temperaturu kolone × 5 nivoa za protok eluenta = 125. Zatim su u svakoj definisanoj tački, odnosno u svakom od čvorova mreže izračunate vrednosti dva praćena odgovora, korišćenjem matematičkih modela kreiranih primenom *Box–Behken* eksperimentalnog dizajna. Imajući u vidu prethodno postavljene kriterijume za optimizaciju, pomoću MATLAB® 7.10.0. softverskog programa preuzete su i upoređivane vrednosti t_2 odgovora manje od 2,5 min. i S vrednosti veće od 0,2. Konačno, pronađen je opšti optimum koji je okarakterisan sledećom kombinacijom značajnih faktora: 90% za sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, 30°C za temperaturu UPLC BEH amidne kolone i 0,25 mL min⁻¹ za protok mobilne faze. Pod datim optimalnim hromatografskim uslovima razdvajanja predviđene su sledeće najbolje vrednosti odgovora: $t_2 = 1,94$ min. i kriterijum separacije = 0,36.

Kako bi se izvršila eksterna validacija optimizirane HILIC metode sa MS/MS detekcijom, izvedena je hromatografska analiza pod ovako definisanim optimalnim uslovima. Dobijeni MRM hromatogrami prikazani su na slici 20.



Slika 20. Tipični MRM hromatogrami laboratorijske smeše koja sadrži: A) $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ olopatadin-hidroklorida ($t_2 = 1,77 \text{ min.}$) i B) $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ internog standarda mianserin-hidroklorida ($t_1 = 1,14 \text{ min.}$), dobijeni pod sledećim optimalnim hromatografskim uslovima: UPLC BEH amidna kolona (dimenzije $100 \text{ mm} \times 2,1 \text{ mm}$, $1,7 \mu\text{m}$ veličina čestica); mobilna faza sastavljena od acetonitrila i 0,1%-tnog vodenog rastvora mravlje kiseline u odnosu 90:10 V/V; protok mobilne faze $0,25 \text{ mL min}^{-1}$; temperatura kolone 30°C i zapremina injektovanja $1 \mu\text{L}$

Utvrđena optimalna tačka verifikovana je upoređivanjem teorijskih i eksperimentalno dobijenih hromatograma. Iz razlike između retencionog vremena početka pika olopatadina i retencionog vremena kraja pika internog standarda očitanih sa hromatograma (slika 20), izračunata je eksperimentalna vrednost kriterijuma separacije od 0,40. Takođe, eksperimentalno određena vrednost retencionog vremena olopatadina bila je 1,77 min. Na osnovu slaganja predviđenih i eksperimentalnih vrednosti odgovora sistema pod optimalnim UHPLC uslovima radovanja (RSD = 7,4% za S ; RSD = 6,5% za t_2), potvrđena je adekvatnost upotrebljene strategije optimizacije. Komponente analizirane smeše dobro su razdvojene u HILIC sistemu sa MS/MS detekcijom na UPLC BEH amidnoj stacionarnoj fazi za manje od 2 min.

4.3.3. Određivanje postupka pripreme uzoraka humanih suza

Poslednja faza razvoja HILIC–ESI/MS/MS metode za određivanje olopatadina u humanim suzama podrazumevala je optimizaciju adekvatne procedure pripreme uzoraka biološkog materijala izuzetno male zapremine, koja će omogućiti efikasnu ekstrakciju analita i uklanjanje svih potencijalno interferirajućih komponenti iz matriksa koje mogu ometati analizu. Kako su organski ekstrakti uzoraka biološkog materijala pripremljeni najčešće korišćenim tehnikama precipitacije proteina, tečno-tečne ekstrakcije i čvrsto-tečne ekstrakcije kompatibilni sa velikim udelom acetonitrila u HILIC mobilnoj fazi i uglavnom se mogu direktno injektovati u kolonu, očekivalo se da će se postići razvoj relativno jednostavne metode pripreme uzoraka humanih suza.

Postupak pripreme uzoraka suza predstavljao je kritičan korak za kvalitativnu i kvantitativnu analizu olopatadina zbog toga što može imati veliki efekat na selektivnost, osetljivost, tačnost i preciznost predložene HILIC metode sa MS/MS detekcijom. Humane suze predstavljaju kompleksnu smešu koja se sastoji od 1% različitih proteinskih komponenti (albumini, globulini i lizozimi), zatim lipida, ugljenih hidrata i soli [26,27]. Ova endogena jedinjenja mogu značajno uticati na efikasnost jonizacije olopatadina i modifikaciju intenziteta njegovog odgovora. Naime, koekstrahovane komponente iz suza mogu da interferiraju u procesima desolvatacije i jonizacije olopatadina u ESI izvoru.

U slučaju velike koncentracije jona komponenti matriksa može doći do kompeticije sa jonima analita za dostupno naelektrisanje, što za posledicu može imati supresiju njegove jonizacije i smanjenje signala. Takođe, koeluirajuće supstance iz matriksa mogu povećati viskoznost i površinski napon kapljica olopatadina i na taj način smanjiti mogućnost njegovog izbijanja iz kapljice i prevođenja u gasovito stanje. Iz navedenih razloga, sva prisutna interferirajuća jedinjenja iz suza obavezno su morala biti uklonjena tokom pripreme uzoraka kako bi se smanjio, odnosno eliminisao efekat matriksa.

U cilju dostizanja potrebne velike osetljivost i pouzdanosti predložene bioanalitičke HILIC–ESI/MS/MS metode, neophodno je bilo definisati efikasnu proceduru pripreme uzoraka suza kojom će se postići što veća ekstrakcija analita, kao i najveće moguće smanjenje uticaja interferirajućih komponenti iz matriksa. U tom smislu, prvi postavljeni cilj optimizacije metode pripreme uzoraka podrazumevao je da se dobije maksimalan i konstantan prinos ekstrakcije olopatadina, uz minimiziranje efekta matriksa i prihvatljivo vreme trajanja izvođenja postupka. Dodatni kriterijum optimizacije bio je da priprema uzoraka bude relativno jednostavna i pogodna za rutinsku analizu u toku kliničke prakse.

Tokom izvođenja preliminarnih studija, različite tehnike pripreme uzoraka biološkog materijala koje uključuju tečno-tečnu ekstrakciju i precipitaciju proteina su istraživane korišćenjem smeše čija je priprema opisana u poglavlju 3.7.1. Za sprovođenje tečno-tečne ekstrakcije olopatadina iz suza, kao organski rastvarači koji se ne mešaju sa vodom, izabrani su hloroform i dietil-etar. Zatim je vršeno uklanjanje rastvarača uparavanjem u struji azota u cilju postizanja maksimalne koncentracije analita, kao i rastvaranje ostatka u acetonitrilu. Iako je metodom tečno-tečne ekstrakcije postignuto zadovoljavajuće prečišćavanje uzoraka, ograničavajući faktori za njenu primenu bili su nedovoljna zapremina uzorka, formiranje emulzije u prisustvu oba nepolarna rastvarača, loše razdvajanje faza, kao i dobijanje *Recovery* vrednosti olopatadina i internog standarda koje nisu bile konzistentne.

Potom je ispitana mogućnost primene metode precipitacije proteina u prisustvu acetonitrila i metanola kao potencijalnih agenasa za denaturisanje. Acetonitril je kao organski rastvarač sličnih karakteristika mobilnoj fazi omogućio bolji oblik pikova olopatadina i veći intenzitet signala odgovora u poređenju sa metanolom, tako da je izabran kao optimalan agens za denaturisanje brojnih proteinskih komponenti suza. Kako je precipitacijom proteina pomoću acetonitrila uz prateće centrifugiranje postignuto zadovoljavajuće uklanjanje proteina iz matriksa i odgovarajući prinos ekstrakcije olopatadina, ova jednostavna tehnika je i odabrana za pripremu uzoraka humanih suza. Zatim se pristupilo proceni adekvatnog odnosa između zapremine uzorka suza i zapremine agensa za denaturisanje. Na osnovu stečenih preliminarnih podataka, pokazano je da se najveći prinos postupka ekstrakcije postiže pri odnosu zapremina uzorka biološkog materijala i acetonitrila od oko 1:30. Imajući u vidu prosečnu zapreminu uzorka suza koja se sakuplja pomoću Širmerovih test traka, određeno je da optimalna količina acetonitrila bude 950 μ L. Dalje, u uzorke suza je dodat interni standard u cilju dobijanja pouzdanijih rezultata određivanja olopatadina. Kako bi efekat matriksa bio isti na sve komponente uzorka (analit i interni standard), mianserin-hidrohlorid dodat je u uzorke pre izvođenja procesa ekstrakcije.

Sledeći korak kreiranja metode pripreme uzoraka suza podrazumevao je identifikaciju ključnih faktora sa najvećim uticajem na prinos ekstrakcije olopatadina i efekat matriksa, kao i pronalaženje njihovih optimalnih vrednosti na osnovu rezultata iz brojnih preliminarnih eksperimenata. U cilju postizanja veće prečišćenosti ekstrakta, zapaženo je da je nakon dodatka precipitirajućeg agensa potrebno uzorke čuvati na 4°C u optimalnom vremenskom intervalu od 1 h. Zatim je detaljno procenjen efekat vremena vorteksiranja uzoraka u intervalu od 5 min. do 20 min. Pokazano je da ovaj parametar ima znatan uticaj na izolovanje olopatadina iz suza, kao i da se pri njegovim većim vrednostima dobijaju veće *Recovery* vrednosti analita i internog standarda. Na taj način, određeno je da se uzorci suza nakon temperiranja na sobnu temperaturu mešaju na *Vortex* aparatu u trajanju od 15 min. Dodatno, ispitan je uticaj brzine centrifugiranja uzoraka u širokom opsegu od 1.000 rcf do 21.000 rcf, kao i efekat vremena centrifugiranja uzoraka u intervalu od 5 min. do 25 min.

Utvrđeno je da ovi kvantitativni faktori značajno utiču na stepen uklanjanja interferirajućih jedinjenja iz matriksa, kao i da se povećanjem njihovih vrednosti obezbeđuje poboljšana prečišćenost uzoraka suza. Iz navedenog razloga, za optimalnu brzinu centrifugiranja definisana je maksimalna vrednost aparata od 21.000 rcf, dok je najpogodnije vreme centrifugiranja 20 min. Praćen je i uticaj temperature na kojoj se uzorci centrifugiraju u intervalu od 4°C do 25°C i zapaženo je da ovaj faktor bitno utiče na ekstrakciju ispitivanog olopatadina. Naime, željeni veći prinos ekstrakcije olopatadina postignut je pri nižim temperaturama tokom centrifugiranja, tako da je kao optimum postavljena vrednost od 4°C.

