

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKE STUDIJE

Na sednici Nastavno-naučnog veća Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, održanoj 14.06.2019. godine imenovani su članovi Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije kandidata Jasmine Šljivić, magistra farmacije, pod naslovom:

„Primena multikriterijumske optimizacije i koncepta dizajna kvaliteta u razvoju metoda tečne hromatografije pod ultravisokim pritiskom i micelarne tečne hromatografije za praćenje stabilnosti cilazaprila i hidrohlorotiazida“.

Komisija u sastavu:

1. Dr sc. Mira Zečević, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, mentor
2. Dr sc. Biljana Otašević, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
3. Dr sc. Ana Protić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
4. Dr sc. Anđelija Malenović, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
5. Dr sc. Alija Uzunović, vanredni profesor, Farmaceutski fakultet Univerziteta u Tuzli

pregledala je priloženu disertaciju i podnosi Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

IZVEŠTAJ

A. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija kandidata magistra farmacije Jasmine Šljivić, pod nazivom **„Primena multikriterijumske optimizacije i koncepta dizajna kvaliteta u razvoju metoda tečne hromatografije pod ultravisokim pritiskom i micelarne tečne hromatografije za**

praćenje stabilnosti cilazaprila i hidrohlorotiazida“, napisana je na 147 strana i sadrži šest poglavlja: Uvod, Ciljeve rada, Eksperimentalni deo, Rezultate i diskusiju, Zaključak i Literaturu. Na početku disertacije dat je sažetak rada na srpskom i engleskom jeziku, dok je na kraju rada data biografija autora i prilozi. Disertacija je napisana jasnim i preglednim stilom i sadrži 39 slika, 18 tabela i 177 literaturnih navoda.

U **Uvodnom delu** su date teorijske osnove koje su od značaja za predmet proučavanja doktorske disertacije. Uvodni deo disertacije se sastoji iz četiri veće celine i jedanaest podcelina. U prvoj celini prikazane su farmakološke, farmakokinetičke i hemijske osobine cilazaprila i hidrohlorotiazida, kao i njihove poznate nečistoće i degradacioni proizvodi. U drugoj celini je opisan razvoj metoda farmaceutske analize uz detaljno objašnjenje hemometrijskog pristupa gde su date teorijske osnove korišćenih eksperimentalnih dizajna u skriningu i optimizaciji metoda, metodologije multikriterijumskog odlučivanja, indirektnog modelovanja i pristupa koji podrazumeva primenu koncepta dizajna kvaliteta u razvoju analitičke metode (eng. *Analytical Quality by Design, Aqbd*). U trećoj celini, opisane su primenjene metode u istraživanju, gde je posebno objašnjena RP UHPLC metoda sa UV i masenom detekcijom, optimizacija i validacija RP UHPLC metode sa gradijentnim eluiranjem, ispitivanje robusnosti RP UHPLC metode primenom metodologije indirektnog modelovanja, optimizacija i validacija metoda micelarne tečne hromatografije sa izokraskim eluiranjem, kao i metode masene spektrometrije za ispitivanje degradacionih proizvoda ispitivanih jedinjenja. Četvrta celina je posvećena literaturnim podacima vezanim za analitiku cilazaprila i hidrohlorotiazida.

Ciljevi istraživanja su definisani kao razvoj HPLC *stability indicating* metoda za ispitivanje cilazaprila i hidrohlorotiazida kao aktivnih farmaceutskih supstanci (API) i u farmaceutskim doziranim oblicima (FDO). Navedeni ciljevi su jasno definisani i na osnovu postavljenih ciljeva istraživanje je podeljeno u četiri faze.

Ekseprimentalni deo. Eksperimenti koji čine doktorsku disertaciju realizovani su u okviru četiri faze.

U **prvoj fazi** istraživanja izvedene su studije forsirane degradacije aktivnih farmaceutskih supstanci cilazaprila i hidrohlorotiazida i njihovih doziranih oblika Prilazid® plus i Cilazil® HCT film tableta. Ispitana je njihova stabilnost u kiselim i baznim stres uslovima, u uslovima oksidacionog i temperaturnog stresa kao i fotostabilnost. Za ispitivanje nastalih degradacionih proizvoda primenjena je RP UHPLC metoda. Opisani su eksperimentalni uslovi korišćene metode, oprema, priprema rastvora, reagensi, korišćeni standardi, uzorci i procedure ispitivanja. Za studije forsirane degradacije API i FDO pripremljeni su rastvori po

sledećoj proceduri: Za svako ispitivanje pripremiti po četiri rastvora koji se analiziraju u različitim vremenskim intervalima i to: radni rastvor standardne supstance (API) odnosno FDO bez prisustva stres agensa, stres agens kao slepa proba, radni rastvor standardne supstance (API) odnosno FDO kome je dodat stres agens i koji se analizira u nultom vremenu tj. neposredno nakon pripreme i radni rastvor standardne supstance (API) odnosno FDO izložen stres uslovima u definisanom vremenskom periodu. Svaki rastvor je ispitan RP UHPLC metodom i micelarnom RP HPLC metodom koje su u narednim fazama eksperimentalnog dela rada optimizovane i validirane.

U **drugoј fazi** istraživanja izvedena je optimizacija i validacija RP UHPLC metode sa gradijentnim eluiranjem za ispitivanje stabilnosti cilazaprila i hidrohlorotiazida kao aktivnih farmaceutskih supstanci i u doziranim oblicima. Opisana je priprema rastvora za optimizaciju i validaciju gradijentne RP UHPLC metode za praćenje stabilnosti cilazaprila i hidrohlorotiazida. Sastav mobilne faze menjan je u skladu sa planom eksperimenata definisanog centralnim kompozicionim dizajnom (CCD)-a. Vrednosti ispitivanih faktora na izabranim nivoima su prikazane tabelarno. Navedeni su računarski programi korišćeni u optimizaciji eksperimentalnih uslova kao što su *Design-Expert 7.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, SAD)*, *Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, SAD)*, *Marvin Sketch 18.30 (ChemAxon Ltd., Budimpešta, Mađarska)*, *Matlab 7.10.0 (Mathworks, Natick, MA, USA)*. Takođe su opisani uslovi masene spektrometrije za ispitivanje degradacionih proizvoda. Optimalni hromatografski uslovi obuhvataju mobilnu fazu sastavljenu od acetonitrila (mobilna faza A) i 20 mmol L⁻¹ rastvora amonijum formijat pufera pH 8,5 (mobilna faza B) uz gradijentno eluiranje: pri 0 minuta 5% acetonitrila i 95% rastvora pufera (V/V), pri 15 minuta 35% acetonitrila i 65% rastvora pufera (V/V) i pri 16 minuta 5% acetonitrila i 95% rastvora pufera (V/V) na C18 stacionarnoj fazi. Temperatura kolone je bila 25°C, protok mobilne faze: 400 µL min⁻¹, a PDA detektor je bio podešen na 250 nm, dok je maseni spektrometar *TSQ Quantum Access Max* koji je bio spregnut sa UHPLC sistemom u sebi sadržao trostruki kvadrupolni analizator i jonski izvor sa elektrosprej jonizacijom u negativnom jonizacionom modu. U optimizaciji RP UHPLC metode sa gradijentnim eluiranjem korišćena je metodologija multikriterijumskog odlučivanja. Nakon optimizacije metoda je validirana prema ICH preporukama.

