

**UNIVERZITET U BEOGRADU – FARMACEUTSKI FAKULTET**  
**NASTAVNO – NAUČNOM VEĆU**

Na sednici Nastavno – naučnog veća Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, održanoj 30. januara 2019. godine, na osnovu člana 94. Statuta Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, doneta je odluka o imenovanju Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije pod naslovom: *Teorijski i empirijski modeli u modelovanju retencionog ponašanja olanzapina u tečnoj hromatografiji hidrofилnih interakcija*, kandidata mr ph. Tumpa Anje.

Izrada ove doktorske disertacije odobrena je na sednici Veća naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu, održanoj 17. maja 2016. godine.

Komisija u sastavu:

1. DR BILJANA STOJANOVIĆ, vanredni profesor, mentor

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za analitiku lekova

2. DR MIRJANA MEDENICA, redovni profesor u penziji, Predsednik Komisije

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za fizičku hemiju i instrumentalne metode

3. DR ZORICA STANIMIROVIĆ, vanredni profesor, član

Univerzitet u Beogradu – Matematički fakultet, Katedra za numeričku matematiku i optimizaciju

pročitala je završenu doktorsku disertaciju, pregledala kompletnu dokumentaciju i podnosi sledeći IZVEŠTAJ.

Beograd,

1. mart 2019. godine

## IZVEŠTAJ

### A. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija pod nazivom *Teorijski i empirijski modeli u modelovanju retencionog ponašanja olanzapina u tecnoj hromatografiji hidrofilnih interakcija* napisana je na 121 strani, formata A4, uz kratak *Rezime* na srpskom i engleskom jeziku. Sadrži 11 poglavlja: *HILIC, Teorijski modeli, Eksperimentalni modeli, Splajn interpolacioni polinomi, Quality by Design, Pregled literature, Cilj rada, Eksperimentalni deo, Rezultati i diskusija, Zaključak i Literatura*. Sadrži 13 slika, 16 tabela, 19 jednačina, 63 literaturna navoda, kao i spisak objavljenih naučnih radova i saopštenja koji predstavljaju publikovane rezultate iz ove disertacije.

Poglavljje *HILIC* napisano je na 1 strani i predstavlja kratak osvrt na značaj tečne hromatografije hidrofilnih interakcija (eng. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography – HILIC*) i time predstavlja uvod u dalji tekst. Naredni deo, *Teorijski modeli* daje pregled postojećih teorijskih modela kao što su particioni, adsorpcioni, mešoviti particiono-adsorpcioni model, kao i kvadratni model. Prikaz teorijskih modela dat je na 6 strana. *Eksperimentalni modeli* opisani su na 3 strane u okviru kojih je, pored ostalih, objašnjen Neue i Kuss model koji je kasnije korišćen u okviru ove doktorske disertacije. U okviru dela *Splajn interpolacioni polinomi* na 5 strana opisane su karakteristike splajn interpolacionog polinoma koji je po prvi put u ovoj doktorskoj disertaciji primenjen za modelovanje retencionog ponašanja analita u hromatografiji. U okviru narednog poglavlja *Quality by Design* na 8 strana je opisan ovaj savremeni koncept, kao i njegove karakteristike kada je u pitanju primena za razvoj hromatografskih metoda. Navedeni su koraci kroz koje je potrebno proći prilikom integrisanja ovog postupka u hromatografske metode. Takođe, prikazan je i pregled do sada publikovanih radova u kojima je opisana primena savremenog QbD koncepta u razvoju hromatografskih metoda. Iz pregleda je jasno da nema radova u kojima je opisan razvoj gradijentne HILIC metode sa ovim savremenim konceptom. U okviru pregleda literature na 5 strana navedeni su do sada publikovani radovi u kojima je analiziran olanzapin, sam ili u smeši sa nekim drugim analitima u biološkom materijalu ili u farmaceutskim preparatima.