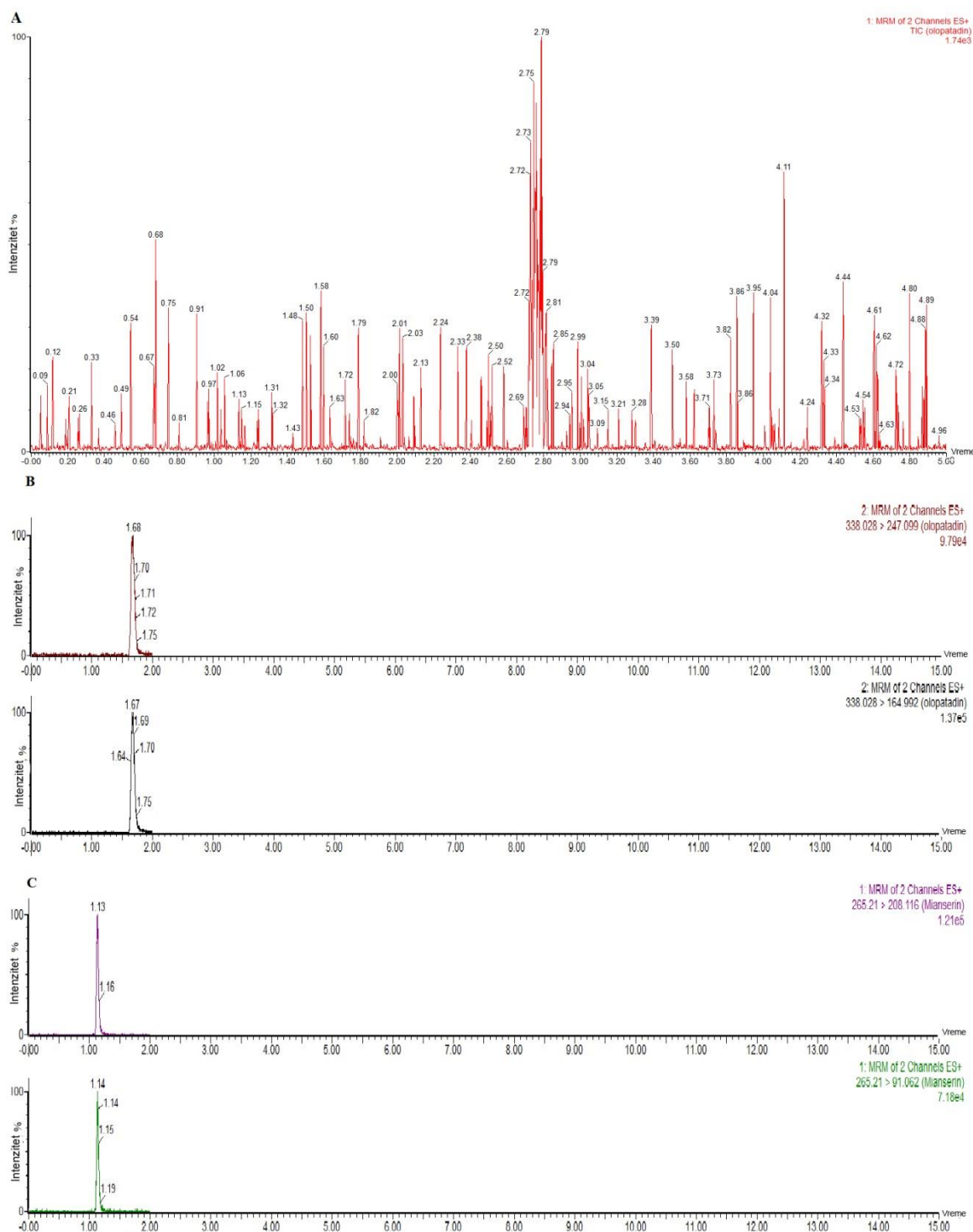
Konačno, definisani su optimalni uslovi pripreme uzoraka humanih suza u skladu sa prethodno postavljenim kriterijumima za optimizaciju. Razvijena procedura pripreme uzoraka obezbedila je dobijanje veoma čistih ekstrakata sa velikim i reproduktivnim *Recovery* vrednostima za olopatadin. Takođe, prednost primenjene tehnike precipitacije proteina pomoću acetonitrila ogledala se u činjenici da je jednostavna, vremenski ne previše zahtevna, isplativa i pogodna za rutinsko ispitivanje kliničkih uzoraka.

4.3.4. Validacija HILIC–ESI/MS/MS metode za kvantitativnu analizu olopatadina u uzorcima suza

Nakon optimizacije parametara masene detekcije, UHPLC uslova i procedure za pripremu uzoraka, pristupilo se procesu validacije bioanalitičke HILIC–MS/MS metode čime je pokazana njena pogodnost za kvantitativnu analizu olopatadina u humanim suzama i potvrđeno dobijanje pouzdanih rezultata.

Za pripremu standarda za procenu linearnosti i QC uzoraka, kao i za ispitivanje selektivnosti HILIC–ESI/MS/MS metode, korišćen je sterilni standardni rastvor veštačkih suza umesto realnih humanih suza zbog njihove nedostupnosti iz komercijalnih izvora i nemogućnosti da se veća zapremina uzorkuje od pojedinca. Sastav ovog surogat matriksa uključio je sve komponente (albumini, γ -globulini, lizozimi, kalijum-hlorid, natrijum-hlorid, natrijum-karbonat, amonijum-hlorid, vitamin C, limunska kiselina, piruvinska kiselina, mlečna kiselina, glukoza, urea) koje su inače prisutne u prirodnim suzama u identičnim koncentracijama. Takođe, pH vrednost i osmolalitet rastvora veštačkih suza isti su kao u slučaju humanih suza (7,4; 300 mOsm). Iz navedenih razloga, upotreba standardnog rastvora veštačkih suza kao surogat matriksa u potpunosti se smatra opravdanom.

Prvi parametar validacije koji je testiran prema postupku opisanom u poglavlju 3.9.3. bila je selektivnost. Kako je utvrđeno da na hromatogramu "praznog" uzorka veštačkih suza ne postoje interferirajući pikovi na retencionim vremenima koja odgovaraju olopatadinu na LLOQ nivou i internom standardu, dokazano je da je HILIC metoda sa MS/MS detekcijom selektivna. Karakteristični MRM hromatogrami "praznog" matriksa i smeše olopatadina i internog standarda u matriksu prikazani su na slici 21. Korišćenje jednog izvora matriksa za potvrđivanje selektivnosti smatra se odgovarajućim s obzirom na to da suze ne predstavljaju previše kompleksan biološki materijal, da je razvijena bioanalitička metoda veoma osetljiva, kao i da analit ima relativno malu molekulsku masu.



Slika 21. Reprezentativni MRM hromatogrami

- A) "prazan" uzorak veštačkih suza
 B) uzorak veštačkih suza "opterećen" olopatadin-hidrohloridom ($0,1 \text{ ng mL}^{-1}$)
 C) uzorak veštačkih suza "opterećen" internim standardom (5 ng mL^{-1})

Zatim je procenjena osetljivost metode izračunavanjem S/N odnosa na način opisan u poglavlju 3.9.4. LLOQ je definisan kao najmanja koncentracija sa S/N odnosom većim od 10 i RSD vrednošću od 17% za pet replikacija. Eksperimentalno određen LLOQ iznosi $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$. Na osnovu prikazane izuzetno male LLOQ vrednosti, potvrđena je velika osetljivost HILIC metode sa MS/MS detekcijom koja je od velikog naučnog značaja u bioanalitici. Takođe, najmanja koncentracija sa odgovorom olopatadina koji je najmanje tri puta veći od šuma bazne linije uzeta je kao LOD i njena vrednost iznosi 50 pg mL^{-1} .

Linearnost predložene metode ispitana je u širokom opsegu koncentracija olopatadin-hidrohlorida od $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$ do 100 ng mL^{-1} prema prethodno opisanoj proceduri (poglavlje 3.9.5.). Odabrani interval linearnosti uključio je terapijske opsege ispitivanog leka i stoga bi se mogao primeniti za praćenje njegove koncentracije i sprovođenje farmakokinetičkih studija. Kao matematički model upotrebljena je linearna regresija, koja je na najjednostavniji način adekvatno opisala zavisnost eksperimentalnih vrednosti odgovora (odnos površina pikova olopatadina i internog standarda) od poznate koncentracije ispitivanog analita.

S obzirom na to da je u bioanalitici kalibracionom krivom najčešće obuhvaćen opseg od nekoliko redova veličine, apsolutna varijabilnost za velike koncentracije je veća. Zbog toga, postoji verovatnoća da male koncentracije sa kalibracione krive budu procenjene ispod pravih vrednosti. Kao rezultat toga, u delu kalibracione krive sa manjim koncentracijama mogu se javiti prekomerne greške [67,68]. Iz navedenog razloga, iako u smernicama za validaciju nije navedeno, smatralo se da je potrebno ispitati homoskedastičnost kalibracione krive pomoću *F*-testa kako bi se utvrdilo da li postoji statistički značajna razlika između varijanse na početku i kraju krive. Rezultati *F*-testa predstavljeni su u tabeli 16.

Tabela 16. Rezultati F -testa za procenu homoskedastičnosti kalibracione krive

<i>Statistički parametar</i>	<i>Standard₁</i> <i>[0,1 ng mL⁻¹]</i>	<i>Standard₈</i> <i>[100 ng mL⁻¹]</i>
<i>Odgovor</i> ($n = 3$)	0,028	7,993
<i>Standardna devijacija</i> (Sd)	0,001	0,003
<i>Varijansa</i> (Sd^2)	$5 \cdot 10^{-7}$	$1,8 \cdot 10^{-5}$
<i>F_{izračunato}</i> (Sd_8^2 / Sd_1^2)	685,765 · 10 ⁴	
<i>F_{tabelarno}</i> (df_1^* ; df_2^{**} ; $\alpha = 0,05$)	18,513	

* $df_1 = m - 1$; m – broj grupa

** $df_2 = n - m$

Kako je izračunata F vrednost veća od tabelarne F vrednosti, nulta hipoteza je odbijena i zaključeno je da distribucija varijansi nije homogena, odnosno da su podaci heteroskedastični.

U narednom koraku, izvršeno je tzv. "vaganje" podataka inverzno koncentraciji u cilju kompenzacije nastale greške i postizanja boljeg uklapanja eksperimentalnih rezultata. Pomoću svakog od ispitivanih težinskih faktora ($1/x$, $1/x^2$, $1/y$ i $1/y^2$) kreirana je korigovana kriva metodom najmanjih kvadrata koja je zatim upotrebljena za izračunavanje RE vrednosti za svaki standard za procenu linearnosti, primenom sledeće jednačine:

$$RE = (C_{izračunato} - C_{nominalno}) \times 100 / C_{nominalno} \quad (11)$$

Efikasnost različitih težinskih faktora procenjena je na osnovu sume apsolutnih RE vrednosti, a za najbolji težinski faktor odabran je onaj koji je pokazao najmanju procentualnu vrednost sume RE (tabela 17).

Tabela 17. Izbor odgovarajućeg težinskog faktora

		<i>Standard₁</i>	<i>Standard₂</i>	<i>Standard₃</i>	<i>Standard₄</i>	<i>Standard₅</i>	<i>Standard₆</i>	<i>Standard₇</i>	<i>Standard₈</i>	
Težinski faktor	<i>1/x</i>	<i>C_{izračunato}</i>	0,085	1,760	4,724	9,706	25,936	52,201	80,033	102,765
		<i>C_{nominalno}</i>	0,1	2	5	10	25	50	75	100
		<i>RE [%]</i>	-14,9	-12,0	-5,5	-2,9	3,7	4,4	6,7	2,8
		<i>Abs RE [%]</i>	14,9	12,0	5,5	2,9	3,7	4,4	6,7	2,8
				<i>ΣRE [%] = 52,6</i>					<i>R² = 0,9909</i>	
	<i>1/x²</i>	<i>C_{izračunato}</i>	0,079	1,418	3,946	8,491	26,949	54,308	84,563	106,869
		<i>C_{nominalno}</i>	0,1	2	5	10	25	50	75	100
		<i>RE [%]</i>	-21,0	-29,1	-21,1	-15,1	7,8	8,6	12,7	6,9
		<i>Abs RE [%]</i>	21,0	29,1	21,1	15,1	7,8	8,6	12,7	6,9
				<i>ΣRE [%] = 122,3</i>					<i>R² = 0,9784</i>	
	<i>1/y</i>	<i>C_{izračunato}</i>	0,074	1,649	3,930	8,932	26,210	53,034	82,034	103,644
		<i>C_{nominalno}</i>	0,1	2	5	10	25	50	75	100
		<i>RE [%]</i>	-26,0	-17,6	-21,4	-10,7	4,8	6,1	9,4	3,6
		<i>Abs RE [%]</i>	26,0	17,6	21,4	10,7	4,8	6,1	9,4	3,6
				<i>ΣRE [%] = 99,6</i>					<i>R² = 0,9896</i>	
	<i>1/y²</i>	<i>C_{izračunato}</i>	0,078	1,512	4,118	8,866	26,195	52,288	80,355	111,653
		<i>C_{nominalno}</i>	0,1	2	5	10	25	50	75	100
		<i>RE [%]</i>	-22,0	-24,4	-17,6	-11,3	4,8	4,6	7,1	11,6
		<i>Abs RE [%]</i>	22,0	24,4	17,6	11,3	4,8	4,6	7,1	11,6
				<i>ΣRE [%] = 105,1</i>					<i>R² = 0,9740</i>	
<i>Nekorigovano</i>	<i>C_{izračunato}</i>	0,016	1,119	3,773	8,332	28,151	55,743	88,347	99,421	
	<i>C_{nominalno}</i>	0,1	2	5	10	25	50	75	100	
	<i>RE [%]</i>	-84,0	-44,1	-24,5	-16,7	12,6	11,5	17,8	-0,6	
	<i>Abs RE [%]</i>	84,0	44,1	24,5	16,7	12,6	11,5	17,8	0,6	
			<i>ΣRE [%] = 211,8</i>					<i>R² = 0,9914</i>		

Kao najadekvatniji težinski faktor definisan je $1/x$ jer u poređenju s drugim težinskim faktorima, kao i nekorigovanom linearnom regresijom, daje najmanju sumu apsolutnih RE vrednosti. Značajni statistički parametri za jednačinu kalibracione krive dati su u tabeli 18.