U **trećoj fazi** istraživanja, ispitana je robusnost RP UHPLC metode primenom novog koncepta metodologije indirektnog modelovanja. Razvijan je novi koncept u ispitivanju robusnosti metode gde se ispitivalo retenciono vreme kao potencijalni najbolji pokazatelj retencionog ponašanja supstance nasuprot uobičajenom pristupu gde je to reticioni faktor.

U **četvrtoj fazi** istraživanja optimizovana je i validirana nova metoda micelarne tečne hromatografije sa izokratskim eluiranjem za ispitivanje cilazaprila i hidrohloriazida kao aktivnih farmaceutskih supstanci i u doziranim oblicima. Mobilna faza je pripremana od acetonitrila i vodenog rastvora surfaktanta Brija L23. Sastav mobilne faze je menjan u skladu sa planom eksperimenata definisanog *Box-Behnken* dizajnom. Vrednosti ispitivanih faktora na izabranim nivoima su prikazane tabelarno.

Optimalni hromatografski uslovi obuhvataju mobilnu fazu sastavljenu od 13% (V/V) acetonitrila i 87% (V/V) 18 mmol L⁻¹ vodenog rastvora Brij L23 pH 3,8 pri protoku mobilne faze: 1 mL min⁻¹ dok je UV detektor podešen na 215 nm.

Sve metode korišćene u radu u skladu su sa savremenim standardima naučnoistraživačkog rada naučne oblasti Analitika lekova. Prikazana metodologija omogućava dobijanje jasnih i nedvosmislenih rezultata kojim se ostvaruju postavljeni ciljevi istraživanja.

Dobijeni rezultati zajedno sa **diskusijom** i poređenjem dobijenih rezultata sa trenutno dostupnim literaturnim podacima prikazani su nakon svih faza eksperimentalnog dela.

Na kraju disertacije prikazani su **zaključci** u odnosu na prethodno postavljene ciljeve za svaku od sprovedenih faza istraživanja.

B. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

U okviru **prve faze** istraživanja hemijske stabilnosti cilazaprila i hidrohloriazida i dobijanja degradacionih proizvoda u cilju razvoja *stability indicating* HPLC metoda, izvedene su studije forsirane degradacije na aktivnim farmaceutskim supstancama i farmaceutskim doziranim oblicima kako je prikazano u opisu prve faze eksperimentalnog dela. Cilazapril i hidrohloriazid su pokazali stabilnost u uslovima temperaturnog stresa i pri fotodegradaciji, a u kiseloj i baznoj sredini su nastali po jedan degradacioni proizvod, i to u kiseloj i baznoj sredini je cilazapril degradirao do cilazaprilata, a hidrohloriazid u kiseloj i baznoj sredini na temperaturi od 70 °C, je degradirao do poznate farmakopejske nečistoće B. Hidrohloriazid je degradirao u uslovima temperaturnog stresa i u neutralnom rastvoru do nečistoće B. Pri uslovima oksidacionog stresa hidrohloriazid je degradirao do jednog, a cilazapril do tri nepoznata degradaciona proizvoda. Zatim se pristupilo izlaganju farmaceutskih doziranih oblika cilazaprila i hidrohloriazida stres uslovima. Izlaganjem Prilazid[®] plus i Cilazil[®] HCT film tableta istim stres uslovima kojima su izložene aktivne farmaceutske supstance potvrđeno je prisustvo identičnih degradacionih proizvoda, što znači da su svi degradacioni proizvodi poreklom od degradacije aktivnih farmaceutskih supstanci i da ekscipijensi nisu uticali na

nastajanje dodatnih degradacionih proizvoda. Svi nastali degradacioni proizvodi su okarakterisani njihovim retencionim vremenima primenjenim HPLC metodama i odnosom m/z primenom masene spektrometrije.

U kiseloj sredini nastali cilazaprilat je identifikovan na retencionom vremenu od 1,08 minuta i upotrebom masenog spektrometra sa m/z vrednošću od 387,79. U baznoj sredini nastali cilazaprilat je identifikovan na retencionom vremenu od 2,34 minuta. Razlika u retencionom vremenu cilazaprilata pri kiseloj i baznoj hidrolizi potiče od različitih pH vrednosti ispitivanih stres uzoraka. Tri nepoznata degradaciona proizvoda cilazaprila u uslovima oksidacionog stresa su identifikovani na retencionim vremenima od 7,03 minuta, 10,51 minuta i 10,77 minuta, pri čemu je upotrebom masenog spektrometra dokazano da su njihove pripadajuće m/z vrijednosti redom 429,75, 431,89 i 430,83. Degradacioni proizvod hidrohlorotiazida u uslovima kisele sredine pri temperaturi od 70°C identifikovan je sa retencionim vremenom na 1,09 minuta i sa m/z vrijednošću 283,78 i on odgovara poznatoj farmakopejskoj nečistoći B. Isti taj degradacioni proizvod je identifikovan u uslovima bazne sredine pri temperaturi od 70°C na retencionom vremenu 0,78 minuta. Ovaj degradacioni proizvod se uočava i nakon termalne degradacije na retencionom vremenu od 1,36 minuta. Razlike u retencionim vremenima nastalog degradacionog proizvoda pri kiseloj i baznoj hidrolizi i termalnoj degradaciji potiču od različitih pH vrednosti ispitivanih stres uzoraka. Identifikovani degradacioni proizvod pri uslovima oksidacionog stresa ima vrednost m/z 311,5 i to na retencionom vremenu od 2,04 minuta.

U **drugoj fazi** istraživanja ove doktorske disertacije pristupilo se optimizaciji uslova za RP UHPLC razdvajanje cilazaprila i hidrohlorotiazida u prisustvu njihovih degradacionih proizvoda, odnosno optimizaciji i validaciji *stabilty indicating* RP UHPLC metode pri odabranim uslovima stacionarne faze korišćenjem *Kinetex* C18 (50 mm x 2,1 mm, 2,6 μ m) kolone. U toku razvoja metode utvrđeno je da metoda mora biti sa gradijentnim eluiranjem zbog veoma velikih razlika u polarnosti aktivnih farmaceutskih supstanci i njihovih degradacionih proizvoda, čime je uslovljeno i različito retenciono ponašanje pri datim uslovima stacionarne i mobilne faze. Primenom centralnog kompozicionog dizajna i *Derringer*-ove funkcije poželjnih odgovora je optimizovana *stability indicating* RP UHPLC metoda za razdvajanje cilazaprila, hidrohlorotiazida i njihovih degradacionih proizvoda.