Poglavlje *Cilj rada* napisano je na 2 strane. Kao **prvi cilj** navedeno je unaprađenje teorijskih znanja o tačnoj hromatografiji hidrofilnih interakcija kroz analizu smeše olanzapina i njegovih osam srodnih supstanci na različitim tipovima silika kolona i njihovim polarnim modifikacijama. U okviru **drugog cilja** navodi se modelovanje retencionog ponašanja analizirane smeše uz pomoć već postojećih teorijskih (particioni, apsorpcioni, mešoviti i kvadratni) i empirijskih (Neue) matematičkih modela. Kao **treći cilj** navedeno je kreiranje novog matematičkog modela primenom splajn interpolacije u cilju boljeg opisivanja kompleksnog HILIC sistema od postojećih modela predloženih u literaturi. **Četvrti cilj** je razvoj metode tačne hromatografije hidrofilnih interakcija sa gradijentnim eluiranjem za praćenje olanzapina i njegovih srodnih supstanci u čvrstim farmaceutskim oblicima u skladu sa QbD konceptom. **Peti cilj** ove doktorske disertacije bio je prenos predložene HILIC metode na UPLC/MS/MS sistem u cilju dobijanja brže i osjetljivije metode za analizu ispitivanih analita pod uticajem različitih *stres* agenasa.

Poglavlje *Eksperimentalni deo* napisano je na 21 strani. U okviru ovog dela prikazani su aparati i reagensi, uključujući i standardne supstance sa prikazanim strukturnim formulama i hemijskim nazivima, a navedeni su i korišćeni kompjuterski programi.

Za modelovanje retencionog ponašanja olanzapina i srodnih supstanci korišćene su 4 različite HILIC kolone čije su karakteristike tačno navedene, kao i ostali hromatografski uslovi koji su korišćeni u ovoj fazi istraživanja. Navedeni su i korišćeni kompjuterski programi za obradu dobijenih rezultata.

U okviru razvoja hromatografske metode navedeni su hromatografski uslovi, zatim priprema rastvora standarda, kao i mobilnih faza prema planu definisanom *Rechtschaffen* dizajnom za optimizaciju metode. U nastavku je detaljno navedena priprema rastvora za ispitivanje svih parametara validacije metode, kao i optimalni hromatografski uslovi i korišćeni kompjuterski programi. Konačno, navedeni su uslovi za ispitivanje stabilnosti pod uslovima *forsirane degradacije*.

Poglavlje *Rezultati i diskusija* napisano je na 59 strana. U ovom poglavlju prikazani su svi dobijeni rezultati eksperimentalnih istraživanja kroz diskusiju, kao i u obliku 14 tabela i 9 slika. Data je detaljna analiza rezultata uz teorijsku i literaturnu podršku. Detaljnije o ovom poglavlju biće u delu B ovog IZVEŠTAJA.

Poglavlje *Zaključak* napisano je na 3 strane i sadrži sve zaključke u skladu sa postavljenim ciljevima.

Poglavlje *Literatura* napisano je na 8 strana i sadrži 63 bibliografska navoda.

## B. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

U okviru prvog dela *Rezultata i diskusije* najpre je prikazan odabir eksperimentalnih uslova pogodnih za analizu olanzapina i njegovih srodnih supstanci u HILIC sistemu. Da bi se predvidelo retenciono ponašanje izračunate su pKa, log P i log D vrednosti u Marvin Sketch programu. Na osnovu dobijenih vrednosti odabrani su početni hromatografski uslovi. Nakon toga, ispitan je uticaj stacionarne faze na retenciono ponašanje analita. Ispitivanje je urađeno na 4 stacionarne faze HILIC karakteristika, a dobijeni rezultati su prikazani u obliku odgovarajućih hromatograma. Izvedeni su značajni zaključci o retencionom ponašanju olanzapina i njegovih srodnih supstanci. U narednoj fazi pristupilo se modelovanju retencionog ponašanja, tj. ispitan je uticaj polarnijeg rastvarača (rastvor pufera) u mobilnoj fazi na retenciono ponašanje analita na 4 HILIC stacionarne faze. Kako bi se preciznije ispitali retencioni mehanizmi, rezultati su najpre fitovani u dva osnovna matematička modela: nelokalizovani i lokalizovani. Dobijeni rezultati prikazani su grafički kao zavisnost logaritmovanih vrednosti retencionih faktora analita od logaritmovanih (adsorpcioni model) i linearnih (particioni model) vrednosti procentnog udela vodene faze. U okviru ove faze srodna supstanca 5 isključena je iz dalje analize jer je pokazala neretenciono ponašanje. Statistički parametri koji su se koristili za ocenu podobnosti matematičkih modela bili su koeficijent determinacije ( $R^2$ ) i unakrsno validirani koeficijent determinacije ( $Q^2$ ). Dobijene vrednosti nisu bile zadovoljavajuće ni za jednu od kolona. Vrednosti  $R^2$  su se kretale u sledećim opsezima za različite kolone: (silika: 0,7890–0,9977, cijano: 0,9003–0,9978, diolna: 0,8504–0,9982 i cviterjonska: 0,7700–0,9970). Vrednosti za koeficijent  $Q^2$  bile su očekivano manje od  $R^2$  ali u pojedinim slučajevima i neprihvatljivo male. Podaci su dalje korišćeni za kreiranje mešovitog modela, koji ima linearni i nelinearni deo jednačine. Očekivalo se da će mešoviti model bolje opisivati sistem, što je i dokazano dobijanjem značajno većih vrednosti  $R^2$  (silika: 0,9972–0,9999, cijano: 0,9576–0,9978, diolna: 0,9659–0,9998 i cviterjonska: 0,9661–0,9986). Iako značajno veći, ni statistički parametri mešovitog modela nisu dovoljno dobri za precizno karakterisanje ispitivanog sistema i predviđanje retencionog ponašanja olanzapina i njegovih srodnih supstanci u HILIC sistemu. Na osnovu dobijenih rezultata, zaključuje se da procesi adsorpcije i particije imaju zajedno najviši uticaj na retenciono ponašanje analita u HILIC sistemu, ali da je ipak za precizniju karakterizaciju potrebno dobiti modele koji imaju bolje statističke parametre. Dalje istraživanje