Tabela 18. Rezultati za korigovanu regresionu analizu razvijene HILIC metode sa MS/MS detekcijom

<i>Parametar</i>	<i>Olopatadin-hidrohlorid</i>
<i>Opseg koncentracija [ng mL⁻¹]</i>	0,1 – 100
<i>y = ax + b</i>	0,0776x + 0,0184
<i>r</i>	0,9954
<i>S_a</i>	0,0031
<i>S_b</i>	0,0152
<i>p_b</i>	0,2687
<i>t_b</i>	1,2214

a – nagib kalibracione krive; *b* – odsečak na *y* osi; *r* – koeficijent korelacije; *S_a* – standardna devijacija nagiba prave; *S_b* – standardna devijacija odsečka na ordinati; *p_b* – *p*-vrednost odsečka; *t_b* – *t*-vrednost odsečka; *t_{tab}* = 2,306 (n = 8; $\alpha = 0,05$)

Dobijena vrednost koeficijenta korelacije je veća od 0,99. Zatim, na osnovu vrednosti statističkog parametra *t_b* koja je manja od tabelarne vrednosti, potvrđeno je da odsečak na ordinati ne odstupa značajno od nule. Standard za procenu linearnosti na LLOQ nivou poseduje RSD vrednost 17,3% u odnosu na nominalnu koncentraciju, dok ostali standardi za procenu linearnosti imaju sledeće RSD vrednosti: 5,1% (2 ng mL⁻¹); 3,8% (5 ng mL⁻¹); 7,6% (10 ng mL⁻¹); 4,9% (25 ng mL⁻¹); 5,3% (50 ng mL⁻¹); 2,5% (75 ng mL⁻¹) i 6,2% (100 ng mL⁻¹). Na taj način, svi standardi za procenu linearnosti metode ispunjavaju unapred definisane kriterijume prihvatljivosti (odstupanje $\pm 15\%$ u odnosu na nominalnu koncentraciju, izuzev za LLOQ gde je dozvoljeno odstupanje od 20% u odnosu na nominalnu vrednost) [65,66].

Preciznost i tačnost bioanalitičke metode analizirani su korišćenjem QC uzoraka u tri različite koncentracije olopatadin-hidrohlorida u okviru intervala linearnosti (LLOQ, koncentracija sa sredine kalibracione krive i koncentracija koja iznosi 75% ULOQ), koji su pripremljeni na način opisan u poglavlju 3.9.6. Izračunate srednje RSD vrednosti za *intra-day* i *inter-day* preciznost su 5,1%, odnosno 8,6% (tabela 19).

Dobijene *bias* vrednosti su u opsegu od 7,1% do 12,8% za tačnost određenu u toku jednog dana, a u opsegu od -3,8% do 9,8% za tačnost procenjenu u toku tri uzastopna dana (tabela 19). Kako su svi prikazani rezultati u okviru prihvatljivih limita ($\pm 15\%$ u odnosu na pravu vrednost, osim za LLOQ gde je dozvoljeno odstupanje od 20%) [65,66], pokazane su zadovoljavajuća ponovljivost i tačnost postavljene HILIC metode sa tandem masenom detekcijom za određivanje olopatadina u uzorcima humanih suza.

Sledeći testirani parametar validacije bio je prinos ekstrakcije, koji je procenjen pomoću QC uzoraka na tri nivoa koncentracija za olopatadin-hidrohlorid, na način opisan u poglavlju 3.9.7. Dobijene *Recovery* vrednosti su u opsegu od 69,3% do 73,4% (tabela 19). Na osnovu prikazanih RSD vrednosti potvrđeno je da je prinos ekstrakcije analita precizan, reproduktivan i nezavisan od koncentracije.

Efekat matriksa je esencijalan parametar validacije koji je specifičan za MS i predstavlja uticaj svih endogenih i egzogenih komponenti prisutnih u matriksu na određivanje analita. Određen je metodom dodatka rastvora standarda nakon procedure ekstrakcije, prema postupku opisanom u poglavlju 3.9.8. Izračunate MF vrednosti olopatadina su u rasponu od 0,91 do 0,98, dok MF internog standarda iznosi 0,97. Dobijena vrednost normalizovanog MF je 0,98. Dalje, varijabilnost MF izražena je RSD vrednostima koje ispunjavaju maksimalno prihvatljiv kriterijum od $\pm 15\%$ [65] (tabela 19). Predstavljeni podaci pokazuju da je uticaj koeluirajućih komponenata iz matriksa suza (proteini, glikoproteini, lipidi, ugljeni hidrati, neorganski joni) na efikasnost jonizacije olopatadina (pojačanje ili supresija) i njegov intenzitet signala zamenaerljiv i bez značaja. Ovakav zaključak je i očekivan s obzirom na to da su optimiziranom metodom pripreme uzorka, odnosno precipitacijom proteina pomoću acetonitrila dobijeni čisti ekstrakti sa velikim prinosom ekstrahovanog analita. Takođe, primena internog standarda sličnog retencionog ponašanja kao i olopatadin verovatno je doprinela postizanju željene eliminacije efekta matriksa. Minimizacija uticaja matriksa omogućena je i zahvaljujući upotrebi HILIC mobilne faze sa velikim udelom organskog rastvarača, koja je zbog manje viskoznosti olakšala evaporaciju i jonizaciju analita i internog standarda, odnosno povećala efikasnost ESI jonizacije.

Sledeći procenjeni parametar validacije bio je efekat prenošenja. Injektovanjem čistog rastvarača nakon analize standarda za procenu linearnosti najveće koncentracije nije detektovan ni odgovor olopatadina ni odgovor internog standarda. Na taj način, pokazano je odsustvo odgovora analita i internog standarda eventualno prisutnih iz prethodnog injektovanja i potvrđeno da tzv. *carryover* efekat nema bitan uticaj na pouzdanost rezultata dobijenih predloženom HILIC–MS/MS metodom.

Konačno, obim validacije obuhvatio je i procenu stabilnosti olopatadina u biološkom materijalu pod različitim uslovima čuvanja koji su reflektovali sve stvarne situacije koje su se eventualno mogle sresti u toku izvođenja metode, odnosno tokom uzorkovanja, manipulacije, skladištenja i ispitivanja uzoraka suza. Studije stabilnosti sprovedene su na način opisan u poglavlju 3.9.10, a rezultati dobijeni poređenjem površina pikova QC uzoraka nakon tretiranja definisanim uslovima i sveže pripremljenih QC uzoraka istih koncentracija olopatadina prikazani su u tabeli 19. Kako su koncentracije analita u uzorcima za testiranje kratkoročne stabilnosti u dozvoljenom opsegu odstupanja od 15% [65,66], pokazana je stabilnost analita u biološkom materijalu na temperaturi od 25°C za odabrani period od jedan dan, koji je odgovarao maksimalno očekivanom intervalu u kom bi se uzorci suza mogli naći na sobnoj temperaturi tokom njihove pripreme. Najveće odstupanje koncentracije olopatadina tokom izvođenja dugoročne stabilnosti je 9,1%. Na ovaj način, potvrđena je stabilnost analita nakon izlaganja temperaturi od –80°C u toku 30 dana, odnosno u periodu od dana uzorkovanja do dana čuvanja poslednjeg uzorka humanih suza u zamrzavaču. Na osnovu dobijenih rezultata od 99,8% do 102,7% nije dokazana značajna degradacija olopatadina ni nakon tri ciklusa manipulacije uzorcima sa sobne na željenu temperaturu (–80°C). Praćenjem stabilnosti olopatadina u suzama pod različitim realnim uslovima čuvanja dobijeni su naučno značajni podaci s obzirom na to da pregledom literature nije uočeno ispitivanje njegove stabilnosti u ovom biološkom materijalu.

Tabela 19. Parametri validacije predložene HILIC–ESI/MS/MS metode

Parametar	Koncentracija olopatadin-hidrohlorida [$\mu\text{g mL}^{-1}$]		
	0,1	25	75
<i>Intra-day tačnost</i>			
<i>bias</i> [%]	12,8	11,3	7,1
<i>Inter-day tačnost</i>			
<i>bias</i> [%]	9,8	9,3	–3,8
<i>Intra-day preciznost</i>			
RSD [%]	6,5	4,3	4,4
<i>Inter-day preciznost</i>			
RSD [%]	10,9	8,5	6,3
<i>Prinos ekstrakcije</i>			
<i>Recovery</i> [%]	73,1	69,3	73,4
<i>Recovery</i> [% RSD]	8,5	5,6	5,1
<i>Efekat matriksa</i>			
MF	0,91	0,98	0,95
MF [% RSD]	7,6	4,9	3,4
<i>Kratkoročna stabilnost</i>			
[%]	96,8	95,2	98,4
<i>Dugoročna stabilnost</i>			
[%]	90,9	91,6	94,3
<i>Stabilnost u toku zamrzavanja/odmrzavanja</i>			
[%]	102,7	100,6	99,8

Bitan naučni doprinos u bioanalitici olopatadina zasnovan je na činjenici da postavljena HILIC metoda sa MS/MS detekcijom predstavlja prvu vrstu istraživanja koja je pogodna za izuzetno osetljivu, pouzdanu i brzu analizu olopatadina u ograničenim zapreminama humanih suza. Sticanje naučno relevantnih podataka postignuto je potvrđivanjem kompatibilnosti inovativne HILIC separacione tehnike sa osetljivim masenim detektorom, kao i primenom unapređenog hemometrijskog pristupa u fazi karakterizacije retencionog ponašanja olopatadina u HILIC-UHPLC sistemu i izbora optimalnih uslova razdvajanja.

4.4. Primena razvijene HILIC–ESI/MS/MS metode u farmakokinetičkoj studiji za praćenje nivoa olopatadina u humanim suzama

Predmet naučnog istraživanja poslednjeg dela doktorske disertacije bio je da se ispita mogućnost primene optimizirane i validirane HILIC metode sa MS/MS detekcijom za praćenje malih koncentracija olopatadina u uzorcima humanih suza, koji su dobijeni od ambulantnih pacijenata obolelih od alergijskog konjuktivitisa nakon aplikacije komercijalno dostupnih kapi za oči koje sadrže olopatadin-hidrohlorid u koncentraciji od 1 mg mL^{-1} . Detaljno planirana prospektivna farmakokinetička studija odobrena je od strane Etičkog komiteta *Kliničkog centra Srbije*. Kao tehnika izbora za uzorkovanje humanih suza odabrana je indirektna metoda pomoću Širmerovih test traka, kojom je na neinvanzivan način omogućeno prikupljanje dovoljne zapremine uzoraka suza. Za procenu okularne farmakokinetike korišćen je jednostavan linearni model koji je na odgovarajući način opisao zavisnost izmerene koncentracije analita od vremena uzorkovanja. Veoma osetljiva i selektivna HILIC–ESI/MS/MS metoda pokazala se efikasnom za brzo i pouzdano određivanje nivoa olopatadina u malim zapreminama humanih suza ($30 \text{ }\mu\text{L}$) za vreme kliničke upotrebe, kao i za detaljno ispitivanje i karakterizaciju njegovog farmakokinetičkog ponašanja u oku. Kako do sada nije istraživan u humanim suzama, stečeni su naučno značajni podaci za okularnu farmakokinetiku ispitivanog leka pomoću kojih je potvrđena adekvatnost njegovog predloženog načina doziranja, kao i terapijska efikasnost i bezbednost.