Eksperimentalni dizajn prema eksperimentalnom planu CCD je obuhvatio 30 eksperimenata unutar kojih su varirane četiri varijable i to: početni i krajnji sadržaj acetonitrila, vreme trajanja gradijenta i temperature kolone. (A) početni sadržaj acetonitrila je variran u opsegu od 5 % do 10 % (V/V), (B) krajnji sadržaj acetonitrila je variran od 25 % do 35 % (V/V), (C)

vreme gradijenta je varirano od 15 do 20 minuta i (D) temperatura kolone je varirana u opsegu od 25 °C do 40 °C. Svi eksperimenti su izvedeni nasumičnim redosledom uz šest ponavljanja u centralnoj tački. Praćeni odgovori sistema su bili retencioni faktori degradacionih proizvoda cilazaprila i hidrohlorotiazida, DPC₃ i DPH₁. Odgovori koji su praćeni birani su u cilju postizanja najboljih hromatografskih performansi metode. Retencioni faktor degradacionog proizvoda DPH₁ je odabran jer se ovaj degradacioni proizvod ponašao neretenciono, dok je retencioni faktor degradacionog DPC₃ razmatran kao analit koji se najduže zadržavao u sistemu. Iz tih razloga postavljena su dva cilja optimizacije. Prvi cilj je obuhvatao zahtev da retencioni faktor nečistoće DPH₁ bude veći od 2 jer se tada očekivalo zadovoljavajuće retenciono ponašanje i dobro razdvajanje ovog analita od pika mobilne faze. Naime, DPH₁ je bila najpolarnija supstanca, za čije eluiranje je bio potreban najmanji udeo organskog rastvarača i koja se ponašala neretenciono pri većini eksperimentalnih uslova. Takođe je bilo neophodno optimizovati metodu u cilju izbegavanja nepotrebno dugog vremena trajanja hromatografske analize, pa je drugi cilj optimizacije obuhvatao minimiziranje retencionog faktora poslednje komponente koja se eluirala sa najvećim udelom organskog rastvarača (DPC₃). Kako je optimizacija metode obuhvatala dva protivrečna cilja, odlučeno je da se zbog što efikasnijeg procesa optimizacije primeni metodologija multikriterijumskog pristupa, i to *Derringer*-ova funkcija poželjnih odgovora. Shodno tome, definisani su ciljevi optimizacije i gornji i donji limiti. Pomoću *Design-Expert 7.0* softvera su dobijeni kvadratni modeli površine odgovora za oba praćena odgovora, tj. retencione faktore pomenutih degradacionih proizvoda i globalni optimalni hromatografski uslovi koji su obuhvatili mobilnu fazu sastavljenu od acetonitrila i 20 mmol L⁻¹ rastvora amonijum formijat pufera pH 8,5 uz gradijentno eluiranje: pri 0 minuta 5% acetonitrila i 95% rastvora pufera (V/V), pri 15 minuta 35% acetonitrila i 65% rastvora pufera (V/V) i pri 16 minuta 5% acetonitrila i 95% rastvora pufera (V/V), protok mobilne faze od 400 µL min⁻¹, temperaturu kolone od 25°C i talasnu dužinu detekcije 250 nm.

U ovoj fazi istraživanja doktorske disertacije je razvijena *stability indicating* UHPLC metoda i validirana u skladu sa ICH preporukama. U okviru validacije ispitana je linearnost, tačnost, preciznost, kao i odgovarajući limiti detekcije i kvantifikacije za degradacione proizvode. Dobijeni koeficijenti korelacije kalibracionih krivih za aktivne farmaceutske supstance cilazapril i hidrohlorotiazid su bili 0,9985 i 0,9958, dok su za nečistoću cilazaprilat i hidrohlorotiazid nečistoću B njegove vrednosti bile 0,9955 i 0,9943. Izračunate su *Recovery* vrijednosti za tačnost i dobijene su vrednosti u opsegu 97,11% - 101,79% za cilazapril, 99,05% - 101,18% za hidrohlorotiazid, 96,21% - 103,38% za cilazaprilat i 91,17% - 102,85%

za hidrohlorotiazid nečistoću B. Izračunata je relativna standardna devijacija za preciznost metode pri čemu su dobijene vrijednosti od 1,57% za cilazapril, 1,70% za hidrohlorotiazid, 3,99% za cilazaprilat i 4,75% za hidrohlorotiazid nečistoću B. Sadržaj nečistoća koji je dobijen je bio u farmakopejski zahtevanim vrednostima (0,49% za cilazaprilat i 0,09% za hidrohlorotiazid nečistoću B).

U **trećoj fazi** istraživanja, izvršena je procena robusnosti RP UHPLC metode primenom metodologije eksperimentalnog dizajna i indirektnog modelovanja. Kako su matematički modeli dobijeni tokom optimizacije metode ukazali na statistički značajan uticaj svih ispitivanih varijabli na retenciono ponašanje ispitivanih supstanci, odlučeno je da je pri detaljnoj proceni robusnosti metode neophodno razmotriti sve varijable koje su ispitivane tokom optimizacije metode. Testiranje robusnosti ove metode nije obuhvatilo ispitivanje pH vodene faze, koncentracije pufera, protoka i talasne dužine detekcije jer su ove varijable, eksperimentima u fazi optimizacije, označene kao nekritični parametri. Bazni uslovi pri pH 8,5 su odabrani u ranoj fazi razvoja metode zbog retencionog ponašanja i oblika pika hidrohlorotiazida. Ispitivana smeša cilazaprila, hidrohlorotiazida i njihovih degradacionih proizvoda je obuhvatala pet parova susednih pikova koji su se razlikovali po veličini i obliku što je ukazivalo da je procena robusnosti metode veoma zahtevan zadatak.