je išlo u pravcu testiranja kvadratnog modela koji u skladu sa dobijenim većim vrednostima  $R^2$  i  $Q^2$  pokazuju dobru moć opisivanja sistema, ali zbog svojih nedostataka nije našao veliku primenu u predviđanju retencionog ponašanja hromatografskim sistemima. U nastavku ove doktorske disertacije, dobijeni rezultati su fitovani u Neue model, koji je opisan u uvodnom delu doktorske disertacije. Tabela prikazani rezultati ponovo pokazuju nedovoljno dobro opisivanje složenog HILIC sistema. Iz tog razloga, u sledećem delu disertacije pristupilo se kreiranju novog splajn interpolacionog modela. Ovaj model je odabran jer se očekivalo da će, zbog svojih karakteristika, dobro opisati ispitivani sistem. U tu svrhu kreiran je kubni splajn model i dobijeni rezultati na silika koloni su u radu prikazani grafički, dok je statistička analiza prikazana za sve ispitivane kolone. Dobijene vrednosti za  $Q^2$ , koji se u ovom slučaju smatrao relevantnim statističkim parametrom, pokazale su da splajn model dobro opisuje ispitivani hromatografski sistem. Rezultati su verifikovani izvođenjem eksperimenata u nasumično odabranoj tački eksperimentalnog prostora. Dobijeno je prihvatljivo slaganje (vrednost greške je manja od 10%) čime je potvrđeno da model dobro opisuje sistem. Dakle, splajn interpolacioni model pokazao se pogodnim za predviđanje retencionog ponašanja olanzapina i njegovih srodnih supstanci u HILIC sistemu. S obzirom da je HILIC kompleksniji od klasičnog reverzno-faznog sistema, što je potvrđeno kroz brojne naučne publikacije postavilo se pitanje da li ovaj model može da se primeni i na druge HILIC sisteme. Primenljivost je potvrđena kroz testiranje splajn modela na drugoj smeši u HILIC sistemu. U te svrhe odabran je granisteron i njegove 2 nečistoće, a podaci su preuzeti iz literature. Dobijene velike vrednosti za  $Q^2$  pokazuju da je i ovaj sistem dobro okarakterisan splajn modelom čime je dodatno potvrđena njegova primenljivost. U ovoj doktorskoj disertaciji sistematičnim pristupom došlo se do novog i najpreciznijeg načina opisivanja složenog HILIC sistema. Ova procedura, koja je obuhvatila niz dobro isplaniranih eksperimenata, kao i prateće statističke analize prva je kao takva opisana u literaturi, čime je potvrđen naučni doprinos ove doktorske teze.