4.4.1. Organizacija kliničkog ispitivanja za analizu olopatadina u humanim suzama

Topikalno aplikovani oftalmološki lekovi pokazuju relativno malu lokalnu bioraspoloživost u oku zbog njihovog ispiranja suznom tečnošću usled refleksnog suzenja, zatim brzu eliminaciju iz tkivnih struktura oka, kao i nezanemarljivu apsorpciju u sistemske cirkulaciju i vezivanje za proteine suza [98–102]. Iz navedenih razloga, smatra se da je, u cilju procene i poboljšanja kliničke efikasnosti lokalno primenjenog olopatadina u obliku kapi za oči, značajno pratiti njegovu koncentraciju u suzama.

Kako je zapremina uzoraka suza ograničena, neophodno je bilo implementirati osetljivu i pouzdanu bioanalitičku tehniku za merenje veoma malih nivoa analita u ovom biološkom materijalu. Razvijena HILIC metoda sa MS/MS detekcijom, koja je detaljno opisana u poglavlju 4.3, poseduje brojne prednosti u pogledu osetljivosti sa LLOQ vrednošću od $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$, selektivnosti, tačnosti, preciznosti, kao i jednostavne i brze pripreme uzoraka suza. Takođe, kako je vreme trajanja analize samo 2 min, postavljena metoda smatrala se pogodnom za ispitivanje velikog broja kliničkih uzoraka biološkog materijala u toku jednog dana. S obzirom na to da zahteva male zapremine uzoraka suza i obuhvata terapijski opseg ispitivanog leka, pošlo se od toga da se HILIC–ESI/MS/MS metoda može uspešno upotrebiti za evaluaciju farmakokinetičkog profila olopatadina u oku i njegove kliničke efikasnosti.

Cilj ovog dela naučnog istraživanja bio je da se sprovede prospektivna farmakokinetička studija za određivanje olopatadina u suzama, u koju će biti uključeno 30 ambulantnih pacijenata *Klinike za očne bolesti Kliničkog centra Srbije* sa alergijskim konjuktivitisom. Detaljno planirano kliničko ispitivanje odobreno je od strane Etičkog komiteta *Kliničkog centra Srbije* i opisano u poglavlju 3.10. Učesnici studije bili su pacijenti dobrovoljci oba pola i različite životne dobi, telesne mase i visine. Svi ispitanici bili su na monoterapiji olopatadinom i nisu koristili kontaktna sočiva tokom izvođenja studije.

Kako način sakupljanja suza može imati veliki uticaj na pouzdanost bioanalitičkih rezultata, posvećena je posebna pažnja prilikom izbora optimalne tehnike uzorkovanja. Postavljeni kriterijum bio je da se definiše postupak uzorkovanja koji će biti bezbedan i komforan za pacijenta i istovremeno obezbediti dovoljnu zapreminu uzoraka biološkog materijala. U tom cilju, u razmatranje su uzeti direktan način prikupljanja suza primenom staklenih mikropilarnih cevčica i indirektni načini pomoću hiruških celuloznih sunđerica i Širmerovih test traka. S obzirom na to da direktna tehnika uzorkovanja refleksnih suza podrazumeva prethodnu stimulaciju sekrecije hemijskim ili fizičkim putem koja može biti neprijantna za pacijenta, kao i da je sakupljena zapremina uzoraka uglavnom prilično mala, ova metoda nije se smatrala adekvatnom u konkretnom slučaju.

S druge strane, na osnovu literaturnih podataka zapaženo je da indirektna tehnika uzorkovanja nisu invanzivne za pacijenta i ne izazivaju iritaciju oka, kao i da se njima može dobiti zadovoljavajuća zapremina uzoraka suza bez prethodne stimulacije. Odlučeno je da se kao najpogodnija tehnika za validno i efikasno prikupljanje bazalnih suza tokom izvođenja kliničke studije izabere indirektna metoda pomoću sterilnih Širmerovih celuloznih test traka za jednokratnu upotrebu. Prednosti ovog pristupa, u odnosu na uzorkovanje suza hiruškim sunđerima, ogledale su se u činjenici da je jednostavan, brz, precizan i da omogućava dobijanje veće zapremine uzoraka suza.

Nakon opredeljivanja za određenu metodu uzorkovanja, pristupilo se standardizaciji vremena sakupljanja uzoraka suza. Zaključeno je da optimalno vreme kontakta Širmerove test trake sa suznim filmom, u okviru koga će se dobiti zadovoljavajuća zapremina uzorka, iznosi 5 min. Takođe, definisano je pet vremenskih intervala u kojima će se vršiti uzorkovanje nakon lokalne aplikacije pojedinačne doze kapi za oči koje sadrže olopatadin-hidrohlorid u koncentraciji od 1 mg mL⁻¹. Uzorke suza bilo je pogodno uzimati 0,25 h; 0,5 h; 1 h; 2 h i 8 h nakon aplikovanja po jedne kapi komercijalno dostupnog oftalmološkog rastvora olopatadina u konjunktivalnu vrećicu oba oka ispitanika. Kako je preporučeni režim doziranja formulacije dva puta dnevno u minimalnom razmaku od 8 h, poslednji uzorak sakupljan je nakon 8 h od trenutka aplikacije leka.

Imajući u vidu fizičko-hemijske osobine i stabilnost olopatadina, kao i prirodu biološkog materijala, određeni su pogodni kontejneri za skladištenje uzoraka i temperatura na kojoj će se uzorci čuvati do momenta izvođenja kvantitativne analize. Nakon temperiranja na sobnu temperaturu, uzorci humanih suza pripremani su primenom optimiziranog postupka ekstrakcije na način predstavljen u poglavlju 3.7.2. Konačno, klinički uzorci suza analizirani su postavljenom HILIC metodom sa MS/MS detekcijom.

4.4.2. Rezultati kliničkog ispitivanja za merenje olopatadina u humanim suzama

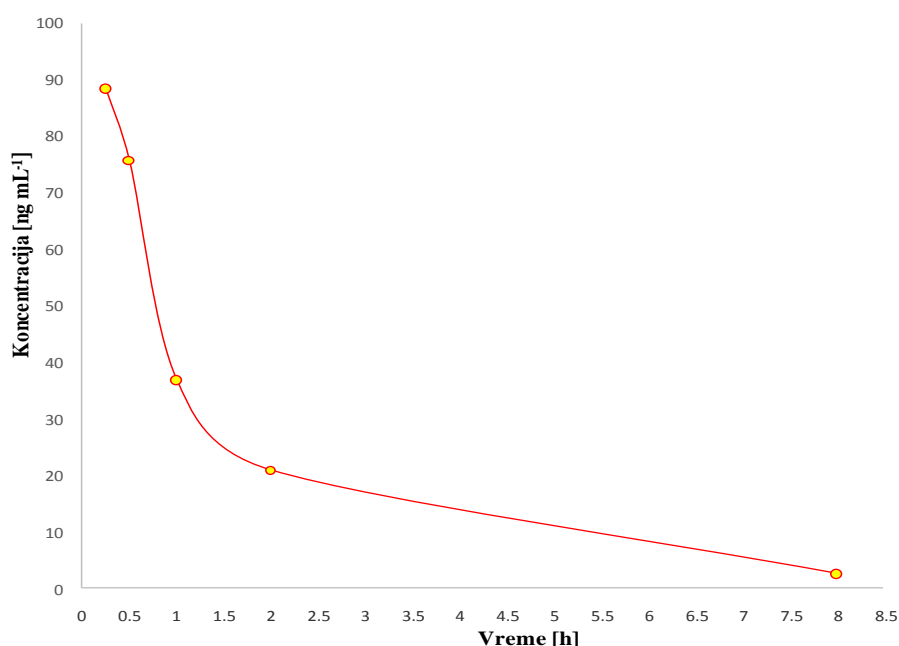
U cilju potvrđivanja primenljivosti razvijene HILIC metode sa MS/MS detekcijom za praćenje olopatadina u humanim suzama, sticanja boljeg uvida u njegovu okularnu farmakokinetiku i optimizacije njegove terapijske efikasnosti, u poslednjem koraku naučnog istraživanja izvršena je kvantitativna analiza uzoraka suza dobijenih od učesnika kliničke studije.

Nakon ispitivanja uzoraka humanih suza primenom HILIC–ESI/MS/MS metode, pristupilo se izračunavanju koncentracija olopatadin-hidrohlorida iz parametara jednačine kalibracione krive, dobijene tokom procene linearnosti. Dobijeni nivoi olopatadin-hidrohlorida u svim uzorcima suza nakon bilateralne aplikacije pojedinačne doze *Pana*[®] oftalmološkog rastvora, kao i značajni demografski podaci za svakog učesnika farmakokinetičke studije, prikazani su u tabeli 20.

Tabela 20. Demografski podaci i pojedinačne koncentracije olopatadina dobijene za 30 pacijenata u definisanim vremenskim intervalima uzorkovanja

Demografski podaci za svakog pacijenta				Vremenski intervali uzorkovanja [h]										
				0,25	0,5	1	2	8	0,25	0,5	1	2	8	
Šifra	Pol	Uzrast [godine]	Telesna masa [kg]	Koncentracija olopatadina u desnom oku [ng mL ⁻¹]					Koncentracija olopatadina u levom oku [ng mL ⁻¹]					
U01	M	41	91	90,13	75,81	36,08	18,09	2,18	87,15	71,50	35,19	19,01	2,35	
U02	Ž	50	70	96,01	76,58	37,83	19,99	1,80	93,52	80,34	40,40	20,24	2,19	
U03	Ž	54	81	80,96	66,01	31,55	16,41	3,01	77,12	67,58	34,09	18,65	2,06	
U04	M	26	85	77,28	67,81	32,08	18,99	2,15	74,24	70,05	35,84	24,69	2,73	
U05	Ž	24	55	91,22	78,02	38,56	21,16	3,10	92,68	79,44	41,03	23,45	2,53	
U06	Ž	20	63	88,46	77,81	38,14	21,55	2,58	82,99	76,99	35,62	20,04	2,07	
U07	M	30	93	85,15	73,81	36,52	20,36	2,55	88,45	79,08	37,71	21,98	2,23	
U08	M	34	108	80,93	69,56	30,98	16,23	1,75	86,93	77,05	35,32	18,23	1,94	
U09	M	38	120	90,76	77,83	36,08	21,44	2,18	82,67	73,46	38,79	27,64	2,92	
U10	Ž	43	75	91,23	78,88	39,77	23,85	3,02	90,03	78,99	41,37	23,47	2,33	
U11	Ž	55	96	85,66	73,12	36,47	21,36	2,88	87,18	77,53	39,40	20,65	2,04	
U12	Ž	58	63	84,98	73,23	35,01	19,77	2,47	82,39	74,20	33,14	20,35	1,96	
U13	M	28	78	90,15	79,90	37,05	22,38	2,86	87,25	76,31	35,03	20,68	2,00	
U14	M	19	90	88,47	75,52	38,49	21,79	2,58	91,44	74,26	34,06	20,01	1,91	
U15	Ž	23	53	97,14	80,44	38,69	22,12	2,98	92,63	83,13	40,23	22,55	2,22	
U16	M	59	100	87,58	71,31	34,28	20,03	2,68	83,50	68,37	31,17	19,32	1,34	
U17	M	46	84	95,69	85,77	43,26	25,75	2,20	96,09	86,05	41,06	22,66	2,78	
U18	M	23	80	90,87	78,88	37,75	21,02	2,45	88,14	73,61	32,55	19,42	2,30	
U19	Ž	39	73	84,17	70,03	35,03	20,02	2,67	89,67	75,08	35,14	18,38	1,93	
U20	Ž	40	70	95,30	84,65	41,16	24,49	3,34	95,34	83,93	40,73	21,39	2,77	
U21	M	54	96	93,13	79,11	40,22	22,57	3,39	96,71	82,88	40,28	22,81	2,89	
U22	Ž	21	51	97,74	80,29	40,78	24,65	3,12	91,42	74,24	38,08	20,64	2,86	
U23	Ž	46	81	94,45	80,55	42,52	25,41	3,66	93,45	76,85	36,11	20,65	2,23	
U24	M	56	84	87,18	73,85	36,33	18,38	2,55	85,82	70,43	34,98	18,77	2,43	
U25	M	40	106	84,55	72,22	35,88	19,23	2,81	85,50	73,27	35,74	20,79	2,86	
U26	M	39	99	91,74	75,54	37,45	21,35	3,64	93,06	81,86	40,66	25,04	3,71	
U27	Ž	33	75	88,02	74,16	36,62	21,79	3,73	83,72	70,05	32,37	20,67	2,35	
U28	Ž	30	67	81,69	68,67	34,05	19,37	2,77	83,89	70,60	32,85	19,02	2,84	
U29	Ž	58	85	83,33	70,99	35,05	19,62	2,60	84,13	71,15	33,63	16,99	2,35	
U30	Ž	48	69	90,23	76,52	37,07	20,16	2,13	87,20	73,45	38,52	17,76	1,96	
				<i>X_{sr}</i> [ng mL ⁻¹]	88,81	75,56	37,02	20,98	2,73	87,81	75,72	36,80	20,80	2,37
				<i>Sd</i>	5,23	4,79	2,94	2,35	0,52	5,36	4,87	3,04	2,45	0,46
				<i>RSD</i> [%]	5,89	6,34	7,94	11,20	19,05	6,10	6,43	8,26	11,73	19,41