Testiranje robusnosti gradijentne UHPLC metode je izvedeno primenom indirektnog modelovanja s ciljem pojednostavljenja postupka ispitivanja i postizanja odgovarajućeg razdvajanja svih pikova kritičnih parova. Utvrđeno je da su kritični parovi pikova: degradacioni proizvod hidrohlorotiazida DPH_1 i hidrohlorotiazid, hidrohlorotiazid i drugi degradacioni proizvod hidrohlorotiazida DPH_2 , DPH_2 i cilazaprilat, cilazapril i degradacioni proizvod cilazaprila DPC_2 , kao i DPC_2 i još jednog degradacionog proizvoda cilazaprila DPC_3 . Ovaj pristup je obuhvatio modelovanje retencionog vremena početka i kraja susednih pikova na direktan način i izračunavanje vrednosti faktora separacije (s) na koherentan način. Razdvajanje na baznoj liniji se postiže ukoliko je s vrednost veća ili jednaka 0. Ovakav način procene robusnosti predstavlja novu metodologiju koja je predložena zato što direktno modelovanje rezolucije, čija se vrednost neznatno menja tokom procene robusnosti i bliska je jedinici, nije moguće. U navedenom slučaju dobijaju se matematički modeli sa značajnim vrednostima *lack of fit* i ne mogu se koristiti u daljoj proceni robusnosti. Iz navedenog razloga, *Design-Expert 7.0* softver je poslužio za prvu fazu dobijanja matematičkih modela koji povezuju ispitivane varijable sa retencionim vremenima početka i kraja pikova koji su definisani za kritične parove. Zatim su dobijene matematičke jednačine iskorišćene u *Matlab 7.10.0* softveru za indirektno modelovanje, za dobijanje vrednosti parametra s , a zatim i za

metodologiju pretrage čvorova mreže i grafičko predstavljanje eksperimentalnog prostora u okviru koga se vrši testiranje robusnosti metode. Dobijeni matematički modeli su iskorišćeni za izračunavanje odgovarajućih retencionih vremena kraja prvog pika koji se eluira i retencionih vremena početka drugog pika koji se eluira za uže domene varijabli koje su locirane simetrično oko optimalnog nivoa. Uticaj sastava mobilne faze je procenjen variranjem početnog sadržaja acetonitrila u opsegu od 5 % (V/V) do 7 % (V/V) i variranjem krajnjeg sadržaja acetonitrila u opsegu od 34 % (V/V) do 36 % (V/V). Značajnost vremena gradijenta je procenjena u opsegu od 15 minuta do 17 minuta, a značajnost temperature kolone variranjem u opsegu od 25 °C do 29 °C. Robusni uslovi su procenjeni detaljnom analizom dobijenih 3D grafikona. Na temperaturi od 25°C, robusna metoda je dobijena uz početni sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi od 5,0% do 5,8% (V/V) i vreme gradijenta od 15,0 do 15,6 minuta. Metoda je zadržala željene karakteristike uz početni udeo acetonitrila iznad 5,8% (V/V), ali uz simultano povećanje vremena gradijenta.

U **četvrtoj fazi** istraživanja optimizovana je i validirana micelarna *stability indicating* metoda tečne hromatografije za praćenje stabilnosti cilazaprila i hidrohlorotiazida. U razvoju metode primenjena je *AQbD* i metodologija pretrage čvorova mreže. S obzirom na poznate nedostatke gradijentnih hromatografskih metoda, s jedne strane i prednosti izokratskih hromatografskih metoda, dalja istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji su usmerena na razvoj i validaciju izokratske metode micelarne tečne hromatografije za ispitivanje stabilnosti cilazaprila i hidrohlorotiazida. Za razvoj ove metode korišćen je uzorak koji je izlagan oksidacionom stresu s obzirom da su u tom uzorku nastali svi mogući degradacioni proizvodi cilazaprila i hidrohlorotiazida. Tip stacionarne faze je odabran u skladu sa prirodom analita po pitanju hidrofobnosti koja je određena vrednostima logP. Vrednosti logP za cilazapril i cilazaprilat su 1,93 i 1,43, za hidrohlorotiazid i DPH₁ -0,58 i -1,04 te su one ukazale da se hromatografsko razdvajanje mora izvesti na RP C18 stacionarnoj fazi. Nejonski surfaktant Brij L23 je odabran jer nije ugrozio detekciju komponenata koje se rano eluiraju i zbog toga što je omogućio zadovoljavajuću simetriju pikova. Nejonski surfaktanti obezbeđuju hidrofobna i sterna mesta za interakciju između vode, stacionarne faze, micelarne pseudo faze i rastvorene supstance u cilju omogućavanja efikasnog razdvajanja različitih komponenti. Adsorpcija monomera surfaktanta modifikuje stacionarnu fazu stvarajući strukturu sličnu otvorenoj miceli. Surfaktanti menjaju polarnost stacionarne faze, kao i strukturu, volumen pora i površinu stacionarne faze, oni prekrivaju njene pore i stoga značajno smanjuju njihov volumen i silanolne interakcije. Deo stacionarne faze koji je modifikovan na ovakav način predstavlja micelarnu pseudo fazu. Sastav mobilne faze i modifikovana stacionarna faza

doprinosu razdvajanju u ovom kompleksnom hromatografskom sistemu. Priroda i koncentracija surfaktanta, jonska jačina i pH utiču na razdvajanje. S obzirom da vodeni rastvor Brij L23 nije imao dovoljnu snagu eluiranja bio je neophodan dodatak organskog rastvarača te je tako dobijen vid hibridne micelarne tečne hromatografije. Nivoi acetonitrila su kritički praćeni jer je poznato da samo sadržaj manji od 20% (V/V) u mobilnoj fazi čuva integritet Brij L23 micela. Nakon preliminarnih razmatranja uticaja pH na ispitivane analite ustanovljeno je da je neophodno detaljno ispitati uticaj pH vodene faze na hromatografsko razdvajanje komponenti nastalih nakon izvođenja oksidacionog stresa na uzorku cilazaprila i hidrohloriazida. Takođe je preliminarnim ispitivanjima ustanovljeno da promene temperature kolone nisu imale znaćajan uticaj na hromatografsko ponašanje ispitivanih analita. Primena *AQbD* principa u razvoju metode je obuhvatila definisanje: *ATP* opsega metode (eng. *Analytical target profile*), *CMA*s (eng. *Critical method attributes*) odgovora i *CMP*s (eng. *Critical method parameters*) eksperimentalnih faktora, analitićkog prostora dizajna, odnosno dizajn eksperimenata pri modelovanju *CMA*s i konstrukciju *design space-a*, (*DS-a*) u skladu sa *AQbD* konceptom. *Monte Carlo* simulacije su iskorišćene u cilju dobijanja distribucije kriterijuma razdvajanja iz distribucije retencionih vremena pikova kritićnog para dobijenog indirektnim modelovanjem. To je obuhvatilo 5000 ponavljanja u svakoj od 4851 taćaka mreže. Na kraju je izvršeno izraćunavanje regiona prostora znanja koji imaju zadovoljavajuće vrednosti oba definisana *CMA*s sa željenim nivoom kvaliteta ($\pi=90\%$). Ovako definisan *DS* predstavlja deo prostora u kojem su verovatnoća za dobijanje dobro razdvojenih pikova kritićnog para i odgovarajuće zadržavanje prvog pika koji se eluira veći od prethodno definisane donje granice kvaliteta. Odgovarajuća *3D* vizualizacija definisanog *DS* je predstavljena grafićki za postignutu verovatnoću $\pi = 90\%$, kao i dobijeni hromatogrami pri datim optimalnim uslovima u okviru definisanog *DS*.