U nastavku doktorske disertacije urađen je razvoj HILIC metode za analizu olanzapina i njegovih srodnih supstanci u skladu sa QbD konceptom. Integrisanje ovog savremenog koncepta u razvoj metoda predstavlja trend u savremenoj analitici lekova ali i izazov kada su u pitanju HILIC metode. U ovoj tezi je od posebnog značaja činjenica da je po prvi put ovaj naučno zasnovani pristup razvoju metoda primenjen za gradijentnu HILIC metodu. Osnovni cilj razvoja svake hromatografske metode u analitici lekova je kreiranje robusne metode sa što boljom separacijom ispitivanih komponenti, a u najkraćem vremenskom periodu. S obzirom na to da je

gradijent bio odabrani način eluiranja, ukupno vreme trajanja analize nije praćeno kao značajan odgovor. Kao bitni odgovori sistema praćeni su kriterijumi separacije  $s$  između kritičnih parova analita ( $s_{23}$ : srodne supstance 2 i 4;  $s_{67}$ : olanzapin i srodna supstanca 6). Kao kritični parametri hromatografskog procesa odabrani su temperatura kolone, udeo vodene faze u ukupnoj mobilnoj fazi i dužina trajanja linearnog dela gradijenta. U cilju definisanja *knowledge space* (KS) ili prostora znanja primenjena je metodologija eksperimentalnog dizajna. Kao optimizacioni dizajn odabran je *Rechtschaffen* dizajn. Za posmatrane odgovore sistema kreirani su matematički modeli. Na osnovu velikih vrednosti  $R^2$  i  $\text{Adj } R^2$ , zaključeno je da predloženi modeli veoma dobro opisuju dobijene eksperimentalne podatke, dok velike vrednosti  $Q^2$  ukazuju na dobre sposobnosti predviđanja, što je ispitano internom validacijom modela. Takođe, *lack of fit* vrednosti nisu značajne, što je još jedna potvrda kvaliteta kreiranih matematičkih modela. Rezultati su objašnjeni kroz diskusiju ali i kroz grafičke prikaze koji jasno pokazuju karakteristike datog hromatografskog sistema. Dalje, konstruisan je *sweet spot* region koji do određene mere objašnjava uticaj posmatranih faktora na odgovore sistema. Međutim, region optimalnih uslova definisan sa *sweet spot* ne uzima u obzir moguće varijacije u preciznosti prilikom merenja faktora, kao ni u nesigurnosti modela koja je u određenoj meri neizbežna. Iz tih razloga, dalje je urađena Monte Carlo simulacija koristeći MODDE 11 program, a nakon toga kreiran je konačni *design space*. Uzimajući u obzir dobijeni *design space* i praktična razmatranja, odabrana je sledeća radna tačka: udeo vodene faze na početku gradijenta je 5,3%; dužina trajanja linernog dela gradijenta je 13 minuta, a temperatura kolone je 41°C. Ovi uslovi su još jednom eksperimentalno verifikovani. Na kraju, ispitani su parametri validacije i potvrđena je primenljivost metode. Sistematičan i jasno definisan naučno-zasnovani razvoj gradijentne HILIC metode za analizu olanzapina i njegovih srodnih supstanci prvi je kao takav publikovan i prikazan naučnoj javnosti. Visok kvalitet naučne publikacije kategorije M21 ukazuje na činjenicu da je definisani naučni cilj uspešno ispunjen i da je zadovoljio visoke naučne kriterijume.

Jedna od značajnih prednosti HILIC metode jeste činjenica da se za ovaj tip hromatografije koriste rastvarači kompatibilni sa masenim detektorom. Time je znatno olakšan transfer metode na LC/MS/MS sistem. U ovoj doktorskoj disertaciji je to i potvrđeno jer je kroz svega nekoliko dobro isplaniranih koraka dobijena HILIC metoda sa masenom detekcijom za analizu olanzapina i njegovih srodnih supstanci. Korišćenjem *ACQUITY Columns* kalkulatora urađen je transfer gradijentne HILIC metode sa LC na UPLC sistem. U nastavku istraživanja

optimizirani su uslovi masenog detektora za olanzapin i sve srodne supstance i odabrane su tranzicije za kvantitativnu analizu. U radu su prikazani hromatogrami pod optimalnim uslovima. Dobijena metoda je zatim validirana i potvrđena je njena primenljivost kroz ispitivanje uzoraka koji su tretirani pod uticajem razlicitih *stres* agenasa. Ovo je prva visoko osetljiva metoda koja omogućava praćenje degradacije olanzapina.