Na osnovu izračunatih RSD vrednosti prikazanih u tabeli 20, koje su u svim specificiranim vremenima uzorkovanja vrlo bliske, zaključeno je da ne postoje značajne razlike u koncentracijama olopatadin-hidrohlorida izmerenim u levom i desnom oku svakog pacijenta. Zatim je konstruisana kriva $c = f(t)$, koja prikazuje zavisnost srednjih vrednosti izmerenih koncentracija olopatadin-hidrohlorida u oba oka ispitanika u funkciji vremenskih intervala uzorkovanja suza (slika 22).



Slika 22. Kriva $c = f(t)$ nakon aplikacije 0,1% m/v olopatadin-hidrohlوريد oftalmološkog rastvora. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost \pm Sd (n = 60)*

*Maksić J, Stajić A, Knežević M, Dačić Krnjaja B, Jančić–Stojanović B, Medenica M. Determination of olopatadine in human tears by HILIC–MS/MS method. *Bioanalysis*. 2017; 9 (24): 1943–54.

Kao što se može uvideti posmatranjem $c-t$ krive, koncentracije olopatadin-hidrohlorida u uzorcima suza su veće od LLOQ vrednosti ($0,1 \text{ ng mL}^{-1}$) tokom 8 h njihovog praćenja. Na taj način, sticanjem uvida u dužinu prisustva ispitivanog leka u očnoj vodici, pokazano je da je frekvencija doziranja od dva puta dnevno u minimalnom razmaku od 8 h optimalna. Dodatno, nivoi olopatadin-hidrohlorida smanjuju se na monoeksponencijalan način u funkciji vremena.

Maksimalna koncentracija (c_{max}) i minimalna koncentracija (c_{min}) olopatadin-hidrohlorida u humanim suzama, kao i vremena u kojima su date koncentracije postignute (t_{max} i t_{min}), određeni su direktno iz podataka sa $c-t$ grafika. Naime, $c_{max} = 88,31 \pm 5,27$ ng mL⁻¹ dostignuta je 15 min. nakon aplikacije kapi za oči (t_{max}). $c_{min} = 2,55 \pm 0,51$ ng mL⁻¹ dobijena je 8 h nakon primene pojedinačne doze oftalmološkog rastvora (t_{min}).

Imajući u vidu prirodu dobijenih podataka, u sledećoj fazi istraživanja primenjena je prostorna, odnosno model zavisna farmakokinetička analiza. Prikazana $c-t$ kriva u potpunosti odgovara jednodimenzionalnom farmakokinetičkom modelu. Na taj način, suzni film okarakterisan je kao prostor koji u kinetičkom smislu predstavlja jedinstvenu i homogenu celinu. Upotreba modela od jednog prostora podrazumeva da se faza eliminacije olopatadina iz oka odigrava reakcijom prvog reda, odnosno da je brzina eliminacije proporcionalna njegovoj koncentraciji u datom trenutku, kao i da je njegova raspodela između tkiva oka trenutna. Ovaj linearni proces može se prikazati sledećom jednačinom [103]:

$$dc/dt = -\beta \times c \quad (12)$$

gde je dc/dt – brzina eliminacije, β – konstanta brzine eliminacije, a c – koncentracija leka u predloženom prostoru.

Određivanje okularnih farmakokinetičkih parametara (konstanta brzine eliminacije, poluvreme eliminacije, srednje vreme zadržavanja i ukupni klirens) predstavlja ozbiljan zadatak zbog kompleksne anatomije i dinamičkih fizioloških barijera u oku [104]. Upotrebljeni jednostavni matematički model prvog reda omogućio je precizno izvođenje značajnih farmakokinetičkih parametara pomoću kojih je detaljno proučeno ponašanje i "sudbina" olopatadina u tkivu oka u funkciji vremena.

Konstanta brzine eliminacije (β) predstavlja ukupnu konstantu brzine prvog reda za proces kojim se olopatadin uklanja iz oka izlučivanjem i metabolizmom. [104]. Određena je grafičkom metodom iz nagiba prave $\ln c = f(t)$.

Poluvreme eliminacije ($t_{1/2}$) definisano je kao vreme koje je potrebno da se koncentracija olopatadina smanji na polovinu svoje početne koncentracije tokom procesa eliminacije. Izračunava se iz dobijene vrednosti konstante brzine eliminacije β iz sledeće jednačine [105]:

$$t_{1/2} = 0,693/\beta \quad (13)$$

Srednje vreme zadržavanja (eng. *Mean Residence Time* – MRT) podrazumeva vremenski interval za koji se 63,2% primenjene doze kapi za oči olopatadina eliminiše iz oka i procenjuje se iz sledećeg izraza [105]:

$$MRT = 1,44 \times t_{1/2} \quad (14)$$

Totalni klirens (eng. *Clearance* – CL) predstavlja direktnu meru eliminacije olopatadina iz oka i izračunava se iz sledeće jednačine [105]:

$$CL = \beta \times V_d \quad (15)$$

gde je V_d – volumen distribucije olopatadina, koji je procenjen iz odnosa primenjene doze kapi za oči i koncentracije olopatadina u 0-tom minutu.

Konačno, definisana je površina ispod krive od 0 do beskonačnosti (eng. *Area Under the Curve from 0 to ∞* – $AUC^{0 \rightarrow \infty}$) koja predstavlja integral koncentracije olopatadina u funkciji vremena. Ovaj parametar definiše stepen i brzinu resorpcije ispitivanog leka u oku i izračunava se metodom trapezoida iz izraza [106]:

$$AUC^{0 \rightarrow \infty} = AUC^{0 \rightarrow 8} + c_8/\beta \quad (16)$$

gde je c_8 – koncentracija olopatadina u suzama nakon 8 h od aplikacije.

Dobijene vrednosti bitnih farmakokinetičkih parametara olopatadina predstavljene su u tabeli 21.

Tabela 21. Farmakokinetički parametri olopatadina u suzama pacijenata nakon pojedinačne topikalne aplikacije *Pana*[®] kapi za oči

<i>Parametar</i>	<i>Izračunate vrednosti</i>
β [h^{-1}]	0,4323
$t_{1/2}$ [h]	1,60
<i>MRT</i> [h]	2,30
<i>CL</i> [$mL\ min^{-1}$]	2,44
$AUC^{0 \rightarrow \infty}$ [$ng\ h\ mL^{-1}$]	192,92

β – konstanta brzine eliminacije

$t_{1/2}$ – poluvreme eliminacije

MRT – srednje vreme zadržavanja

CL – ukupni klirens

$AUC^{0 \rightarrow \infty}$ – površina ispod krive od 0 to ∞

Tumačenjem prikazanih rezultata za $t_{1/2}$, *MRT* i *CL* farmakokinetičke parametre na adekvatan način je opisan proces eliminacije olopatadina iz oka. Zaključeno je da je izlučivanje olopatadina iz tkivnih struktura oka optimalno i ne previše brzo. Na taj način, dodatno je potvrđena predložena učestalost doziranja olopatadina u formulaciji kapi za oči, kao i klinička efikasnost i bezbednost preporučene doze leka. Takođe, na osnovu vrednosti $AUC^{0 \rightarrow \infty}$ parametra, pretpostavljeno je da se ispitivani lek brzo i u velikom stepenu resorbuje preko konjuktivalne membrane u tkivne strukture oka. S druge strane, resorpcija olopatadina preko konjuktivalne membrane u sistemsku cirkulaciju pokazala se zanemarljivom.

Naučni značaj ovog dela doktorske disertacije ogleda se u unapređenju do sada nedovoljno rasvetljene okularne farmakokinetike olopatadina. Pored toga, predložena je osetljiva HILIC–ESI/MS/MS metoda za praćenje nivoa olopatadina u humanim suzama, što pruža mogućnost adekvatne procene optimalnog načina doziranja oftalmoloških rastvora tokom kliničke prakse, kao i objektivnu evaluaciju terapijske efikasnosti leka.

5. ZAKLJUČAK

1. Kreirana je nova HILIC metoda sa UV detekcijom uz podršku savremenih hemometrijskih postupaka koja omogućava određivanje olopatadina, njegove nečistoće *E* izomera i konzervansa benzalkonijum-hlorida u kapima za oči. Na osnovu rezultata preliminarnih studija, odabrana je cijanopropil silikagel stacionarna faza i definisani su sledeći kvantitativni faktori sa najvećim efektom na hromatografsku analizu pomenutih jedinjenja: sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, pH vrednost vodene faze i koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi. U cilju sveobuhvatne karakterizacije retencionog ponašanja ispitivanih jedinjenja u složenom HILIC sistemu i postavljanja robusnog optimuma metode, uspostavljena je adekvatna matematička zavisnost značajnih faktora od praćenih odgovora sistema primenom *Box–Behnken* eksperimentalnog dizajna. Razmatranjem empirijskih modela i 3-D grafičkih prikaza omogućena je efikasna kvantitativna procena uticaja svih pojedinačnih istraživanih faktora i njihovih dvofaktorskih interakcija na odgovore sistema. Nakon toga, identifikovan je globalni optimum pretraživanjem čvorova mreže u okviru definisanog eksperimentalnog prostora sa ciljem postizanja maksimalnog zadržavanja olopatadina, kao i zadovoljavajućeg robusnog razdvajanja njegovih geometrijskih izomera. Konačno, predložena HILIC metoda je validirana, čime je potvrđena njena pouzdanost i podobnost za rutinsko određivanje geometrijskih izomera olopatadina i benzalkonijum-hlorida u farmaceutskoj formulaciji kapi za oči.
2. Postavljena HILIC metoda sa UV detekcijom uspešno je primenjena za praćenje procesa degradacije olopatadina pod različitim *stres* uslovima. Ovim unapređenim pristupom za detaljno ispitivanje stabilnosti olopatadina obezbeđeno je adekvatno praćenje polarnijih degradacionih proizvoda i stečena su nova znanja o njegovoj stabilnosti. Pokazano je da analit ne podleže termolizi i hidrolizi u baznoj sredini, ali da je relativno nestabilan u kiselj sredini, kao i u prisustvu velike koncentracije oksidacionog sredstva.