Za validaciju metode, odabrana je radna taćka iz sredine *DS-a* i koja osigurava potpunu potvrdu robusnosti metode i to pri sledećim uslovima *CMP*s: sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi 13% (V/V), pH vodene faze 3,8 i koncentracija Brij L23 vodenog rastvora 18 mmol L⁻¹.

Izraćunate vrednosti *CMA*s, $s = 0,067$ i $k = 0,979$, su ispunile prethodno definisane zahteve i potvrdile kvalitet MLC metode razvijene primenom *AQbD* pristupa.

Sva prethodno navedena razmatranja vezana za definisanje *ATP*, *CMA*s i *CMP*s kao i primena eksperimentalnog dizajna u istraćivanju prostora znanja su u skladu sa metodologijom multikriterijumskog odlućivanja pri optimizaciji analitićke metode koja je primenjena u nastavku istraćivanja optimalnih uslova hromatografskog razdvajanja ispitivanih analita.

U ovoj studiji je metodologija multikriterijumskog odlučivanja zasnovana na metodologiji pretrage čvorova mreže i prethodno definisani prostor znanja je podeljen u mrežu diskretizacijom numeričkih parametara upotrebom *Matlab* softvera.

Detaljna pretraga mreže koja se sastojala od ukupno 4851 tačaka je ukazala na 508 tačaka (ružičasto obojenih u grafičkom 3D prikazu u disertaciji) koje su istovremeno zadovoljavale oba optimizaciona cilja: $s \geq 0$ i $k \geq 0,9$. Slično odabiru radne tačke u okviru *DS*-a, bilo koja tačka u mreži koja zadovoljava definisane kriterijume može biti korišćena kao radna tačka za dalju validaciju metode, ali se u cilju osiguranja robusnosti metode, preporučuje odabir radne tačke u sredini regiona sa ružičastim tačkama. Komparativna analiza pozicije *DS*-a u prostoru znanja, i regiona sa tačka u mreži koje zadovoljava definisane kriterijume je ukazala da je moguće izabrati istu radnu tačku primenom oba metodološka pristupa. Takođe je neophodno naglasiti da se region sastavljen od čvorova mreže koji zadovoljavaju definisane kriterijume ne bi trebao tretirati na isti način kao *DS* definisan prema prethodno predstavljenom *AQbD* pristupu. Metodologija pretrage čvorova mreže kao i optimalni region metode koji pokriva odgovore koji zadovoljavaju prethodno definisane kriterijume kroz preklapanje kontura nacrti ili preklapanje površine odgovora, takozvana „slatka tačka“, ukazuju na oblast u kojoj se ne bi smele ugroziti performanse metode. Ipak ceo region optimalnih uslova dobijen ovom metodologijom ne poklapa se sa regionom *DS* dobijenim primenom *AQbD* pristupa. Ovaj region je širi, ali je u uskom području koji odgovara i *DS* jedino pouzdan. Iz tog razloga metoda koja je razvijena metodologijom pretrage čvorova mora biti obavezno ispitana na robusnost. U ovoj disertaciji je prikazana mogućnost da se robusnost metode razvijene ovom metodologijom može ispitati bez izvođenja dodatnih eksperimenata što je prednost ove metodologije. Prikazana je efikasna strategija procene robusnosti metode korišćenjem eksperimentalnih podataka iz faze optimizacije što predstavlja značajnu racionalizaciju eksperimentalnog postupka.

Matematički modeli iz faze optimizacije su ponovo iskorišćeni u cilju predviđanja varijacija t_{e_DPH1} , $t_{b_hidrochlorotiazid}$ i $k_{cilazaprilata}$ u suženoj eksperimentalnoj oblasti. Na isti način kao i tokom optimizacije analitičke metode, kriterijum razdvajanja s za kritični par pikova je indirektno modelovan. Analiza dobijene mreže je pokazala da se opisani suženi eksperimentalni prostor sastoji od potpuno robusnih uslova u kojima su svi željeni kriterijumi performansi očuvani u svakom čvoru mreže. Nakon optimizacije i ispitivanja robusnosti metode, istraživanja su obuhvatila validaciju metode micelarne tečne hromatografije. U skladu sa zvaničnim regulatornim smernicama, postupak validacije obuhvatio je ispitivanje linearnosti, tačnosti, preciznosti, limita detekcije i limita kvantifikacije u cilju potvrde pogodnosti metode za

rutinsku primenu. Dobijeni rezultati za svaki od ispitivanih parametara validacije metode pokazali su da je metoda pogodna za rutinsku primenu ispitivanja cilazaprila i hidrohloriazida i njihovih degradacionih proizvoda u aktivnim farmaceutskim supstancama i farmaceutskim doziranim oblicima.

C. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA SA PODACIMA IZ LITERATURE

Metode tečne hromatografije pod visokim pritiskom su najzastupljenije separacione metode u analitici lekova. U novije vreme se radilo na unapređenju ovih tehnika i to najviše po pitanju tehnologija punjenja, veličine čestica i hemije stacionarnih faza što je dovelo do pojave nove unapređene tečne hromatografije pod ultra visokim pritiskom, UHPLC metode, sa mnogo boljim hromatografskim performansama. UHPLC tehnika se zasniva na primeni stacionarnih faza koje posjeduju čestice malih veličina (ispod 2 μm , u odnosu na tradicionalnu HPLC gde su veličine čestica stacionarne faze 2, 3 ili 5 μm) koje podnose veći pritisak (preko 1000 bara u odnosu na tradicionalnu HPLC koja podnosi pritisak do 400 bara) u odnosu na tradicionalnu HPLC metodu. Osetljivost UHPLC metode je zavisno od tehnike detekcije 2-3 puta veća u odnosu na HPLC metodu (1-5).

Ipak, najvažnije prednosti UHPLC tehnike su kraće vreme analize (6,7) i dobijanje oštrih pikova, povećanje rezolucije, efikasnosti, kapaciteta razdvajanja i osetljivosti, što ih čini pogodnim za razvoj novih i unapređenje konvencionalnih metoda. Ukoliko se u optimizaciji ovih metoda za ispitivanje lekova i njihovih degradacionih proizvoda i nečistoća koristi hemometrijski pristup, onda se postiže visok stepen automatizacije i racionalizacije eksperimentalnog postupka. Kako u literaturi nije pronađena ni jedna UHPLC metoda za analizu cilazaprila i hidrohloriazida i njihovih degradacionih proizvoda, razvijena metoda u ovoj doktorskoj disertaciji je potpuno nova. U literaturi je pronađen jedan rad (8) u kome su autori sprovodili studije forsirane degradacije za cilazapril i hidrohloriazid u svrhu ispitivanja selektivnosti u razvoju klasične HPLC metode, te *stability indicating* HPLC niti UHPLC metoda za cilazapril i hidrohloriazid nije bila dostupna u literaturi sve dok autor ove doktorske disertacije nije objavio naučni rad iz ove oblasti.