### C. UPOREDNA ANALIZA SA REZULTATIMA IZ LITERATURE

Pregledom do sada objavljenih naučnih radova može se zaključiti da sveobuhvatna karakterizacija hromatografskog ponašanja olanzapina i njegovih 8 srodnih supstanci u HILIC sistemu do sada nije opisana. Najnovija istraživanja pokazuju da je trend primene HILIC metode sve više u porastu ali da i dalje složenost HILIC sistema predstavlja svojevrsan naučni izazov. Naime, pokazano je da u ukupnom retencionom mehanizmu učestvuju particija, adsorpcija, jonska izmena i vodonične veze, ali da u pojedinim slučajevima to mogu biti i dipol-dipol i hidrofobne interakcije [1,2]. Da bi se što bolje opisalo retenciono ponašanje u HILIC sistemu literaturi su opisani brojni teorijski modeli [3], od kojih su u ovoj doktorskoj disertaciji testirani particioni model, adsorpcioni model, mešoviti adsorpciono-particioni model i kvadratni model na smeši olanzapina i 8 srodnih supstanci. Ovo je prvi put u literaturi da se na ovim, strukturno sličnim analitima, vrši ispitivanje retencionog ponašanja u HILIC-u. Pored teorijskih modela u literaturi su opisani i eksperimentalni modeli [4,5,6], od kojih je u ovoj tezi na ispitivanoj smeši analita primenjen Neue i Kuss [4] u cilju poređenja rezultata sa teorijskim modelima. Ovakav sistematičan pristup omogućava da se dobije jasan uvid u procese koji se dešavaju, ali i da se sagledaju prednosti i nedostaci predloženih modela. Iako se rezultati mogu smatrati prihvatljivim cilj je bio da se posmatrani hromatografski sistem opiše što bolje, pa je stoga primenjena splajn interpolacija [7,8]. Nema literaturnih podataka koji ukazuju na dosadašnju primenu ovog pristupa za modelovanje hromatografskog ponašanja, što daje poseban doprinos ove doktorske disertacije u naučnoj javnosti.

U ovoj doktorskoj disertaciji sva istraživanja urađena su na smeši olanzapina i njegovih srodnih supstanci. Dosadašnje publikacije ukazuju na primenu LC metode sa UV detekcijom [9] i LC metode sa masenom detekcijom [10,11,12] za analizu olanzapina u cerebrospinalnoj tečnosti i serumu [13], krvi [14,15], kao i u urinu [16]. Takođe, mogu se naći radovi u kojima je opisano određivanje olanzapina u farmaceutskim oblicima ili *bulk*-u LC metodom [17–20]. Pregled literature pokazao je da do sada nema publikovanih radova u kojima je opisana analitika olanzapina i njegovih srodnih supstanci u HILIC sistemu. Današnji savremeni pristup analitici lekova podrazumeva razvoj metode sa naučnim pristupom koji podrazumeva QbD koncept.

Složenost ovog pristupa, ali i njegove prednosti, opisane su u naučnoj literaturi [21–23], ali nije bilo radova koji ovaj koncept primenjuju za složenu gradijentnu HILIC metodu.

Konačno, kroz publikovane radove, ova doktorska disertacija daje poseban doprinos naučnoj javnosti nudeći nova znanja i značajna unapređenja i iz oblasti HILIC-a.