Takođe, definisani su parametri kinetike reakcije degradacije na osnovu kojih je omogućeno predviđanje mehanizma degradacije i pružanje dragocenih naučnih informacija o putevima razgradnje, kao i degradacionom profilu olopatadina. Zaključeno je da su kisela, bazna i oksidativna degradacija reakcije drugog reda, kao i da je razgradnja u kiseloj sredini najbrža reakcija, dok je razgradnja u baznoj sredini najsporija reakcija.

3. Povezivanjem HILIC-UHPLC sistema sa tandem masenim spektrometrom sa ESI jonskim izvorom postignut je razvoj prve veoma osetljive i selektivne metode pogodne za brzu kvalitativnu i kvantitativnu analizu olopatadina u malim zapreminama uzoraka humanih suza. Procenjen je uticaj značajnih parametara masene detekcije i određene su njihove optimalne vrednosti u cilju dobijanja maksimalnog intenziteta signala praćenih tranzicija analita i internog standarda. Primenom savremene hemometrijske strategije sprovedena je detaljna karakterizacija i predviđanje hromatografskog ponašanja olopatadina na BEH amidnoj stacionarnoj fazi. Efekti kritičnih faktora, identifikovanih u preliminarnoj fazi istraživanja (sadržaj acetonitrila u eluentu, temperatura kolone i protok eluenta), na odgovore od interesa definisani su na osnovu regresionih koeficijenata polinoma drugog stepena, koji su dobijeni pomoću *Box-Behnken* dizajna. Optimalni hromatografski uslovi, koji su obezbedili potpuno razdvajanje olopatadina od internog standarda u okviru minimalnog vremena trajanja analize, odabrani su unapređenom metodologijom pretrage čvorova mreže. Relativno jednostavna tehnika precipitacije proteina u prisustvu acetonitrila odabrana je kao adekvatan postupak pripreme uzoraka suza koji je omogućio efikasnu ekstrakciju ispitivanog leka i uklanjanje svih potencijalno interferirajućih komponenti iz matriksa. Na kraju, testiranjem selektivnosti, osetljivosti, linearnosti, tačnosti, preciznosti, efekta prenošenja, prinosa ekstrakcije, efekta matriksa, kratkoročne stabilnosti, dugoročne stabilnosti i stabilnosti u toku zamrzavanja i odmrzavanja, uspešno je validirana HILIC metoda sa MS/MS detekcijom za praćenje malih koncentracija olopatadina u humanim suzama.

4. Razvijena i validirana HILIC–ESI/MS/MS metoda primenjena je za kvantitativnu analizu uzoraka suza sakupljenih od 30 pacijenata *Klinike za očne bolesti Kliničkog centra Srbije* nakon aplikacije pojedinačne doze komercijalno dostupnih kapi za oči koje sadrže olopatadin-hidrohlid. Kao najpogodnija tehnika za validno sakupljanje humanih suza tokom izvođenja kliničke prospektivne studije izabrana je indirektna metoda pomoću Širmerovih test traka kojom je omogućeno uzorkovanje zadovoljavajuće zapremine uzoraka biološkog materijala na bezbolan i komforan način. Za određivanje okularne farmakokinetike olopatadina korišćen je jednodimenzionalni matematički model prvog reda koji adekvatno opisuje zavisnost izmerene koncentracije analita od vremenskih intervala uzorkovanja. Potvrđeno je da je postavljena HILIC metoda sa MS/MS detekcijom efikasna za brzo i pouzdano praćenje malih koncentracija olopatadina u ograničenim zapreminama humanih suza za vreme kliničke prakse, kao i za tačno predviđanje i razumevanje njegovog okularnog farmakokinetičkog profila. Stečeni naučno relevantni farmakokinetički rezultati omogućili su uvid u dužinu prisustva ispitivanog leka u očnoj vodici, kao i u proces njegove eliminacije iz tkivnih struktura oka. Na taj način, opravdana je učestalost predloženog režima doziranja 0,1% m/v oftalmološkog rastvora olopatadin-hidrohlid, kao i njegova efikasnost i bezbednost u terapiji alergijskog konjuktivitisa.

6. LITERATURA

1. Buszewski B, Noga S. Hydrophilic interaction chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Anal Bioanal Chem.* 2012; 402 (1): 231–47.
2. Olsen BA, Pack BW. *Hydrophilic Interaction Chromatography. A guide for practitioners.* New Jersey (USA): A John Wiley & Sons, Ltd; 2013.
3. Martin AJP, Synge RLM. A new form of chromatogram employing two liquid phases. *Biochem J.* 1941; 35 (12): 1358–68.
4. Alpert AJ. Hydrophilic interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J Chromatogr.* 1990; 499: 177–96.
5. Jovanović MM. Teorijska i hemometrijska analiza retencionih mehanizama odabranih lekova u tečnoj hromatografiji hidrofилnih interakcija [doktorska disertacija]. Farmaceutski fakultet: Univerzitet u Beogradu; 2014.
6. Hemstrom P, Irgum K. Hydrophilic interaction chromatography. *J Sep Sci.* 2006; 29: 1784–821.
7. Gustavsson SA, Samskog J, Markides KE, Langstrom B. Studies of signal suppression in liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry using volatile ion–pairing reagents. *J Chromatogr A.* 2001; 937: 41–7.
8. Jandera P. Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. *Anal Chim Acta.* 2011; 692 (1–2): 1–25.
9. McCalley DV. Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns a viable alternative to reversed–phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds?. *J Chromatogr A.* 2010; 1171: 46–55.

10. Dejaegher B, Mangelings D, Heyden YV. Method development for HILIC assays. *J Sep Sci.* 2008; 31 (9): 1438–48.
11. Jovanović M, Jančić–Stojanović B, Rakić T, Malenović A, Ivanović D, Medenica M. Five different columns in the analysis of basic drugs in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Cent Eur J Chem.* 2013; 11 (7): 1150–62.
12. Dejaegher B, Heyden YV. HILIC methods in pharmaceutical analysis. *J Sep Sci.* 2010; 33: 698–715.
13. Gama MR, Da Costa Silva RG, Collins CH, Bottoli CBG. Hydrophilic interaction chromatography. *Trends Anal Chem.* 2012; 37: 48–60.
14. Karatapanis AE, Fiamegos YC, Stalikas CD. A revisit to the retention mechanism of hydrophilic interaction liquid chromatography using model organic compounds. *J Chromatogr A.* 2011; 1218: 2871–9.
15. Greco G, Letzel T. Main interactions and influences of the chromatographic parameters in HILIC separations. *J Chromatogr Sci.* 2013; 51: 684–93.
16. McCalley DV. Study of the selectivity, retention mechanisms and performance of alternative silica-based stationary phases for separation of ionised solutes in hydrophilic interaction chromatography. *J Chromatogr A.* 2010; 1217: 3408–17.
17. Guo Y, Gaiki S. Retention and selectivity of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography. *J Chromatogr A.* 2011; 1218: 5920–38.
18. Jandera P. Liquid chromatography–normal phase. In: Worsfold P, Townshend A, Poole G, editors. *Encyclopedia of analytical science.* 2nd ed. Oxford (UK): Elsevier; 2005.

19. Hao Z, Xiao B, Weng N. Impact of column temperature and mobile phase components on selectivity of hydrophilic interaction chromatography. *J Sep Sci.* 2008; 31: 1449–64.
20. Haskins N. Mass spectrometry in pharmaceutical analysis. In: Lee DC, Webb ML, editors. *Pharmaceutical analysis*. 1st ed. New Jersey (USA): Wiley–Blackwell Publishing; 2003.
21. Hoffman E, Stroobant V. *Mass spectrometry: principles and application*. 3rd ed. London (UK): A John Wiley & Sons, Ltd; 2007.
22. Nguyen HP, Schug KA. The advantages of ESI–MS detection in conjunction with HILIC mode separations: fundamentals and applications. *J Sep Sci.* 2008; 31: 1465–80.
23. Hsieh Y. Potential of HILIC–MS in quantitative bioanalysis of drugs and drug metabolites. *J Sep Sci.* 2008; 31 (9): 1481–91.
24. Raju KSR, Taneja I, Singh SP, Wahajuddin: Utility of noninvasive biomatrices in pharmacokinetic studies. *Biomed Chromatogr.* 2013; 27: 1354–66.
25. Byrro AMD, Fulgencio GO, Cunha AS, Cesar IC. Determination of ofloxacin in tears by HPLC–ESI–MS/MS method: comparison of ophthalmic drug release between a new mucoadhesive chitosan films and a conventional eye drops formulation in rabbit model. *J Pharm Biomed Anal.* 2012; 70: 544–8.
26. Lam SM, Tong L, Duan X, Petznick A, Wenk, MR, Shui, G. Extensive characterization of human tear fluid collected using different techniques unravels the presence of novel lipid amphiphiles. *J Lipid Res.* 2014; 55 (2): 289–98.
27. Grus FH, Joachim SC, Pfeiffer N. Proteomics in ocular fluids: a review. *Proteomics Clin Appl.* 2007; 1: 876–88.

28. Mali N, Karpe M, Kadam V. A review on biological matrices and analytical methods used for determination of drug of abuse. *J Appl Pharm Sci.* 2011; 1 (6): 58–65.
29. Posa A, Brauer L, Schicht M, Garreis F, Beileke S, Paulsen F. Schirmer strips vs. capillary tube method: non-invasive methods of obtaining proteins from tear fluid. *Ann Anat.* 2013; 195 (2): 137–42.
30. Farias E, Yasunaga KL, Peixoto RVR, Fonseca MP, Fontes W, Galera P. Comparison of two methods of tear sampling for protein quantification by Bradford method. *Pesq Vet Bras.* 2013; 33 (2): 1–6.
31. Small D, Hevy J, Tang-Liu D. Comparison of tear sampling techniques for pharmacokinetic analysis: ofloxacin concentrations in rabbit tears after sampling with Schirmer tear strips, capillary tubes, and surgical sponges. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2009; 16 (5): 439–46.
32. Nadig DE. Preparation of drug samples for analysis. In: Ohannesian LA, Streeter AJ, editors. *Handbook of pharmaceutical analysis.* New York (USA): Marcel Dekker, Inc; 2002.
33. *The United States Pharmacopeia and the National Formulary (USP38/NF33).* Maryland (USA): Rockville; 2015.
34. *The Japanese Pharmacopoeia.* 17th ed. English version. Tokio (Japan): Pharmaceuticals and medical devices agency. Ministry of health, labour and welfare; 2016.
35. <http://www.chemaxon.com> (accessed 15 September 2016).

36. Annapurna MM, Bindu GH, Divya I. New analytical methods for the determination of olopatadine (an anti-allergic drug) in eye drops. *Drug Invent Today*. 2012; 4 (8): 441–3.
37. Annapurta MM, Bindu GH, Divya I. Derivative spectrophotometric method for the determination of olopatadine in pharmaceutical dosage form. *Drug Invent Today*. 2012; 4 (10): 540–2.
38. Mahajan A, Gandhi PS, Pandita N, Gandhi SV, Deshpande PB. Validated high performance thin layer chromatographic method for estimation of olopatadine hydrochloride as bulk drug and in ophthalmic solutions. *Int J Chem Tech Res*. 2010; 2 (3): 1372–5.
39. Varghese SJ, Kumar A, Manikanta A, Ravi TK. Stability-indicating high-performance column liquid chromatography and high performance thin-layer chromatography for the determination of olopatadine hydrochloride in tablet dosage form. *J AOAC Int*. 2011; 94 (6): 1815–20.
40. Vekaria HJ, Jat RK. HPTLC method for simultaneous estimation of montelukast and olopatadine in its combined dosage forms. *Int J Pharm Sci Res*. 2015; 6 (12): 5174–8.
41. Rele RV. Reversed phase high performance liquid chromatography method for determination of olopatadine hydrochloride from active pharmaceutical dosage form. *Pharm Lett*. 2015; 7 (1): 258–62.
42. Rao KN, Ganapaty S, Rao AL. Validated RP–HPLC method for the determination of olopatadine in bulk drug and in pharmaceutical dosage form. *Int J Pharm Chem Biol Sci*. 2012; 2 (4): 712–7.