Hemometrijskim pristupom optimizaciji metoda u analitici lekova dobijeni rezultati se analiziraju primenom statističkih, matematičkih i logističkih metoda što omogućava donošenje objektivnih i validnih zaključaka. Ukoliko se želi izvršiti istovremena optimizacija, ne samo više nezavisno promenljivih, nego i zavisno promenljivih, primena metodologije multikriterijumskog odlučivanja predstavlja još jedan veoma koristan pristup (9). Ona

predstavlja savremeni statistički pristup planiranja eksperimenata koji omogućava dobijanje velikog broja podataka iz što manje eksperimenata. Primenom efikasnog eksperimentalnog dizajna je moguće ispitati i optimizirati svaki parametar u prethodno definisanom opsegu izvođenjem malog broja eksperimenata u kojima se vrednosti više parametara istovremeno menjaju uz detaljan opis uticaja varijabli i međusobnih interakcija predviđajući prave optimalne eksperimentalne uslove (10). Takođe, u literaturi nisu pronađeni podaci o razvoju HPLC/UHPLC *stability indicating* metode za cilazapril i hidrohlorotiazid korišćenjem ovog pristupa primenjenog u ovoj doktorskoj disertaciji. Zbog velike razlike u fizičko-hemijskim osobinama, prvenstveno u polarnosti na šta su ukazivale vrednosti logP ova dva leka, i dobijenih degradacionih proizvoda da bi se izbegla upotreba velikih količina organskog rastvarača u mobilnoj fazi, razvijena je i optimizovana gradijentna UHPLC metoda za praćenje njihove stabilnosti. Takođe, su vednosti pKa i pH zavisnost od jonskih i nejonskih oblika supstanci ukazivale da se cilazapril i hidrohlorotiazid pri određenim pH vrednostima nalaze u različitim dominantnim jonizacionim oblicima, pa je bilo neophodno optimizovati i pH vrednost mobilne faze. Kako je u detekciji degradacionih proizvoda pored PDA detektora, korišćen maseni detektor (11) amonijum formijat kome je pH vrednost podešena natrijum hidroksidom je predstavljao puffer izbora za regulisanje pH vrednosti. U optimizaciji eksperimentalnih uslova korišćen je CC,a podrazumevala je variranje početnog i krajnjeg sadržaja acetonitrila, vremena trajanja gradijenta i temperature kolone. Upotreba određene vrste dizajna zavisi od broja i vrste faktora koji se optimizuju, svrhe upotrebe i preferencija analitičara (12-13). Nakon uspostavljanja optimalnih eksperimentalnih uslova metoda je ispitana na robusnost i validirana prema ICH preporukama. Testiranje robusnosti gradijentne UHPLC metode je izvedeno uz primenu indirektnog modelovanja s ciljem pojednostavljenja celog postupka i obezbeđivanja odgovarajućeg razdvajanja svih pikova kritičnih parova (14, 15).

Druga metoda koja je razvijena i optimizovana u ovoj doktorskoj disertaciji bila je metoda micelarne tečne hromatografije sa izokratskim eluiranjem, opet sa idejom da se na bazi moguće modifikacije stacionarne faze postignu odgovaraajući retencioni mehanizmi, ublaže velike razlike u polarnosti ispitivanih analita i postignu prihvatljivi uslovi razdvajanja u izokratskom modu. Retencioni mehanizmi i redosled eluiranja ispitivanih supstanci u RP-HPLC i MLC metodama se znatno razlikuju. Na razdvajanje u MLC metodama ne utiče samo raspodela analita između mobilne i stacionarne faze već i između formiranih micela i površine stacionarne faze modifikovane monomerima surfaktanta. S toga je usledia nova preliminarna analiza i preliminarni eksperimenti u skladu sa fizičko-hemijskim osobinama analita i

potencijalnim retencionim mehanizmima u ovoj vrsti hromatografije. Odabrani su novi uslovi stacionarne faze C18, hibridnog karaktera koja osigurava hemijski stabilno pakovanje sa visokom efikasnošću i radom u širokom pH opsegu. Kao nejonski surfaktant u MCL odabran je Brij L23. Adsorpcija monomera surfaktanta modifikuje stacionarnu fazu stvarajući strukturu sličnu otvorenoj miceli. Surfaktanti menjaju polarnost stacionarne faze, kao i strukturu, volumen pora i površinu stacionarne faze, oni prekrivaju njene pore i stoga značajno smanjuju njihov volumen i silanolne interakcije. Deo stacionarne faze koji je modifikovan na ovakav način predstavlja micelarnu pseudo fazu. Sastav mobilne faze i modifikovana stacionarna faza doprinose efikasnom razdvajanju u ovom kompleksnom hromatografskom sistemu. Priroda i koncentracija surfaktanta, jonska jačina i pH utiču na razdvajanje (16-18).

Optimizacija eksperimentalnih uslova mobilne faze izvedena je primenom hemometrijskog *AQbD* koncepta i metodologije multikriterijumskog odlučivanja (19). U okviru *AQbD* koncepta razvoja metode korišćen je *Box-Behnken*-ov dizajn površine odgovora za ispitivanje označenog prostora znanja kroz 17 nasumično izvedenih eksperimenata. Prema planu ovog dizajna varirani su sadržaj acetonitrila, pH mobilne faze i koncentracija nejonskog Brij 23 surfaktanta. Prvi definisani *CMA*, kriterijum razdvajanja s između dva susedna pika DPH_1 i hidrohlorotiazida, se računao kao razlika između retencionog vremena početka pika hidrohlorotiazida i kraja pika DPH_1 upotrebom izraza $s = t_{b_hidrohlorotiazid} - t_{e_DPH1}$ koji se indirektno modelovao. Zaključeno je da je retenciono vreme nedvosmisleno najpouzdaniji pokazatelj retencionog ponašanja analiziranih komponenata. Na osnovu izvedenih matematičkih modela je bilo moguće predvideti vrednosti retencionog vremena u bilo kojoj tački u okviru eksperimentalnih domena. Direktno modelovanje rezolucije kao mogućeg pokazatelja razdvajanja na baznoj liniji se nije smatralo prikladnim za ovu studiju. Poznato je da rezolucija zavisi o faktorima kao što su veličina, oblik i faktori asimetrije susednih pikova i da mali „*tailing*“ pika takođe može dovesti do značajnog gubitka rezolucije. Male varijacije rezolucije i vrednosti rezolucije koje su bliske jedinici obično daju matematičke modele sa slabom sposobnošću predviđanja. S druge strane, indirektno modelovanje kriterijuma razdvajanja s nije podložno pogrešnim procenama razdvajanja na baznoj liniji, kao ni greškama tokom modelovanja odgovora (20,21,14). Vrednosti za $t_{b_hidrohlorotiazida}$ i t_{e_DPH1} su dobijene eksperimentalno i direktno su modelovane. Nakon toga je *CMA* indirektno modelovan, odnosno izračunat na osnovu dobijenih modela za odgovarajuća retencionna vremena. Smatra se da je razdvajanje na baznoj liniji postignuto ukoliko je vrednost s iznad ili jednaka 0. Drugi definisani *CMA* je podrazumevao zadovoljavajuće zadržavanje prvog pika