## Literatura:

- [1] Jandera, P.: Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. *Anal Chim Acta* 2011; 692: 1–25.
- [2] Hemstrom, P., Irgum, K.: Hydrophilic interaction chromatography. *J Sep Sci* 2006; 29: 1784–1821.
- [3] Poole, C.F.: *The Essence of Chromatography*, Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands 2003.
- [4] Neue, U.D., Kuss, H.J.: Improved reversed-phase gradient retention modeling. *J Chromatogr A* 2010; 1217: 3794–3803.
- [5] Torres-Lapasió, J.R., Garcíá-Alvarez-Coque, M.C., Bosch, E., Rosés, M.: Considerations on the modelling and optimization of resolution of ionizable compounds in extended pH-range columns. *J Chromatogr A* 2005; 1089: 170–186.
- [6] Schoenmakers, P.J., Billiet, H.A.H., Tijssen, R., De Galan, L.J.: Gradient selection in reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1978; 149: 519–537.
- [7] Radunović, D.P.: *Numeričke metode* (treće izdanje), Akademska misao, Beograd, Srbija, 2003.
- [8] Ediss, C., Tam, Y.K.: An interactive computer program for determining areas bounded by drug concentration curves using Lagrange interpolation. *J Pharmacol Toxicol Meth* 1995; 34: 165–168.
- [9] Leon, J., Dusci, L., Hackett, P., Fellows, L.M., Ilett, K.F.: Determination of olanzapine in plasma by high-performance liquid chromatography using ultraviolet absorbance detection. *J Chromatogr B* 2002; 773: 191–197.
- [10] Bedor, N.C.T.C., Bedor, D.C.G., de Sousa, C.E.M., Bonifacio, F.N., Branco, D.M.C., Leal, L.B., de Santana, D.P.: The development and validation of a method for quantifying olanzapine in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2015; 42: 305–313.
- [11] Bonde, S.L., Bhadane, R.P., Gaikwad, A., Gavali, S.R., Katala, D.U., Narendiran, A.S.: Simultaneous determination of olanzapine and fluoxetine in human plasma by LC–MS/MS: Its pharmacokinetic application, *J Pharm Biomed Anal* 2014; 90: 64–71.
- [12] Lou, H., Ruan, Z., Jiang, B., Chen, J.: Simultaneous quantification of olanzapine and its metabolite N-desmethyloanzapine in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry for therapeutic drug monitoring. *Biomed Chromatogr* 2014; 29: 671–678.

[13] Josefsson, M., Roman, M., Skogh, E., Dahl, M.L.: Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for determination of olanzapine and N-desmethyloanzapine in human serum and cerebrospinal fluid. *J Pharm Biomed Anal* 2010; 53: 576–582.

[14] Berna, M., Ackermann, B., Ruterbories, K., Glass, S.: Determination of olanzapine in human blood by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J Chromatogr B* 2002; 767: 163–168.

[15] Nielsen, M.K.K., Johansen, S.S.: Determination of olanzapine in whole blood using simple protein precipitation and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J Anal Toxicol* 2009; 33: 212–217.

[16] Urdigere, A.K.R., Besagarahally, B.L., Basavaiah, K: Sensitive liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of olanzapine in human urine. *Arab J Sci Eng* 2012; 37: 1381–1387.

[17] Cui, D., Li, Y., Lian, M., Yang, F., Meng, Q.: Development of a simple and stability-indicating RP-HPLC method for determining olanzapine and related impurities generated in the preparative process. *Analyst* 2011; 136: 3149–3156.

[18] Rao, R.N., Raju, A.N., Narsimha, R., Babu, G.R.: Isolation and characterization of process related impurities of olanzapine using HPLC and ESI–MS/MS. *J Sep Sci* 2008; 31: 107–118.

[19] Krishnaiaha, C., Murthy, M.V., Kumar, R., Mukkanti, K.: Development of a stability-indicating UPLC method for determining olanzapine and its associated degradation products present in active pharmaceutical ingredients and pharmaceutical dosage forms. *J Pharm Biomed Anal* 2011; 54: 667–673.

[20] Pathak, A., Rajput, S.J.: Development of a stability-indicating HPLC method for simultaneous determination of olanzapine and fluoxetine in combined dosage forms. *J Chrom Sci* 2009; 47: 605–611.

[21] Dispas, A., Avohou, H.T., Lebrun, P., Hubert, P.: Quality by Design approach for the analysis of impurities in pharmaceutical drug products and drug substances. *Trends Analyt Chem* 2018; 101: 24–33.

[22] Orlandini, S., Pinzauti, S., Furulanetto, S.: Application of quality by design to the development of analytical separation methods. *Anal Bioanal Chem* 2013; 405: 443–450.

[23] Rozet, E., Lebrun, P., Debrus, B., Boulanger, P., Hubert, Ph.: Design space for analytical methods. *TRAC- Trends in Anal Chem* 2013; 42: 157–167.