43. Pawan KB, Deepti J. ICH guideline practice: application of novel RP–HPLC–DAD method for determination of olopatadine hydrochloride in pharmaceutical products. *J Anal Sci Technol.* 2013; 4 (12): 1–6.
44. Dey S, Reddy YV, Swetha B, Kumar SD, Murthy PN, Sahoo SK, et al. Method development and validation for the estimation of olopatadine in bulk and pharmaceutical dosage forms and its stress degradation studies using UV–VIS spectrophotometric method. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2010; 2 (14): 212–8.
45. Bhatt PD, Akhtar J. Development and validation of stability–indicating RP–HPLC method for estimation of olopatadine hydrochloride in bulk drug and its formulations. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 2011; 9 (2): 153–8.
46. Jurkić IM, Buratović M, Valentić I, Stanfel D. UHPLC study of the degradation profiles of olopatadine hydrochloride in eye drops subjected to heat and filtration method of sterilization. *Chromatographia.* 2014; 77 (15–16): 1067–80.
47. Mahajan AA, Mohanraj K, Kale S, Thaker AK. Study of olopatadine hydrochloride under ICH recommended stress conditions by LC, LC–MS/TOF for identification, and characterization of degradation products. *J Liq Chromatogr Rel Technol.* 2013; 36 (13): 1881–98.
48. Fujita K, Magara H, Kobayashi H. Determination of olopatadine, a new antiallergic agent, and its metabolites in human plasma by high–performance liquid chromatography with electro spray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1999; 731: 345–52.
49. Zhu P, Wen YG, Fan XP, Zhou ZL, Fan RX, Chen JM, et al. A rapid and sensitive liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of olopatadine concentration in human plasma. *J Anal Toxicol.* 2011; 35: 113–8.

50. Liang W, Zhou H, Liu DY, Hu P, Jiang J. Quantitative determination of olopatadine in human plasma by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chin Mass Spectrom Soc.* 2006; 4: 193–7.
51. Choi SW, Ryu JH, Park JS, Lee MJ, Yim SV, Lee KT. Development and validation for the determination of olopatadine in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: application to a bioequivalence study of Ilhwa Allotadine tablet (Olopatadine HCl 5 mg). *J Pharm Investig.* 2015; 45 (3): 285–92.
52. Koichiro F, Xiao–Pen L, Takeshi K, Junich S, Keizo S. Determination of some antiallergic drugs in human plasma by direct–injection high–performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Forensic Toxicol.* 2006; 24: 8–16.
53. Iyer GR, Cason MM, Womble SW, Li G, Chastain JE. Ocular pharmacokinetics comparison between 0,2% olopatadine and 0,77% olopatadine hydrochloride ophthalmic solutions administered to male New Zealand white rabbits. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2015; 31 (4): 204–10.
54. Tashiro M, Mochizuki H, Sakurada Y, Ishii K, Oda K, Kimura Y, et al. Brain histamine H–receptor occupancy of orally administered antihistamines measured by positron emission tomography with (11) C–doxepin in a placebo controlled crossover study design in healthy subjects: a comparison of olopatadine and ketotifen. *Br J Clin Pharmacol.* 2006; 61 (1): 16–26.
55. Mimura N, Nagata Y, Kuwabara T, Kubo N, Fuse E. P–Glycoprotein limits the brain penetration of olopatadine hydrochloride, H1–receptor antagonist. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2008; 23 (2): 106–14.
56. Ohmori K, Hayashi K, Kaise T, Ohshima E, Kobayashi S, Yamazaki T, et al. Pharmacological, pharmacokinetic and clinical properties of olopatadine hydrochloride, a new antiallergic drug. *Jpn J Pharmacol.* 2002; 88 (4): 379–97.

57. Abelson MB. A review of olopatadine for the treatment of ocular allergy. *Expert Opin Pharmacother.* 2004; 5 (9): 1979–94.
58. Ohmori K, Hasegawa K, Tamura T, Miyake K, Matsubara M, Masaki M, et al. Properties of olopatadine hydrochloride, a new antiallergic/antihistaminic drug. *Arzneimittelforschung.* 2004; 54 (12): 809–29.
59. Rosenwasser LJ, O'Brien T, Weyne J. Mast cell stabilization and anti-histamine effects of olopatadine ophthalmic solution: a review of pre-clinical and clinical research. *Curr Med Res Opin.* 2005; 21 (9): 1377–87.
60. Leonardi A, Quintieri L. Olopatadine: a drug for allergic conjunctivitis targeting the mast cell. *Expert Opin Pharmacother.* 2010; 11 (6): 969–81.
61. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore, PK. *Farmakologija.* Peto izdanje. Prvo srpsko izdanje. Beograd (Republika Srbija): Data Status; 2005.
62. Pana[®] 1 mg/ml kapi za oči, Hemofarm AD. Sažetak karakteristika leka. Beograd (Republika Srbija): Agencija za lekove i medicinska sredstva; 2013.
63. Scientific discussion. Opatanol. EMEA. 2004; 1–28.
64. International Conference on Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Topic Q2 (R1): Validation of analytical procedures: text and methodology. Geneva (Switzerland); 2005.
65. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Guidance for industry: Bioanalytical method validation. Draft guidance. Maryland (USA): Rockville; 2013.
66. European Medicines Agency. Guideline on the validation of bioanalytical methods. London (UK); 2011.

- 67.** Almeida AM, Castel-Branco MM, Falcão AC. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. *J Chromatogr B.* 2002; 774 (2): 215–22.
- 68.** Souza SVC, Junqueira RG. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Anal Chim Acta.* 2005; 552: 25–35.
- 69.** Pawula M, Hawthorne G, Smith GT, Hill HM. Best practice in biological sample collection, processing and storage for LC–MS bioanalysis of drugs. In: Li W, Zhang J, Tse FLS, editors. *Handbook of LC–MS bioanalysis: best practices, experimental protocols, and regulations.* New York (USA): A John Wiley & Sons, Inc; 2013.
- 70.** Bhata RS, Chandasana H, Rathi C, Kumar D, Chhonker YS, Jain GK. Bioanalytical method development and validation of natamycin in rabbit tears and its application to ocular pharmacokinetic studies. *J Pharm Biomed Anal.* 2011; 54 (5): 1096–100.
- 71.** Bhatta RS, Rathi C, Chandasana H, Kumar D, Chhonker YS, Jain GK. LC–MS method for determination of amphotericin B in rabbit tears and its application to ocular pharmacokinetic study. *Chromatographia.* 2011; 73 (5–6): 487–93.
- 72.** Arnold DR, Granvil CP, Ward KW, Proksch JW. Quantitative determination of besifloxacin, a novel fluoroquinolone antimicrobial agent, in human tears by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B.* 2008; 868: 105–10.
- 73.** Sato S, Kitagawa S, Nakajima M, Shimada K, Honda A, Miyazaki H. Assessment of tear concentrations on therapeutic drug monitoring. II. Pharmacokinetics analysis of valproic acid in guinea pig serum, cerebrospinal fluid, and tears. *Pharm Res.* 2001; 18 (4): 500–9.

74. Liu F, Xiao KP, Rustum AM. Determination of individual homologues and total content of benzalkonium chloride by reversed-phase high-performance liquid chromatography using a short butyl column. *J AOAC Int.* 2009; 92 (6): 1644–51.
75. Santos M, Li M, Rustum AM. A single RP-LC method for the determination of benzalkonium chloride and its potential impurities in benzalkonium chloride raw material. *Chromatographia.* 2010; 71: 499–503.
76. Labranche LP, Dumont SN, Levesque S, Carrier A. Rapid determination of total benzalkonium chloride content in ophthalmic formulation. *J Pharm Biomed Anal.* 2007; 43: 989–93.
77. Miller RB, Chen C, Sherwood CH. High-performance liquid chromatographic determination of benzalkonium chloride in Vasocidin[®] ophthalmic solution. *J Liq Chromatogr Rel Technol.* 1993; 16: 3801–11.
78. Rakić TM. Hemometrijsko unapređenje razvoja metoda tačne hromatografije kroz matematičko modelovanje i nove funkcije hromatografskog odgovora [doktorska disertacija]. Farmaceutski fakultet: Univerzitet u Beogradu; 2013.
79. Deming SN, Morgan SL. *Experimental design: a chemometric approach.* 2 nd ed. Amsterdam (The Netherlands): Elsevier; 1993.
80. Ferreira SLC, Bruns RE, Ferreira HS, Matos GD, David JM, Brandão GC, et al. Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. *Anal Chim Acta.* 2007; 597: 179–86.
81. Ferreira SLC, Bruns RE, Da Silva EGP, Dos Santos WNL, Quintella CM, Davis JM. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. *J Chromatogr A.* 2007; 1158: 2–14.

82. Vanbel PF, Tilquin BL, Schoenmakers PJ. Criteria for developing rugged high-performance liquid chromatographic methods. *J Chromatogr A*. 1995; 697 (1): 3–16.
83. Rakić T, Jovanović M, Dumić A, Pekić M, Ribić S, Jančić–Stojanović B. Robust optimization of psychotropic drug mixture separation in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography. *Acta Chim Slov*. 2013; 60 (2): 411–5.
84. Lebrun P, Govaerts B, Debrus B, Ceccato A, Caliaro G, Hubert P, et al. Development of a new predictive modelling technique to find with confidence equivalence zone and design space of chromatographic analytical methods. *Chem Intell Lab*. 2008; 91: 4–16.
85. Crowther JB. Validation of pharmaceutical test methods. In: Ahuja S, Scypinski S, editors. *Handbook of modern pharmaceutical analysis*. 2nd ed. Oxford (UK): Elsevier; 2011.
86. Kazakievich Y, Lobrutto R. *HPLC for pharmaceutical scientist*. New Jersey (USA): A John Wiley & Sons, Inc; 2007.
87. Singh S, Junwal M, Modh G, Tiwari H, Kurmi M, Parashar N, et al. Forced degradation studies to assess the stability of drugs and products. *Trends Anal Chem*. 2013; 49: 71–88.
88. Baertschi SW, Alsante KM, Reed RA. *Pharmaceutical stress testing: predicting drug degradation*. 2nd ed. USA: Taylor & Francis Group. CRC Press; 2011.
89. Bakshi M, Singh S. Development of validated stability indicating assay methods—critical review. *J Pharm Biomed Anal*. 2002; 28 (6): 1011–40.

90. Maggio R, Vignaduzzo SE, Kaufman TS. Practical and regulatory considerations for stability-indicating methods for the assay of bulk drugs and drug formulations. *Trends Anal Chem.* 2013; 49: 57–70.
91. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Topic Q1A (R2): Stability testing of new drug substances and drug products. Geneva (Switzerland); 2003.
92. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Topic Q1B: Stability testing: photostability testing of new drug substances and products. Geneva (Switzerland); 1996.
93. Kenneth AC. *Chemical kinetics: the study of reaction rates in solution.* 1st ed. New Jersey (USA): A John Wiley & Sons, Inc; 1990.
94. Espenson J. *Chemical kinetics and reaction mechanism.* 2nd ed. New York (USA): McGraw–Hill Education; 2002.
95. Ho CS, Lam CWK, Chan MHM, Cheung RCK, Law LK, Lit LCW, et al. *Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications.* *Clin Biochem Rev.* 2003; 24 (1): 3–12.
96. McLafferty FW. Tandem mass spectrometry. *Science.* 1981; 214 (4518): 280–7.
97. Kebarle P. A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2000; 35 (7): 804–17.
98. Agrahari V, Mandal A, Agrahari V, Trinh HM, Joseph M, Ray A, et al. A comprehensive insight on ocular pharmacokinetics. *Drug Deliv Transl Res.* 2016; 6 (6): 735–54.