koji se eluirao što se predstavljalo njegovim retencionim faktorom koji se direktno modelovao. Multipla linearna regresija i metoda najmanjih kvadrata je primenjena za kreiranje matematičkih modela (14,21-23). Sposobnost predviđanja ovih modela je bila zadovoljavajuća u definisanom eksperimentalnom domenu na što su ukazali koeficijent determinacije (R^2), prilagođeni koeficijent determinacije ($Adj. R^2$) i predviđeni koeficijent determinacije ($Pred. R^2$). U cilju postizanja simultane optimizacije definisanih CMA ($s \geq 0$ i $k \geq 0,9$), definisan je DS koji je predstavljao deo prostora u kojem su verovatnoća za dobijanje dobro razdvojenih pikova kritičnog para i odgovarajuće zadržavanje prvog pika koji se eluira veći od prethodno definisane donje prihvatljive granice. Ovakav pristup je omogućio da je pored obezbeđivanja optimalnih uslova hromatografskog razdvajanja u okviru DS , takođe, procenjen i rizik da CMA s nisu u okviru nivoa prihvatljivosti (20,22-24). Nakon definisanja DS , odabrani su eksperimentalni uslovi iz sredine ovog prostora za validaciju MCL HPLC i metoda validirana prema ICH preporukama kako bi bila potvrđena njena pogodnost za rutinsku primenu u praćenju stabilnosti cilazaprila i hidrohloriazida.

LITERATURA

1. Q.A. Xu, Ultra-high performance liquid chromatography and its applications, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2013.
2. J. Cielecka-Piontek, P. Zalewski, A. Jelińska, P. Garbacki, UHPLC: The greening face of liquid chromatography, *Chromatographia*, 76 (2013) 1429–1437.
3. Y. Kazakevich, R. LoBrutto, HPLC for pharmaceutical scientists, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2007.
4. L. Nováková, L. Matysová, P. Solich, Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis, *Talanta*, 68 (2006) 908–918.
5. M. Taleuzzaman, S. Ali, S.J. Gilani, S.S. Imam, A. Hafeez, Ultra performance liquid chromatography (UPLC) - A review, *Austin Journal of Analytical and Pharmaceutical Chemistry*, 2(6) (2015) ID1056.
6. D. Guillarme, D.T.T. Nguyen, S. Rudaz, J.L. Veuthey, Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis: application to short columns packed with small particle. Part II: gradient experiments, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68 (2008) 430–440.
7. D. Guillarme, D.T.T. Nguyen, S. Rudaz, J.L. Veuthey, Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis: Application to short columns packed with small

particle. Part I: Isocratic separation, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 66 (2007) 475–482.

8. D. Dulendra, S. Sharma, G. Vidyasagar, Analytical method development and validation of stability indicating RP-HPLC method for cilazapril and hydrochlorothiazide in the combined pharmaceutical dosage form, *International Journal of Information Research and Review* , 03(04) (2016) 2220-2228.

9. M. Otto, *Chemometrics Statistics and computer application in analytical chemistry*, 3rd ed., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2017.

10. M. Preu , D. Guyot, M. Petz, Development of a gas chromatography–mass spectrometry method for the analysis of aminoglycoside antibiotics using experimental design for the optimisation of the derivatisation reactions, *Journal of Chromatography A*, 818 (1998) 95–108.

11. E. Hoffmann, V. Stroobant, *Mass spectrometry, Principles and applications*, 3rd ed., John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England, 2007.

12. D.B. Hibbert, Experimental design in chromatography: a tutorial review, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life sciences*, 910 (2012) 2–13.

13. B. Dejaegher, Y.V. Heyden, Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 56 (2011) 141–158.

14. W. Dewé, R.D. Marini, P. Chiap, P. Hubert, J. Crommen, B. Boulanger, Development of response models for optimising HPLC methods, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 74 (2004) 263–268.

15. ICH Topic Q2(R1) Validation of analytical procedures: text and methodology, *Fed. Regist.*, 62 (1997) 27463–27467.

16. M.J. Ruiz-Ángel, S. Carda-Broch, J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Álvarez-Coque, Retention mechanisms in micellar liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 1798–1814.

17. M. Mishra, P. Muthuprasanna, K. Surya Prabha, P. Sobhita Rani, I.A. Satish Babu, I. Sarath Chandiran, G. Arunachalam, S. Shalini, Basics and potential applications of surfactants – A review, *International Journal of PharmTech Research*, 1(4) (2009) 1354-1365.

18. N. Memon, H.I. Shaikh, A.R. Solangi, Selectivity of Brij-35 in micellar liquid chromatographic separation of positional isomers, *Chromatography Research International*, (2012) article ID 458153.

19. B. Otašević, J. Šljivić, A. Protić, N. Maljurić, A. Malenović, M. Zečević, Comparison of AQbD and grid point search methodology in the development of micellar HPLC method for the analysis of cilazapril and hydrochlorothiazide dosage form stability, *Microchemical Journal*, 145 (2019) 655–663.
20. P. Lebrun, B. Govaerts, B. Debrus, A. Ceccato, G. Caliaro, P. Hubert, B. Boulanger, Development of a new predictive modelling technique to find with confidence equivalence zone and design space of chromatographic analytical methods, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 91 (2008) 4–16.
21. J. Šljivić, A. Protić, A. Malenović, B. Otašević, M. Zečević, Simple and efficient solution for robustness testing in gradient elution liquid chromatographic methods, *Chromatographia*, 81(8) (2018) 1135–1145.
22. A. Vemić, T. Rakić, A. Malenović, M. Medenica, Chaotropic salts in liquid chromatographic method development for the determination of pramipexole and its impurities following quality-by-design principles, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 102 (2015) 314–320.
23. B. Debrus, P. Lebrun, J. Mbinze Kindenge, F. Lecomte, A. Ceccato, G. Caliaro, J. Maver Tayey Mbay, B. Boulanger, R.D. Marini, E. Rozet, Ph. Hubert, Innovative high-performance liquid chromatography method development for the screening of 19 antimalarial drugs based on a generic approach, using design of experiments, independent component analysis and design space, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 5205–5215.
24. S. Orlandini, S. Pinzauti, S. Furlanetto, Application of quality by design to the development of analytical separation methods, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(2-3) (2013) 443-450.