**D. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DOKTORSKE  
DISERTACIJE**

**NAUČNI RADOVI OBJAVLJENI IZ DOKTORSKE DISERTACIJE U ČASOPISIMA  
MEĐUNARODNOG ZNAČAJA**

1. Tumpa, A., Mišković, S., Stanimirović, Z., Jančić-Stojanović, B., Medenica, M. Modeling of HILIC retention behavior with theoretical models and new spline interpolation technique. *J Chemometrics* 2017; 31 31 (9), <https://dpi.org/10.1002/cem.2910> **M21**
2. Tumpa, A., Stajić, A., Jančić-Stojanović, B., Medenica, M. Quality by Design in the development of hydrophilic interaction liquid chromatography method with gradient elution for the analysis of olanzapine. *J Pharm Biomed Anal* 2017; 134: 18–26. **M21**

**NAUČNI RADOVI, IZ DOKORSKE DISERTACIJE, SAOPŠTENI NA SKUPOVIMA  
MEĐUNARODNOG ZNAČAJA I ŠTAMPANI U IZVODU (M34)**

1. Tumpa, A., Mišković, S., Stanimirović, Z., Jančić-Stojanović, B., Medenica, M.: Theoretical models and new spline interpolation technique in modeling of HILIC retention behaviour on the example of olanzapine and its eight impurities, *XVI Chemometrics in Analytical Chemistry*, Barcelona, Spain, 2016.

## **E. PROVERA ORIGINALNOSTI DOKTORSKE DISERTACIJE**

Korišćenjem programa iThenticate u Univerzitetnoj biblioteci Svetozar Marković, Beograd završena je provera originalnosti doktorske disertacije. Dobijena vrednost za *Similarity index* iznosi 17%, od čega su 4% reči koje se nalaze na internetu, dok su sva ostala preklapanja manja od 1% i odnose se u najvećem broju slučajeva na reference. Shodno tome, može se izvesti zaključak da je priložena doktorska disertacija kandidata mr ph Tumpa Anje originalno naučno delo.

## **F. ZAKLJUČAK – OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE**

U ovoj doktorskoj disertaciji, iz naučne oblasti – Analitika lekova, po prvi put je prikazan sistematičan pristup u ispitivanju mehanizama retencionog ponašanja u HILIC sistemu. Pristup koji je prikazan u ovoj doktorskoj disertaciji uključio je najpre ispitivanje postojećih teorijskih i eksperimentalnih modela uz odgovarajuću statističku evaluaciju rezultata. Kako je svaki sistem pokazao svoje nedostatke postavljen je cilj da se nađe matematički model koji će ovaj složen sistem najtačnije da opiše i time da omogući preciznije predviđanje retencionog ponašanja analita od prethodnih modela. To je uspešno postignuto splajn interpolacionim modelom koji je dao statistički najpovoljnije rezultate. Potencijal ovog pristupa potvrđen je i na drugoj smeši. Ovaj deo doktorske disertacije publikovan je u časopisu *Journal of Chemometrics* (kategorije M21), što potvrđuje naučnu vrednost ovog dela doktorske disertacije.

Iz ove doktorske disertacije rad koji je publikovan u časopisu *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (kategorije M21) predstavlja prvi rad u kome je prikazan razvoj gradijentne HILIC metode sa QbD konceptom. S obzirom na to da ovaj pristup uključuje primenu složenih hemometrijskih alata i daje kao rezultat unapređenu metodu za analitiku olanzapina i njegovih srodnih supstanci može se zaključiti da je predloženi postupak naučno koristan i da može naučnoj javnosti dati jedan novi pristup u savremenoj analitici lekova.

Rezultati ove doktorske disertacije objavljeni su kao naučni radovi u 2 međunarodna časopisa (*Journal of Chemometrics*– M21 i *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* – M21) i saopšteni na 1 međunarodnom naučnom skupu, što nameće zaključak o značaju ove doktorske disertacije i njenom naučnom doprinosu kroz nova saznanja u oblasti modelovanja retencionog ponašanja u HILIC sistemu, kao i kroz razvoj nove metode za analitiku olanzapina i njegovih srodnih supstanci.

Članovi Komisije predlažu članovima Nastavno–naučnog veća Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvate pozitivnu ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom *Teorijski i empirijski modeli u modelovanju retencionog ponašanja olanzapina u tečnoj hromatografiji hidrofилnih interakcija*, kandidata mr ph. Tumpa Anje.

Komisija za ocenu i odbranu  
završene doktorske disertacije  
kandidata mr ph. Tumpa Anje

DR MIRJANA MEDENICA, redovni profesor u penziji,  
predsednik Komisije  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

DR BILJANA STOJANOVIĆ, vanredni profesor,  
mentor  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

DR ZORICA STANIMIROVIĆ, vanredni profesor,  
član komisije  
Univerzitet u Beogradu – Matematički fakultet

---

Beograd, 1. mart 2019. godine