- 99.** McGhee PCN. An overview of topical ophthalmic drugs and the therapeutics of ocular infection. CNJ Mc Ghee: Ocular Therapeutics; 2017.
- 100.** Durairaj C. Ocular pharmacokinetic. In: Whitcup SM, Azar DT, editors. Pharmacological therapy of ocular disease. New York (USA): Springer Science; 2017.
- 101.** Ghate D, Edelhauser HF. Ocular drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 2006; 3 (2): 275–87.
- 102.** Schoenwald RD. Ocular pharmacokinetics and pharmacodynamics. In: Mitra AK, editor. Ophthalmic drug delivery systems. 2nd ed. New York (USA): Marcel Dekker, Inc; 2003.
- 103.** Winter ME. Basic clinical pharmacokinetics. 4th ed. Pennsylvania (USA): Lippincott Williams & Wilkins; 2004.
- 104.** Wilkinson GR. Pharmacokinetics—the dynamics of drug absorption, distribution and elimination. In: Chabner BA, Brunton L, Knollman B, editors. Goodman & Gilman's the pharmacological basic of therapeutics. 10th ed. New York (USA): McGraw–Hill Medical Publishing Division; 2001.
- 105.** Shargel L, Yu ABC. Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics. 7th ed. New York (USA): McGraw–Hill Education; 2015.
- 106.** Burton ME, Shaw LM, Schentag JJ, Evans WE. Applied pharmacokinetics & pharmacodynamics—principles of therapeutic drug monitoring. 4th ed. Pennsylvania (USA): Lippincott Williams & Wilkins; 2004.

7. PRILOG

NAUČNI RADOVI OBJAVLJENI IZ DOKTORSKE DISERTACIJE U ČASOPISIMA MEĐUNARODNOG ZNAČAJA

- 1. Maksić J**, Stajić A, Knežević M, Dačić Krnjaja B, Jančić–Stojanović B, Medenica M. *Determination of olopatadine in human tears by HILIC–MS/MS method*. Bioanalysis. 2017; 9 (24): 1943–54. **M21**
- 2. Maksić J**, Jovanović M, Rakić T, Popović I, Ivanović D, Jančić–Stojanović B. *Chromatographic analysis of olopatadine in hydrophilic interaction liquid chromatography*. J Chromatogr Sci. 2014; 1–7. **M23**
- 3. Maksić J**, Tumpa A, Popović I, Jančić–Stojanović B. *Ispitivanje olopatadin hidrohlorida pod stres uslovima metodom tečne hromatografije hidrofилnih interakcija*. Hem Ind. 2016; 70 (3): 339–47. **M23**

NAUČNI RADOVI OBJAVLJENI IZ SPECIJALISTIČKOG RADA U ČASOPISIMA MEĐUNARODNOG ZNAČAJA

- 1. Maksić J**, Tumpa A, Stajić A, Jovanović M, Rakić T, Jančić–Stojanović B. *Hydrophilic interaction liquid chromatography in analysis of granisetron and its related substances. Retention mechanisms and method development*. J Pharm. Biomed Anal. 2016; 123: 93–103. **M21**

**RADOVI IZ DOKTORSKE DISERTACIJE SAOPŠTENI NA SKUPOVIMA
MEĐUNARODNOG ZNAČAJA ŠTAMPANI U IZVODU (M34)**

- 1. Maksić J**, Stajić A, Knežević M, Dačić Krnjaja B, Jančić–Stojanović B, Medenica M. Development of HILIC–ESI/MS/MS method for the quantification of olopatadine in human tears. *IV International Symposium on High Performance Liquid Chromatography*. Prague, Czech Republic, 2017.
- 2. Maksić J**, Stajić A, Tumpa A, Medenica M, Jančić–Stojanović B. Design of experiments methodology in selection of optimal conditions for HILIC/MS/MS analysis of olopatadine in human tears. *II International Conference on Sample Treatment*. Lisbon, Portugal, 2016.
- 3. Maksić J**, Jovanović M, Rakić T, Tumpa A, Popović I, Jančić–Stojanović B. Investigation of olopatadine hydrochloride under stress conditions by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography. *XXX International Congress on Chromatography*. Salzburg, Austria, 2014.
- 4. Maksić J**, Jovanović M, Rakić T, Popović I, Jančić–Stojanović B. Olopatadine and its geometric isomer determination in hydrophilic interaction liquid chromatography. *IX Symposium on High–Performance Separation Methods*. Balaton, Hungary, 2013.

**OSTALI RADOVI SAOPŠTENI NA SKUPOVIMA MEĐUNARODNOG
ZNAČAJA ŠTAMPANI U IZVODU (M34)**

- 1. Maksić J**, Antunović M, Stajić A, Jančić–Stojanović B. Quality by Design approach in development of hydrophilic interaction liquid chromatography for analysis of granisetron and its impurities in dosage forms. *V National Congress on Rational Therapy in Medicine with International and Interactive Participation*. Kragujevac, Republic of Serbia, 2017.

2. **Maksić J**, Tumpa A, Stajić A, Jovanović M, Rakić T, Jančić–Stojanović B. Hydrophilic interaction liquid chromatography in analysis of granisetron and its related substances. Retention mechanisms and method development. *XXI International Symposium on Separation Sciences*. Ljubljana, Slovenia, 2015.
3. Jovanović M, **Maksić J**, Rakić T, Jančić–Stojanović B. The analysis of iohexol and its related compounds in hydrophilic interaction liquid chromatography. *XXX International Congress on Chromatography*. Salzburg, Austria, 2014.
4. **Maksić J**, Radojičić D, Vukadinović D, Antunović M. Spectrophotometric method development and validation for determining the content of ephedrine hydrochloride in injections. *VI Congress of Pharmacists of Serbia with International Participation*. Beograd, Republic of Serbia, 2014.

KLINIČKI CENTAR SRBIJE
ETIČKI ODBOR

Broj: 93/8

Dana: 20.04.2016. godine

Beograd, Pasterova br. 2

Na osnovu odredaba Zakona o zdravstvenoj zaštiti Republike Srbije ("Sl. glasnik RS", br. 107/2005, 72/2009 - dr. zakon, 88/2010, 99/2010, 57/2011, 119/2012, 45/2013 - dr. zakon, 93/2014, 96/2015 i 106/2015), Zakona o lekovima i medicinskim sredstvima Republike Srbije ("Sl. glasnik RS", br. 30/2010 i 107/2012), Pravilnika o sadržaju zahteva, odnosno dokumentacije za odobrenje kliničkog ispitivanja leka i medicinskog sredstva, kao i načina sprovođenja kliničkog ispitivanja leka i medicinskog sredstva ("Sl. glasnik RS", br. 64/2011 i 91/2013), Poslovnika o radu Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije br. 3098/39 od 26.04.2012. god., postupajući u skladu sa Načelima dobre kliničke prakse (GCP), Etički odbor Kliničkog centra Srbije u sastavu: Prof. dr Branislav Stefanović - predsednik, Prof. dr Zoran Džamić, Prof. dr Saša Kadija, Prof. dr Branko Milaković, Doc. dr Vladan Živaljević, Prof. dr Jelena Drulović, Prof. dr Đorđe Đorđević - dipl. pravnik, Prof. dr Miloš Žarković, Prof. dr Violeta Vučinić, Prof. dr Vesna Tomić - Spirić, Prof. dr Dragan Simić, odlučujući o zahtevu Doc. dr Miroslava Kneževića na svojoj 8. sednici održanoj dana 20.04.2016. godine, doneo je sledeću

O D L U K U

Odobrava se sprovođenje akademskog kliničkog ispitivanja pod nazivom: "Karakterizacija sistema tečne hromatografije hidrofилnih interakcija sa UV i MS/MS detekcijom u analitici i bioanalitici olopatadina".

Glavni istraživač i komentor je Doc. dr Miroslav Knežević.

Istraživači saradnici: Prof. dr Biljana Stojanović sa Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Jelena Maksić, dipl. farmaceut.

Prikupljeni podaci će se koristiti u cilju izrade doktorske disertacije Dipl. farm. spec. Jelene Maksić.

Ispitivanje će biti sprovedeno na Klinici za očne bolesti Kliničkog centra Srbije.

Prilikom donošenja odluke Etički odbor je razmatrao sledeću dokumentaciju:

- 1). Popunjeni obrasci zahteva za odobrenje sprovođenja akademskog kliničkog ispitivanja u Kliničkom Centru Srbije,
- 2). Protokol ispitivanja,
- 3). Informacija za pacijente sa formularom za davanje pisanog pristanka,
- 4). Biografija glavnog istraživača,
- 5). Saglasnost Kolegijuma Klinike za očne bolesti Kliničkog centra Srbije broj 597 od 05.04.2016. godine.

PRESEDNIK ETIČKOG ODBORA

Prof. dr Branislav Stefanović



8. BIOGRAFIJA AUTORA

Jelena Maksić rođena je 23. juna 1984. godine u Zvorniku. Osnovnu školu "Filip Kljajić Fića" i XIII beogradsku gimnaziju završila je sa odličnim uspehom. Studije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2003/2004. godine i diplomirala 2008. godine sa prosečnom ocenom 9,52. U toku studiranja bila je dobitnik stipendije grada Beograda koja se dodeljuje talentovanim studentima, kao i stipendije Zadužbine "Dragoljub Marinković". Pripravnički staž obavila je u Sektoru za farmaciju VMA i u julu 2009. godine položila stručni ispit.

Doktorske akademske studije, modul Farmaceutska hemija, započela je školske 2010/2011. godine na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Zdravstvenu specijalizaciju iz ispitivanja i kontrole lekova upisala je školske 2012/2013. godine na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu i završila 2015. godine sa ocenom 10. Od juna 2011. godine zaposlena je u Odeljenju za ispitivanje i kontrolu lekova Sektora za farmaciju Vojnomedicinske akademije kao magistar farmacije specijalista i zamenik načelnika. Učestvuje u edukaciji diplomiranih farmaceuta koji su na stažu u Sektoru za farmaciju VMA. Predavač je u okviru programa kontinuirane edukacije za farmaceute i farmaceutske tehničare.

Do sada je objavila četiri naučna rada u časopisima međunarodnog značaja (dva rada M21 kategorije i dva rada M23 kategorije). Iz doktorske disertacije, objavila je tri rada u međunarodnim časopisima (jedan rad M21 kategorije i dva rada M23 kategorije). Učestvovala je sa osam publikacija saopštenih na naučnim skupovima međunarodnog značaja koji su štampani u izvodu M34 kategorije.

Član je Farmaceutske komore Srbije i Saveza farmaceutskih udruženja Srbije.

Poseduje aktivno znanje engleskog jezika i služi se nemačkim jezikom.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisana: Jelena Maksić

Broj upisa: 23/10

Izjavljujem

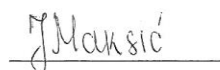
da je doktorska disertacija pod naslovom:

*Karakterizacija sistema tečne hromatografije hidrofilnih interakcija sa
UV i MS/MS detekcijom u analitici i bioanalitici olopatadina*

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu, 4. april 2018 godine

Potpis doktoranda



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Jelena Maksić

Broj upisa: 23/10

Studijski program: Farmaceutska hemija

Naslov rada: *Karakterizacija sistema tečne hromatografije hidrofилnih interakcija sa UV i MS/MS detekcijom u analitici i bioanalitici olopatadina*

Mentor: dr Biljana Stojanović, vanredni profesor

dr Miroslav Knežević, docent

Potpisani: Jelena Maksić


Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, 4. april 2018 godine

Potpis doktoranda



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku "Svetozar Marković" da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Karakterizacija sistema tečne hromatografije hidrofилnih interakcija sa UV i MS/MS detekcijom u analitici i bioanalitici olopatadina

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da se koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerade
4. Autorstvo - nekomercijalno - deliti pod istim uslovom
5. Autorstvo - bez prerade
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

U Beogradu, 4. april 2018 godine

Potpis doktoranda