D. PROVERA ORIGINALNOSTI DOKTORSKE DISERTACIJE

Provera originalnosti ove disertacije izvršena je na način koji je propisan Pravilnikom o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu.

Program *iThenticate* je registrovao ukupno 10% poklapanja sa 79 izvora. Preklapanje teksta sa jednim izvorom iznosi 2%, sa četiri izvora 1%, a u svim ostalim slučajevima je sličnost teksta iznosila manje od 1%. Detaljnim uvidom u materijal utvrđeno je da je podudarnost teksta posledica korišćenja ličnih imena, bibliografskih podataka, naziva metoda, reagenasa i određivanih analita, te opštih mesta i podataka u vezi sa temom disertacije.

Na osnovu rezultata provere smatramo da je doktorska disertacija Jasmine Šljivić u potpunosti originalna, ako i da su poštovana akademska pravila citiranja.

E. OBJAVLJENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DISERTACIJE

Radovi objavljeni u naučnim časopisima međunarodnog značaja

I. Radovi objavljeni u međunarodnim časopisima

1. J. Šljivić, A. Protić, B. Otašević, J. Golubović, M. Zečević, J. Krmar. Multicriteria optimization methodology in stability-indicating method development of cilazapril and hydrochlorothiazide. *Journal of Chromatographic Science*, 2017; 55(6): 625-637 (M23)

2. J. Šljivić, A. Protić, A. Malenović, B. Otašević, M. Zečević. Simple and efficient solution for robustness testing in gradient elution liquid chromatographic methods. *Chromatographia*, 2018; 81(8): 1135–1145 (M23)

3. B. Otašević, J. Šljivić, A. Protić, N. Maljurić, A. Malenović, M. Zečević. Comparison of AQbD and grid point search methodology in the development of micellar HPLC method for the analysis of cilazapril and hydrochlorothiazide dosage form stability. *Microchemical Journal*, 2019; 145: 655–663 (M21)

II. Radovi saopštjeni na međunarodnim skupovima štampani u izvodu (M34)

1. **J. Šljivić**, A. Protić, B. Otašević, J. Golubović, M. Zečević. Multicriteria optimization methodology in stability-indicating method development of cilazapril, hydrochlorothiazide and its degradation products. 21st International symposium on separation sciences, Ljubljana, Slovenija, 30. jun – 3.jul 2015.

2. **J. Šljivić**, M. Zečević, B. Otašević, A. Protić, J. Golubović. Validation of RP-HPLC stability-indicating method for cilazapril and hydrochlorothiazide. 6th Congress of pharmacy in Macedonia with international participation, Ohrid, Makedonija, 1-5. jun 2016.

3. **J. Šljivić**, A. Protić, B. Otašević, A. Malenović, N. Maljurić, M. Zečević. Quality by Design approach in the development of micellar liquid chromatographic method for the analysis of cilazapril, hydrochlorothiazide and their degradation products. DA-PBA 2018, The 11th International Symposium on Drug Analysis & The 29th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Leuven, Belgija, 9-12. septembar 2018.

F. ZAKLJUČAK - OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DISERTACIJE

Doktorska disertacija kandidata Jasmine Šljivič, magistra farmacije, obuhvatila je optimizaciju i validaciju dve različite analitičke *stability indicating* HPLC metode, za ispitivanje i praćenje stabilnosti cilazaprila i hidrohloriazida kao aktivnih farmaceutskih supstanci tako i njihovih doziranih farmaceutskih oblika, što predstavlja veoma aktuelnu i značajnu problematiku, kako sa aspekta naučnoistraživačkog rada, tako i sa aspekta primene u rutinskim analizama i redovnoj kontroli ovih lekova. Detaljnom analizom priložene doktorske disertacije Komisija je konstatovala da je disertacija prikazana na jasan i pregledan način i da su svi postavljeni ciljevi doktorske disertacije u potpunosti realizovani. Eksperimentni su organizovani i sprovedeni u skladu sa savremenim pristupom razvoja i optimizacije analitičkih metoda u naučnoj oblasti iz analitike lekova što je podrazumevalo upotrebu hemometrijskih „alata“ i veliku statističku podršku koja je potvrdila relevantnost rezultata i omogućilo dobijanje rezultata kojima se ostvaruju prethodno postavljeni ciljevi doktorske disertacije. Kandidat je u doktorskoj disertaciji na sveobuhvatan način prikazao razvoj dve potpuno nove HPLC metode zasnovane na različitim retencionim mehanizmima koje su omogućile po svim dobijenim vrednostima hromatografskih parametara, uspešno razdvajanje po polarnosti veoma različitih aktivnih farmaceutskih supstanci cilazaprila i hidrohloriazida od njihovih degradacionih proizvoda, u potpuno prihvatljivom i racinalnom vremenu trajanja hromatografske analize. Na kraju doktorske disertacije prikazani su zaključci koji su izvedeni na osnovu dobijenih rezultata i podataka dostupnih u literaturi. I pored toga što se oblast koju je kandidat istraživao veoma intenzivno proučava poslednjih nekoliko godina, kandidat je uspeo da da originalan doprinos u rešavanju ispitivanih problema. Sve ovo je potkrepljeno činjenicom da su rezultati ove doktorske disertacije do sada publikovani u tri rada u međunarodnim naučnim časopisima.

G. MIŠLJENJE I PREDLOG

Na osnovu svega izloženog, Komisija u potpisanom sastavu je zaključila da je kandidat, magistar farmacije, Jasmina Šljivić u svojoj doktorskoj disertaciji ostvarila postavljene ciljeve istraživanja i da dobijeni rezultati imaju značajan naučni doprinos u analitici lekova.

Komisija sa velikim zadovoljstvom predlaže Nastavno-naučnom veću Univerziteta u Beogradu-Farmaceutskog fakulteta da prihvati pozitivan izveštaj o završenoj doktorskoj disertaciji pod nazivom: **„Primena multikriterijumske optimizacije i koncepta dizajna kvaliteta u razvoju metoda tačne hromatografije pod ultravisokim pritiskom i micelarne tačne hromatografije za praćenje stabilnosti cilazaprila i hidrohlorotiazida“** i kandidatu Jasmini Šljivić odobri javnu odbranu po dobijanju saglasnosti Veća naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu.

Beograd, 5.07.2019.

Članovi komisije

-
1. Dr sc. Mira Zečević, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, mentor

 2. Dr sc. Biljana Otašević, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

 3. Dr sc. Ana Protić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

 4. Dr sc. Anđelija Malenović, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

 5. Dr sc. Alija Uzunović, vanredni profesor, Farmaceutski fakultet Univerziteta u Tuzli